

AVALIAÇÃO DE AMBIENTES E PRODUTOS CONTAMINADOS POR AGROTÓXICOS

Mauro Velho de Castro Faria

ASPECTOS INTRODUTÓRIOS

Considerações gerais

A utilização de substâncias químicas como defensivos agrícolas foi iniciada na década de 20, mas só depois da 2ª Guerra Mundial tais produtos passaram a desempenhar um papel de crescente relevância na agricultura. A procura de agentes químicos apropriados para fins militares levou à síntese de numerosas substâncias dotadas de propriedades biocidas e, portanto, passíveis de uso contra plantas e animais nocivos.

O aumento progressivo da população exige um concomitante acréscimo na oferta de alimentos. Para tanto, é necessário diminuir a perda nas lavouras e assegurar o desenvolvimento de culturas em larga escala, e os chamados ‘defensivos agrícolas’ estão inseridos nesse contexto. No entanto, por serem substâncias tóxicas e, em alguns casos, persistentes, contaminam o ambiente – ar, água e solo –, provocando importantes desequilíbrios ambientais. São designados genericamente como agrotóxicos e representam risco químico potencial à biota, em geral, e aos seres humanos, podendo ser encontrados nos alimentos, seja por via direta, como resultado da aplicação numa das fases de sua produção, transporte ou armazenamento; seja por via indireta, como no caso de

animais de corte, alimentados com ração vegetal contaminada. Como consequência, vários problemas ambientais e/ou de saúde pública são relatados, sendo sua intensidade muito maior nos países em desenvolvimento, como no caso do Brasil. Este fato reflete a existência de condições inadequadas de manuseio e desrespeito aos padrões de segurança, decorrentes da falta de fiscalização e de conhecimentos insuficientes sobre os perigos do uso de agrotóxicos por parte dos trabalhadores (Pimentel, 1996).

Ferrer (1995) descreve alguns casos de intoxicação humana em grandes proporções, incluindo os que ocorreram por ingestão de alimentos contaminados. Essa contaminação pode ser decorrente do acúmulo de agrotóxicos estáveis através da cadeia alimentar (como ocorre com os organoclorados), do uso excessivo de agrotóxicos no setor agrícola, sem a correta observação do período de carência, e da contaminação durante o transporte e armazenamento dos produtos (Henao & Corey, 1986).

Definição e classificação

O termo 'agrotóxico' (em inglês *pesticide*) foi definido pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) como uma substância ou mistura de substâncias capazes de evitar, destruir ou controlar qualquer praga, inclusive vetores de doenças humanas ou de animais e espécies indesejáveis de plantas ou animais que causem danos ou interfiram com a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, de produtos relacionados à agricultura, de madeiras e seus derivados e de rações animais.

Adotando-se esta definição, arrolam-se entre as pragas: insetos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, vírus, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e aos produtos alimentícios em geral. Por extensão, incluem-se nesta categoria os agentes desfolhantes, os desseccantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Excluem-se as vacinas, os medicamentos, os antibióticos de uso humano e veterinário e os agentes utilizados para o controle biológico das pragas (WHO/Unep, 1990).

Os critérios que podem ser utilizados para classificar os agrotóxicos variam muito. Entretanto, alguns dos mais comuns são: 1) alvos prefe-

renciais sobre os quais atuam (inseticidas, fungicidas, herbicidas e rodenticidas, entre outros); 2) classe química a que pertencem (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas etc.); 3) maior ou menor toxicidade aguda sobre os seres vivos – esta última é recomendada pela Organização Mundial da Saúde, que os classifica segundo o grau de periculosidade, baseando-se na determinação da dose letal 50% aguda (DL_{50}), por via oral ou dérmica, para ratos (Henao & Corey, 1986).

Não cabe aqui uma análise mais aprofundada do mecanismo de ação de todos os agrotóxicos (inseticidas, fungicidas e herbicidas) usados na agropecuária. A seguir, são destacadas apenas as classes que apresentam maior toxicidade para mamíferos.

1) Os organoclorados (OC), um grupo relativamente grande de inseticidas, com considerável diversidade de estruturas, propriedades e usos. Três subgrupos são dignos de destaque: os derivados clorados do etano (DDT e outros), os ciclodienos (aldrin, endrin, dieldrin, heptacloro e endossulfan) e os hexaclorociclohexanos (HCHs), como o lindano (Walker et al., 1996). A variada toxicidade dos OC expressa a diversidade química desta classe. Contudo, um modo comum a quase todos é a interferência no fluxo de cátions através das membranas de células nervosas.

2) Os organofosforados e carbamatos, grupo de inseticidas genericamente conhecidos como anticolinesterásicos. Ambos possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica: a inibição da enzima acetilcolinesterase, presente nas sinapses nervosas do sistema nervoso central e periférico (Buronfosse & Buronfosse, 1995). A acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. Com sua inibição, em face da presença de um composto anticolinesterásico, ocorre o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, o que exacerba os efeitos colinérgicos.

Os agrotóxicos organofosforados são usualmente ésteres pentavalentes do ácido fosfórico e tiosfosfórico. Os organofosforados são mais amplamente utilizados como inseticidas, mas podem ser empregados como herbicidas (glifosfato) e fungicidas (kitazin). Alguns organofosforados empregados na agricultura, como o paration, são muito tóxicos para os mamíferos, enquanto outros usam as diferenças no metabolismo de insetos e mamíferos para produzir agrotóxicos com baixa toxicidade para estes últimos, como o malation (Smith et al., 1996).

À semelhança dos organofosforados, os carbamatos agem também inibindo a acetilcolinesterase e se diferenciam pelo fato de a combinação se processar de maneira mais reversível, o que acarreta, todavia, um acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas. Os primeiros ésteres do ácido carbâmico foram sintetizados na década de 30 e comercializados como fungicidas. Estes ésteres alifáticos possuíam baixa atividade inseticida, e o interesse por esta classe permaneceu estagnado até os anos 50, quando foram sintetizados potentes análogos da droga fisostigmina, um alcalóide anticolinesterásico extraído da planta *Physostigma venenosum* (Casarret & Doll's, 1989).

3) Os piretróides, compostos sintéticos similares às piretrinas, formam o grupo mais recente de inseticidas no mercado. São bem menos tóxicos aos mamíferos do que organofosforados, carbamatos e organoclorados. A alta atividade inseticida dos piretróides, que permite seu emprego em pequenas dosagens, associada à seletividade que apresentam, possibilitou o aparecimento de novos produtos de origem sintética, inclusive mais estáveis à luz e menos voláteis que os de origem natural, para uso na agropecuária ou como domissanitários. Piretrinas e piretróides são substâncias alergizantes e freqüentemente desencadeiam episódios de asma e bronquite em crianças. São os inseticidas mais usados em ambientes domésticos.

A PROBLEMÁTICA DO MONITORAMENTO DE AGROTÓXICOS NO AMBIENTE E NOS ALIMENTOS

A necessidade do monitoramento

Muito se tem falado e proposto a respeito da melhor proteção do trabalhador do campo, diretamente exposto à intoxicação aguda por estes agentes tóxicos, quando inadequadamente manuseados. O mesmo não pode ser dito, no entanto, quanto à proteção das populações de organismos vivos, em geral, e humanas, em especial, indiretamente expostas por meio da contaminação da água, do solo e de alimentos que contenham níveis perigosos de resíduos de agrotóxicos. Tais populações estão potencialmente sujeitas a efeitos crônicos de exposição con-

tinuada a múltiplos agentes. O monitoramento torna-se a única forma de comprovar que tais resíduos estão abaixo dos limites de segurança estabelecidos – garantindo que o alimento consumido seja de boa qualidade –, que os produtores estão aplicando esses produtos de forma correta e que a colheita está sendo feita após o período de carência adequado.

Metodologias usadas no monitoramento de agrotóxicos

Métodos físico-químicos de análise instrumental

A análise de resíduos em amostras ambientais ou de alimentos, especialmente quando é muito elevado o número de possíveis contaminantes dentro de uma classe ou classes de compostos, é uma tarefa difícil e dispendiosa. Para um programa efetivo de monitoramento, tomando-se apenas o exemplo dos agrotóxicos, os métodos instrumentais cromatográficos atualmente usados sofrem limitações ligadas a aspectos técnicos e ao alto custo associados a vários fatores:

- 1) são técnicas sofisticadas e onerosas, as quais empregam equipamentos que requerem constante manutenção e dependem, primordialmente, de laboratórios especializados e pessoal altamente qualificado;
- 2) existe um grande número de agrotóxicos (várias centenas) registrados para uso e comercialização;
- 3) há carência de dados relativos aos produtos efetivamente mais usados, por cultura, nas diversas regiões agrícolas, o que gera a obrigatoriedade de testar um grande número de padrões, bem como diferentes metodologias analíticas.

Este problema, crucial em países em desenvolvimento como o Brasil, também é de escala mundial, pois, embora as limitações possam ser superadas nos países de Primeiro Mundo, os custos permanecem muito elevados. Como exemplo, destacamos o relatório da U. S. Food and Drug Administration (Roy, Wilson & Laski, 1997), que mostra os resultados e os custos de uma avaliação estatística da contaminação por mais de 300 agrotóxicos em amostras de maçã e de arroz, envolvendo diversos laboratórios especializados. Nesse estudo, foram processadas 3.041

amostras ao custo total de US\$ 3.400.000,00, ou seja, US\$ 1.118,00, em média, por amostra. No Brasil, exatamente devido aos altos custos, não existe um programa continuado e amplo voltado ao monitoramento de agrotóxicos no ambiente ou em alimentos, especialmente aqueles dirigidos ao consumo interno.

As análises dos resíduos são classicamente executadas em sistemas de cromatografia gasosa ou líquida, que exigem diferentes tipos de detectores, dependendo da natureza química dos compostos a serem determinados. Requerem inicialmente procedimentos eficientes de extração, limpeza e concentração do analito, tais como extração em fase líquida-líquida, em fluido supercrítico ou em fase sólida (Font et al., 1993). Métodos de multirresíduos (MRMs) e de resíduos simples (SRMs) consistem geralmente nos mesmos passos básicos, mas os MRMs têm a capacidade de determinar diferentes resíduos de agrotóxicos em uma só análise, sendo úteis, sobretudo, quando não é conhecida a natureza dos possíveis contaminantes.

A detecção de muitos agrotóxicos em frutas e hortaliças envolve inicialmente uma extração aquosa em acetona e processos laboriosos de limpeza. Os métodos geralmente aplicam um passo de extração com um solvente miscível em água, seguido de uma etapa de limpeza, com um solvente orgânico adequado, para a remoção de interferências (Torres, Picó & Manes, 1996). A extração líquido-líquido é uma técnica na qual uma solução (geralmente aquosa) é posta em contato com um segundo solvente (usualmente orgânico, essencialmente imiscível com o primeiro). É aplicável a materiais no nível de traço, bem como a grandes quantidades de material. A extração por solvente pode ser usada para purificar e concentrar parcialmente os solutos de interesse, antes da análise (Jeffery et al., 1992). Métodos modernos que substituem a extração clássica com solventes têm sido propostos. Porém, raramente têm sido aplicados como rotina devido aos altos custos envolvidos, como, por exemplo, a extração em fluido supercrítico (SFE) (Lehotay et al., 1995).

A cromatografia gasosa tem sido a técnica instrumental mais empregada para analisar multirresíduos de agrotóxicos em amostras ambientais e alimentos (Pylypiw Jr., 1993; Lacorte, Molina & Barceló, 1993). Dentre os diversos tipos de detectores usados, destaca-se o espectrômetro de massa, capaz de identificar os compostos por sua

estrutura molecular. No entanto, para a quantificação, todos dependem da existência de padrões adequados das substâncias que estão sendo analisadas.

A extração com solvente acoplada à cromatografia preparativa e a cromatografia gasosa com vários detectores são alguns exemplos de métodos recomendados pelas principais agências de proteção ambiental. Entretanto, as limitações impostas por tais métodos aumentam significativamente o tempo e o custo das análises (Pylypiw Jr., 1993).

Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise de resíduos de agrotóxicos foram primeiramente desenvolvidos para compostos termolábeis, como os carbamatos, embora a aplicação na análise de formulações de agrotóxicos organofosforados já tivesse sido recomendada como ação oficial (Jackson, 1978). Esta aplicação tem se apresentado versátil, específica e sensível para análise de agrotóxicos organofosforados, já que não se confronta com problemas de degradação destes compostos em temperaturas elevadas. Posteriormente, estendeu-se por um largo número de compostos, por oferecer uma abordagem mais simples e/ou mais rápida. Todavia, a HPLC também apresenta desvantagens, pois, além da complexidade, o custo das análises também é considerável.

Métodos alternativos

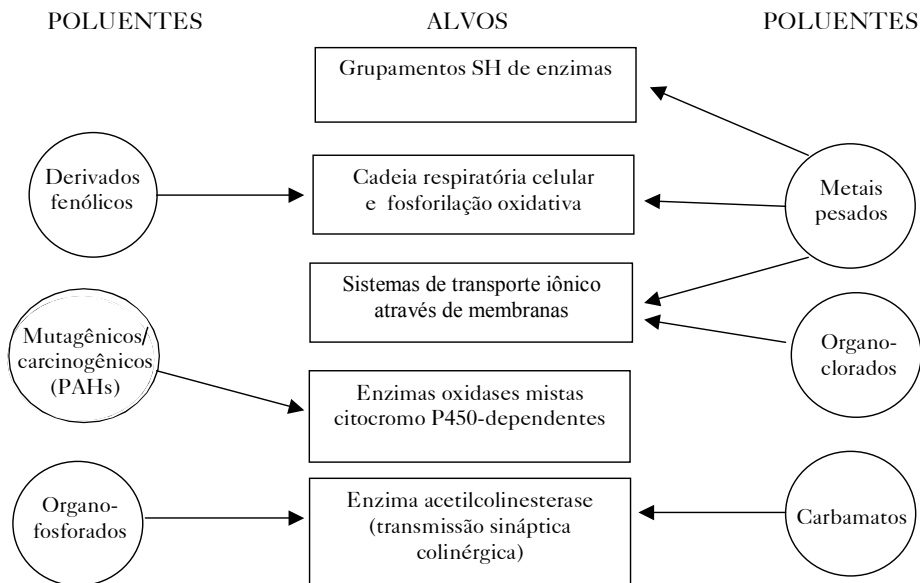
Em função do crescimento da demanda, existe hoje uma grande necessidade de aumentar a capacidade analítica, especialmente de métodos simples, de baixo custo, de resposta rápida e adequados ao uso no campo (Ellis, 1989). Eles poderiam ser usados, pelo menos, como métodos de triagem, detectando amostras positivas e facilitando grandemente o trabalho de análise instrumental. Alguns biodetectores podem prestar-se especialmente para este fim.

Diversos tipos de bioensaios *in vivo*, usando pequenos animais, estão disponíveis. No entanto, tais ensaios não são adequados – dentre outras razões, devido à sua pouca sensibilidade, às exigências de um bom método de monitoramento de agrotóxicos em amostras ambientais e de alimentos. Um método alternativo eficiente deve satisfazer a algumas condições essenciais:

- 1) detectar na amostra uma classe de tóxicos, com sensibilidade ajustável às necessidades do monitoramento (exemplo: o nível admissível de agrotóxicos é, no mínimo, 20 vezes menor para água do que para alimentos);
- 2) ser rápido nas respostas, confiável e reprodutível;
- 3) apresentar baixos custos;
- 4) depender de equipamentos básicos que podem ser usados em pequenos laboratórios.

Nesse sentido, são bastante promissores os métodos *in vitro*, que exploram as alterações das propriedades dos ‘alvos’ bioquímicos dos xenobióticos. A Figura 1 esquematiza alguns alvos importantes (enzimas e complexos enzimáticos) de diversos xenobióticos encontrados no ambiente ou em alimentos.

Figura 1 – Principais alvos bioquímicos de poluentes importantes



Em relação aos agrotóxicos pertencentes às classes de organofosforados e carbamatos, já têm sido descritos métodos que empregam a acetilcolinesterase como detectora para amostras de água. Limites de detecção de 10 ppb para certos agrotóxicos organofosforados em água foram obtidos por Kumaran & Tran-Mih (1992) com a acetilcolinesterase imobilizada em esferas de vidro, usando detecção amperométrica. Com sistema semelhante, La Rosa et al. (1994) obtiveram limites de 1 ppb e 2 ppb para paraoxon e carbaril, respectivamente. Smith, Thomas & Hulse (1993) usaram uma técnica de reativação térmica para análise de colinesterase cerebral de pássaros. Tais metodologias para uso *in vitro* sofrem, porém, uma grave limitação: não são capazes de detectar os tionofosforados, como o paration, o malation, o fenitrothion etc., ou seja, os fosforados de uso mais comum na agricultura. Estes, para inibirem a colinesterase, necessitam ser previamente ativados aos seus oxon-análogos, o que, normalmente, ocorre após a penetração no organismo. No entanto, a partir da década de 1980, nosso laboratório – atualmente denominado Laboratório de Toxicologia Enzimática (Enzitox) do Departamento de Biologia Celular e Genética do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – desenvolveu metodologia para água e alimentos baseada em preparações de acetilcolinesterase capazes de ativar os tionofosforados, possibilitando o uso irrestrito da enzima no monitoramento de todos os fosforados e carbamatos, como será comentado adiante.

Para a detecção de agentes mutagênicos/carcinogênicos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, estão disponíveis diversas metodologias, baseadas na indução de enzimas oxidases mistas P450-dependentes ou na ativação dos pré-carcinogênicos por estas enzimas. No monitoramento de substâncias inibidoras respiratórias ou desacopladoras da fosforilação oxidativa, onde se incluem também alguns agrotóxicos, é bastante promissor o desenvolvimento de sistemas *in vitro* baseados no consumo de nítrito por partículas respiratórias extraídas de nitrobactérias.

Por fim, técnicas imunológicas de enzima-imunoensaio (Elisa) têm sido empregadas sob a forma de *kits* (Vanderlaan, Watkins & Stanker, 1988), especialmente para agrotóxicos. No entanto, apesar de serem descritas como testes de *screening* rápido para detecção em água e solo, sofrem

interferências de materiais extraídos dos alimentos (Ellis, 1989) e detectam apenas os poucos agrotóxicos para os quais já estão disponíveis anticorpos específicos. Contudo, tais métodos imunológicos apresentam, sem dúvida, uma grande possibilidade de desenvolvimento a médio prazo.

UM EXEMPLO DE TESTE PARA O MONITORAMENTO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

Breve histórico

A partir de 1980, foi desenvolvido um projeto, estabelecido entre a Feema e a Uerj, com apoio financeiro do extinto BNH, intitulado “Biodetecção de Tóxicos em Sistemas de Captação de Águas Fluviais para Abastecimento Público”. Foi, então, equacionada, testada, adaptada e padronizada a técnica enzimática para a detecção, na água, de agrotóxicos organosforados e carbamatos com a enzima acetilcolinesterase extraída do cérebro de ratos. Tal metodologia apresentou toda a potencialidade para atingir os objetivos desejados.

Iniciando-se em 1992, em convênio com a Universidade da Califórnia, sob os auspícios da Mac Arthur Foundation, a metodologia enzimática para água passou a ser usada pelo Servicio de Salud San Felipe Los Andes, no Vale do Aconcagua, no Chile, uma das regiões chilenas de maior produção de frutas de exportação. Em virtude do interesse despertado pelo trabalho, obteve-se apoio do próprio convênio com a Universidade da Califórnia – Fundação Mac Arthur para adaptação da metodologia ao uso em frutas e em outros produtos agrícolas.

No Brasil, em 1998, por solicitação da Comissão de Meio Ambiente da Assembléia Legislativa do Rio de Janeiro (Alerj), foram feitas análises de produtos agrícolas comercializados pela Ceasa-RJ. A metodologia foi também usada, em 2002, como triagem prévia para análise cromatográfica (HPLC) em mais de 900 amostras de 37 produtos agrícolas distribuídos pela Ceasa-RJ, em cumprimento a um convênio estabelecido com a Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro (Semads).

Durante esse período, as bases metodológicas foram amplamente discutidas em congressos e conferências especializados, no Brasil e no exterior, em teses de doutorado e mestrado, bem como em trabalhos publicados em revistas científicas internacionais.

Fundamentos e propriedades da metodologia

As principais propriedades da preparação de acetilcolinesterase de cérebro de ratos usada com esta finalidade são: 1) a enzima é diretamente inibida por agrotóxicos oxofosfatos e carbamatos; 2) a preparação é capaz de ativar, após simples incubação, os tionofosfatos (fosforados mais freqüentemente usados na agricultura). Tais agrotóxicos, que são fracos inibidores da colinesterase, precisam ser ativados a seus oxofosfatos após penetração no organismo, através, principalmente, do sistema de oxidases mistas (dependentes de citocromo P450), encontrado no fígado e em outros órgãos de mamíferos e de outros animais. A propriedade 'ativadora' da preparação enzimática de cérebro de ratos, ao contrário do que se constata quanto ao sistema de oxidases mistas, é extremamente estável e independente de mecanismos oxidativos.

Os fundamentos básicos que possibilitaram o desenvolvimento desta metodologia encontram-se em publicação de nosso laboratório (Cunha Bastos et al., 1991). Os aspectos da ativação de tionofosfatos por preparação de cérebro de ratos, importantes para a eficiência da técnica, são avaliados em outra publicação nossa (Lima et al., 1996).

É importante enfatizar que, nesta técnica, seja qual for o agrotóxico inibidor presente, o resultado é expresso em equivalentes de metil paration (fosforado escolhido como referência), o que atende à legislação brasileira, que define a qualidade da água conforme seus diversos usos. Assim, apenas é necessário construir uma curva padrão de inibição por metil paration, sendo os resultados de inibição de amostras desconhecidas interpolados nesta curva e expressos em ppm ou ppb de equivalentes de metil paration. Atualmente, o teste é baseado em kit de dosagem colorimétrica que contém a preparação enzimática padronizada, o substrato e o reagente da cor.

Especificidade do teste

É extremamente improvável, especialmente após o processo extrativo das amostras, encontrar interferentes que não sejam inibidores específicos da acetilcolinesterase.

Considerando-se situações especiais, é preciso alertar que existem compostos sintéticos extremamente tóxicos, usados como gases de guerra ('gases dos nervos'), como o DIFP, o sarin, o tabun, o soman e o VX, cujos mecanismos de ação são os mesmos (inibidores potentes de acetilcolinesterase). Existem relatos de seu uso não só em conflitos recentes, mas também em atentados terroristas. Na realidade, o desenvolvimento da síntese de agrotóxicos organofosforados baseou-se, exatamente, naqueles compostos. Note-se, também, que existem alguns organofosforados naturais, estruturalmente similares a agrotóxicos, que são toxinas produzidas por algumas bactérias e algas (algas azuis). Por outro lado, existem substâncias naturais produzidas por certos vegetais, que, de fato, serviram como modelo para a síntese de agrotóxicos da classe dos carbamatos. Como exemplo, a fisostigmina, extraída do feijão calabar (*Physostigma venenosum*).

Etapas da metodologia

Extração para amostras de água

Considerando o nível de detecção de 10 ppb em equivalentes de paration (limite de tolerância para organofosforados e carbamatos totais para águas de abastecimento público – Resolução Conama 20 de 1986), são necessárias a extração e concentração da amostra. Qualquer método clássico de extração com solventes orgânicos (para multirresíduos) pode ser aplicável. A seguir, estão descritos dois métodos de extração exaustivamente testados e que apresentam boa recuperação de grande número de fosforados e carbamatos:

1) Método de acetato de etila – sulfato de sódio

É um método para extração de multirresíduos usado em monitoramento de alimentos na Suécia desde 1989 e que em nossas mãos mos-

trou uma boa recuperação de fosforados e carbamatos em geral, inclusive daqueles mais polares, como o metamidofós, muito empregado na agricultura e que não é eficientemente recuperado pelo processo clássico de extração por acetona.

Etapas:

- Em tubo de ensaio de vidro com tampa esmerilhada (ou de material plástico resistente a solventes) com capacidade de 40-50 ml, colocar 7 ml de amostra a testar ou 7 ml de água destilada (controle) ou 7 ml de solução padrão (em água) de concentração adequada de metil paration (ver preparação de padrões de metil paration adiante).
- Adicionar, aproximadamente, 6 g de sulfato de sódio e agitar bem por dois minutos. A seguir, juntar 14 ml de acetato de etila (grau HPLC ou superior). É necessário que este solvente seja de alta pureza.
- Fechar o tubo e agitar fortemente à mão ou em agitador de tubos do tipo Vortex durante pelo menos um minuto. Colocar em repouso e esperar a separação das fases.
- Coletar exatamente 10 ml da fase superior (acetato de etila), que corresponde ao extrato de 5 ml de amostra, em tubos de ensaio com capacidade de pelo menos 20 ml e evaporá-la completamente em corrente de ar ou nitrogênio, em banho-maria. Embora para a maioria dos agrotóxicos destas classes a temperatura do banho possa ser elevada até 50-56°C sem problemas, para uma boa recuperação do metamidofós é necessário bastante cuidado, mantendo temperaturas nunca superiores a 40°C. Nunca exponha desnecessariamente o resíduo a temperaturas superiores à ambiente. Para ótimos resultados, completar o processo de evaporação à temperatura ambiente, em corrente de ar ou nitrogênio.

2) Método do diclorometano

É um processo extremamente eficiente na extração de todos os fosforados e carbamatos, menos daqueles muito polares (metamidofós, acefato).

Etapas:

- Em tubo de ensaio (do tipo citado anteriormente), colocar 10 ml de amostra desconhecida de água, água controle ou padrão adequado de metil paration e acrescentar 10 ml de diclorometano (P.A.). Agitar bem (como descrição anterior) e esperar a separação de fases.
- Tomar alíquota de 5 ml da fase diclorometano (inferior), que corresponde ao extrato de 5 ml de amostra. Evaporar completamente o solvente em corrente de ar ou nitrogênio em banho-maria a até 56°C.

3) Método misto

Se for de interesse, pode-se iniciar a extração pelo diclorometano. Da fase aquosa formada nesta etapa, tomar 7 ml e extrair pelo processo acetato de etila – sulfato de sódio. Dessa forma, pode-se identificar, separadamente, a presença daqueles fosforados mais polares, como o metamidofós (freqüentemente usado na agricultura).

Extração para amostras de alimentos

O método mais indicado é o da extração por diclorometano, pois permitirá a separação dos agrotóxicos em seis grupos diferentes, como mostrado adiante.

- Homogeneizar a amostra (500 g a 1.000 g) em sua própria água, preferencialmente em multiprocessador de alimentos (normalmente usados em culinária). Ajustar o pH a aproximadamente 7,3-7,5 com NaOH ou HCl diluídos, conforme o caso.
- Tomar alíquota de 5 g do homogeneizado em tubos fechados de cerca de 20 ml de capacidade e adicionar 0,05 ml do detergente Triton X-100®.
- Adicionar 5 ml de diclorometano, agitar fortemente por pelo menos dois minutos e centrifugar a cerca de 2.000 rpm por dez minutos, para a perfeita separação das fases;
- Coletar 2 ml da fase diclorometano (inferior) em pequenos tubos de ensaio e, pelo menos, 1 ml da fase aquosa (superior) em

outros tubos (para avaliação de organofosforados e carbamatos hidrofílicos).

- Evaporar o diclorometano como descrito anteriormente.

Dosagem enzimática por método colorimétrico

A técnica apresentada é uma modificação do método colorimétrico clássico de Ellman:

- Aos tubos que contêm os resíduos de evaporação do solvente (acetato de etila ou diclorometano), correspondendo a 5 ml de amostra inicial de água, adicionar 0,25 ml da preparação enzimática convenientemente diluída (conforme indicado no rótulo do frasco de preparação enzimática).
- Para resíduos de extratos de diclorometano de alimentos (que correspondem a 2 g de amostra inicial), adicionar 0,5 ml de solução de Triton X-100 a 4% e agitar bem. Filtrar em seringa de 1 a 3 ml de capacidade através de camada de lã de vidro. Tomar 0,25 ml do filtrado (correspondendo a 1 g de amostra inicial) e adicionar 0,25 ml da preparação enzimática diluída conforme já mencionado.
- Para extratos aquosos de alimentos, tomar 0,5 ml da fase aquosa e adicionar 0,5 ml de preparação enzimática (a mesma diluição referida). Se necessário, fazer extração prévia com acetato de etila, como descrito anteriormente (método misto de extração).
- Agitar fortemente. A preparação enzimática já contém tampão para manutenção do pH ótimo e o detergente não iônico Triton X-100 em proporções adequadas para manter solubilizado o resíduo de agrotóxico presente.
- Incubar durante 120 minutos a 37°C. Esta incubação permite a ativação completa de quaisquer tionofosforados, transformando-os em potentes inibidores da acetilcolinesterase. Para carbamatos, a inibição completa da enzima se dá num período de incubação de apenas 30 minutos. Dessa forma, para efeito de identificação de grupos de agrotóxicos, podem-se fazer incubações da mesma amostra em 30 e 120 minutos.

- Tomar em tubo de ensaio com capacidade de 5 ml exatamente 50 µl da preparação incubada.
- Adicionar 0,5 ml da solução do reagente de cor ditionitrobenzoato (DTNB).
- Adicionar, a seguir, 0,5 ml de solução do substrato da enzima (acetilcolina). Imediatamente, misturar e transferir para cubeta ou tubo de espectrofotômetro ou fotocolorímetro. Colocar a cubeta no aparelho e zerar a absorvância (a 412 nm) contra um 'branco' de água destilada. Medir o acréscimo de absorvância (densidade ótica) a cada minuto, durante, pelo menos, três minutos. Usar um cronômetro se o aparelho não dispuser de um módulo cinético automático. O acréscimo da absorvância deve ser linear em função do tempo. Calcular a média de acréscimo de absorvância por minuto. Este valor determinado para o controle (extrato de água destilada) corresponderá a 100% da atividade enzimática. Determina-se este mesmo acréscimo para as amostras desconhecidas ou padrões adequados de metil paration, calculando-se facilmente a percentagem de inibição de cada amostra ou padrão em relação ao controle. Interpolando os resultados de percentagem de inibição das amostras na curva padrão de metil paration (Figuras 2 e 3) e expressar os resultados em ppb ou ppm de equivalentes em metil paration, conforme o caso. Para fins práticos de rotina, é necessário fazer apenas um padrão correspondente a 10 ppb de metil paration (para amostras de água), pois este é o limite que deve definir se a amostra está dentro ou fora das especificações. Estes padrões devem ser extraídos da mesma forma que as amostras de água. Para alimentos, quer para extratos de diclorometano ou fase aquosa, fazer padrões de 0,1 e/ou 0,2 ppm. Os padrões devem ser extraídos simultaneamente com as amostras no caso da fase diclorometano de alimentos (3 ml da solução padrão com 3 ml de diclorometano, tomando-se 1 ml da fase diclorometano para evaporação). No caso da fase aquosa de alimentos, tomar diretamente 0,5 ml do padrão adequado (0,1-0,2 ppm).

Material necessário

Além da vidraria já indicada, os seguintes equipamentos são necessários:

- Pequena bomba de ar ou cilindro de ar comprimido ou nitrogênio (para evaporação do solvente);
- Agitador de tubos (opcional);
- Banho-maria termostatizado (temperatura de trabalho entre 37-56°C);
- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro (comprimento de onda usado: 410-412 nm);
- Cronômetro, caso o aparelho acima não disponha de módulo cinético.

Composição do kit

- Frasco com preparação de acetilcolinesterase, contendo tampão, detergente e conservante. Liofilizado. Suspender em volume de água destilada, como indicado no rótulo;
- Frasco com reagente de cor tamponado;
- Frasco com substrato (dessecado, sob vácuo ou atmosfera de nitrogênio). Dissolver no volume de água destilada indicado no rótulo.

Notas:

- 1) a enzima é preparada por extração com Triton X-100 do sedimento após centrifugação de homogeneizados de cérebro de ratos;
- 2) após suspensão da enzima, tomar alíquotas em frascos separados e guardar em *freezer*. Descongelar à medida das necessidades. A validade da enzima liofilizada é superior a seis meses e, após suspensão, por pelo menos quatro meses (sob refrigeração);
- 3) o substrato deve ser guardado em *freezer*. Após dissolução, alíquotá-lo e mantê-lo congelado, descongelando apenas as alíquotas para uso imediato. A vida útil do substrato suspenso e congelado é de cerca de quatro meses;

- 4) o reativo de cor é estável à temperatura ambiente. A durabilidade é indefinida.

Figura 2 – Curva padrão de metilparation para amostras de água

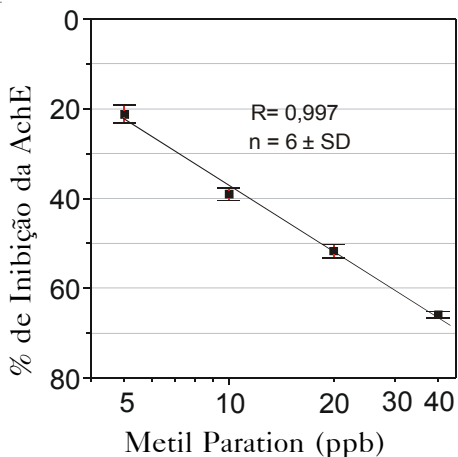
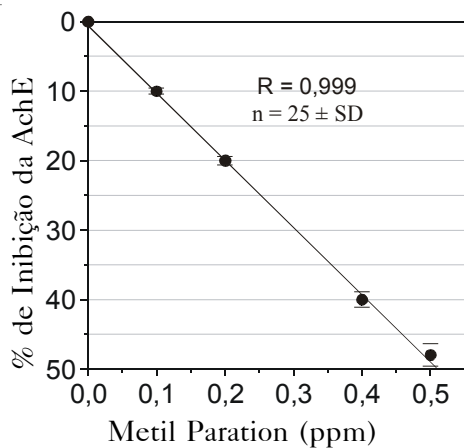


Figura 3 – Curva padrão de metilparation para amostras de alimentos



Divisão de fosforados e carbamatos em grupos com emprego do método enzimático

Utilizando-se ainda o teste enzimático, a quase totalidade dos fosforados e carbamatos registrados para uso em agropecuária pode ser dividida em cinco grupos, com base em três parâmetros simples: extração por diclorometano, sensibilidade à hidrólise alcalina e necessidade de ativação (inibidores diretos ou não da colinesterase), como mostrado na Figura 4. Três deles podem, na realidade, ser identificados diretamente: o metamidofós, o acefato e o pirimicarb. Este procedimento pode facilitar enormemente a identificação cromatográfica do agrotóxico contaminante.

Figura 4 – Divisão de organofosforados e carbamatos em cinco diferentes grupos, baseada em propriedades de solubilidade, necessidade de ativação e sensibilidade à hidrólise alcalina

CARACTERÍSTICAS DE FOSFORADOS E CARBAMATOS		* TRATAMENTO COM DICLOROMETANO	
TRATAMENTO COM DICLOROMETANO (1:1) *	FASE DICLOROMETANO	GRUPO 1 Carbamatos: Aldicarb, Carbaril, Carbofuran, Metomil, Propoxur	NECESSIDADE DE ATIVAÇÃO ***
	FASE AQUOSA	GRUPO 2 Carbamato: Pirimicarb	
	GRUPO 3 Fosforados: Clorpirifós, Dimetoato, Dissulfoton, Etion, Fenitroton, Fention, Forato, Malation, Metil Paration, Pirazofós, Piridafention, , Diclorvos, Triclorfon (20-25% f. DCM)	GRUPO 4 Fosforados: Diazinon, Monocrotofós	
		GRUPO 5 Fosforados: <u>Metamidofós</u> (+ de 85% degradado em álcali), <u>Acefato</u> (≈ 50% degradado em álcali), <u>Triclorfon</u> (75-80% f.aquosa)	
		SIM	NÃO
SENSIBILIDADE À HIDRÓLISE ALCALINA**		SIM	NÃO

**** TRATAMENTO COM DICLOROMETANO**
 Proporção entre amostra e diclorometano 1:1 (V/V)

**** SENSIBILIDADE À HIDRÓLISE ALCALINA**

a) Alíquota de amostra que iniba de 30 a 60% a enzima é alcalinizada com sol. de NaOH até pH 11-12 (caso a inibição seja superior a 60%, diluir convenientemente a amostra);
 b) Conservar *overnight* em refrigerador (8-10°C);
 c) Neutralizar (em torno de pH 7,0) com sol. de HCl;
 d) Submeter a amostra tratada ao teste enzimático (pré - incubação de 120 min), juntamente com uma alíquota da amostra não alcalinizada, mas submetida às mesmas diluições da amostra alcalinizada (controle).

SIM – Perda de, no mínimo, 50% da capacidade de inibição da enzima após tratamento alcalino.
 NÃO – Nenhuma ou pequena perda da capacidade de inibição da enzima após tratamento alcalino.

***** NECESSIDADE DE ATIVAÇÃO**

A amostra é pré-incubada (37C) com a enzima por 30 min e por 120 min.

SIM – A % de inibição em relação ao controle (sem amostra) após 120min de pré-incubação é duas ou mais vezes superior a da obtida com pré-incubação de 30 min.
 NÃO – A % de inibição em relação ao controle (sem amostra) após 120 min de pré - incubação é igual ou ligeiramente superior a da obtida com pré - incubação de 30 min.

Características da metodologia

A seguir, estão relacionadas características importantes da resposta do *kit* enzimático quando utilizado dentro das condições de extração e dosagem definidas nos itens anteriores.

Curvas de inibição do kit de acetilcolinesterase para diversos organofosforados e carbamatos importantes

A Figura 5 mostra as curvas de inibição dos diversos agrotóxicos, quer seja usada a fase diclorometano ou a aquosa, após adição de concentrações conhecidas do agrotóxico a testar a homogêneos de frutas e hortaliças isentos de contaminação prévia, bem como as concentrações que inibem 20% a preparação da enzima, sempre nas condições metodológicas de rotina. Como é usada uma preparação enzimática padronizada para o metil paration, a concentração de qualquer agrotóxico organofosforado ou carbamato (dentro os testados) que contamina uma amostra pode, inclusive, ser calculada com razoável precisão, desde que o resultado seja obtido em equivalentes de metil paration para amostra e desde que o composto contaminante seja identificado. Para isto, pode-se aplicar a seguinte fórmula, construída a partir dos dados mostrados na Figura 5:

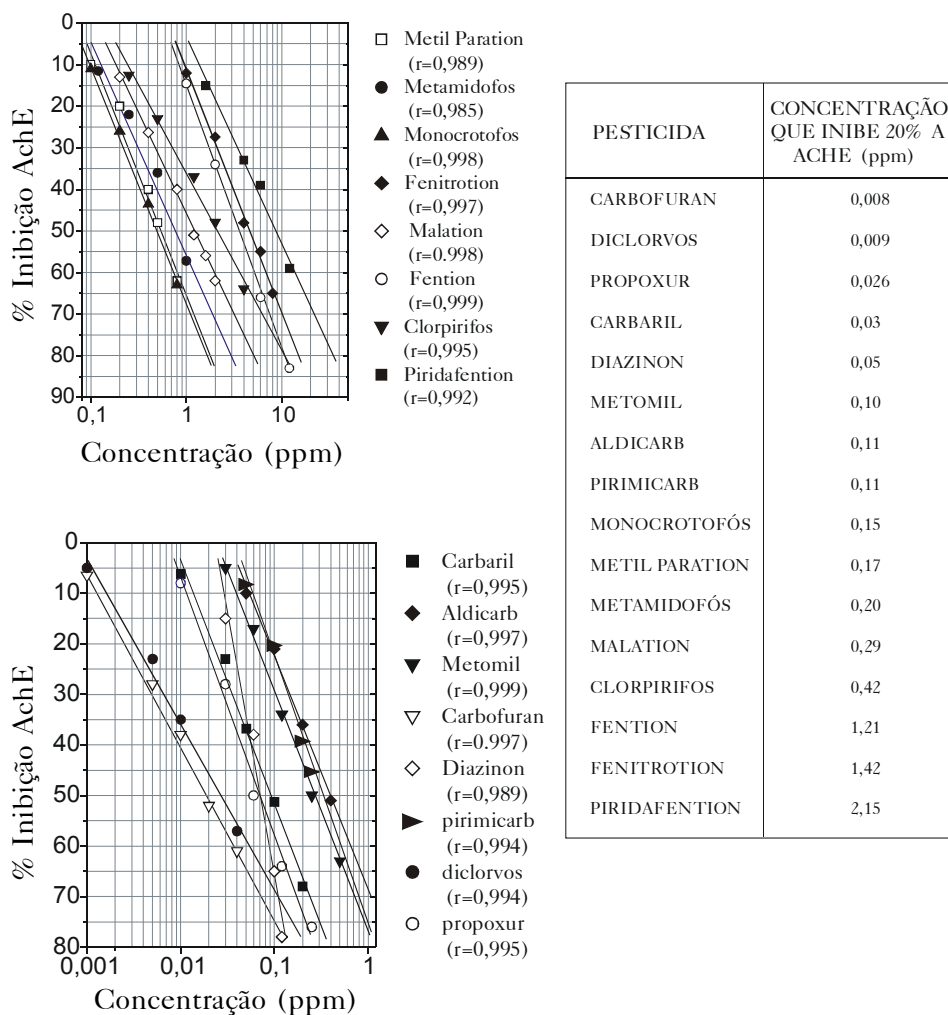
$$C_x = 10^{(B_p \times \log E_p + A_p - A_x) / B_x}$$

onde:

C_x = concentração em ppm do agrotóxico X ; B_p = coeficiente angular da reta padrão de metil paration; B_x = coeficiente angular da reta do agrotóxico X; A_p = afastamento da reta padrão de metil paration; A_x = afastamento da reta do agrotóxico X; E_p = equivalentes em metil paration (em ppm).

Os valores obtidos para os coeficientes angulares (B) e afastamentos (A) das retas correspondentes aos diversos organofosforados e carbamatos testados estão relacionados na Tabela 1.

Figura 5 – Curvas de inibição do kit de acetilcolinesterase (AChE) por diversos organofosforados e carbamatos



Obs: Cada ponto representa a média de, pelo menos, quatro diferentes determinações. O maior coeficiente de variação obtido foi de 12%. Com exceção do fosforado metamidofós, testado diretamente na fase aquosa, os demais foram determinados na fase de diclorometano, conforme metodologias descritas no texto.

Tabela 1 – Parâmetros das curvas de inibição do *kit* de acetilcolinesterase por diversos organofosforados e carbamatos

Agrotóxico	A*	B*
Carbofuran	108,9	34,53
Carbaril	99,74	48,04
Aldicarb	63,61	44,8
Metomil	78,24	48,64
Diazinon	169,37	103,2
Metil paration	65,28	58,68
Metamidofós	54,12	49,22
Monocrotofos	67,53	57,67
Malation	46,36	49,02
Fenitrotrion	11,3	58,42
Fention	14,81	64,06
Clorpirifos	36,23	42,29
Piridafention	3,71	49,24
Pirimicarb	76,31	53,65
Diclorvos	100,85	32,58
Propoxur	108,5	50,5

* A – afastamento; B – coeficiente angular das retas mostradas na Figura 5.

Análises enzimáticas pareadas à cromatografia

Para comparar o método enzimático com um método cromatográfico, foram adicionadas, a homogêneos de frutas e hortaliças previamente testados quanto à inexistência de inibidores da colinesterase, diversas preparações comerciais de organofosforados ou carbamatos em várias diluições. Os extratos foram analisados por meio do *kit* enzimático, e as concentrações dos agrotóxicos testados foram calculadas com base nas respectivas curvas de inibição padrão. Na análise por cromatografia de alta performance (HPLC), foram usados padrões internos. Para isto, foram adicionadas, a alíquotas dos mesmos homogêneos já fortificados, concentrações conhecidas de padrões cromatográficos de organofosforados ou carbamatos cujas características de solubilidade eram similares às dos que estavam em estudo. Após a extração, o resíduo de 10 ml da fase de diclorometano foi suspenso em 1,0 ml de acetonitrila:água (3:1) e centrifugado para remoção do material insolúvel. Uma alíquota

deste sobrenadante foi injetada em coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a aparelho Varian, e as proporções dos componentes da fase móvel (acetonitrila:água), quer em sistema isocrático quer em gradiente, foram escolhidas de acordo com as características dos compostos a serem separados. A detecção foi feita em ultravioleta a 222 nm. Para os cálculos, usou-se o programa ProStar Varian, sendo feitas as devidas correções para os diferentes coeficientes de extinção molar, neste comprimento de onda, dos compostos em questão. A Tabela 2 mostra a comparação das metodologias para alguns organofosforados e carbamatos importantes, indicando a coerência dos resultados encontrados pelas duas técnicas.

Tabela 2 – Comparação das metodologias enzimática e cromatográfica na análise de contaminação de homogêneos de hortaliças e frutas por organofosforados e carbamatos

Nº da Amostra	Produto comercial*	Princípio Ativo	Método Enzimático** (ppm)	Método Cromatográfico** (ppm)
1	Folidol	Metil paration	27,5	28,7
2	Folidol	Metil paration	0,56	0,53
3	Sumithion	Fenitrothion	1,6	1,4
4	Malatol	Malation	8,5	7,9
5	Sevin	Carbaril	0,22	0,19
6	Sevin	Carbaril	9,3	9,8
7	Furadan	Carbofuran	0,11	0,13
8	Pirimor	Pirimicarb	2,2	2,0
9	Lannate	Metomil	0,33	0,37

* Foram usadas diluições destes produtos comerciais para contaminar os homogêneos de hortaliças e frutas. Os detalhes técnicos estão descritos no texto.

** Os resultados são médias de experimentos em duplicata.

UM MODELO DE MONITORAMENTO COM USO DO TESTE ENZIMÁTICO NA TRIAGEM PRÉVIA DAS AMOSTRAS

Resumem-se, aqui, as estratégias usadas e os resultados obtidos no monitoramento da contaminação de hortaliças e frutas comercializadas pela Ceasa, na cidade do Rio de Janeiro, em 2001, por resíduos de agrotóxicos organofosforados e carbamatos. Este projeto, denominado ‘Avaliação de Resíduos de Agrotóxicos em Olerícolas Consumidas pela

População do Estado do Rio de Janeiro', teve suporte financeiro da Fundação Estadual de Controle Ambiental (Fecam), sendo objeto de convênio entre a Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro (Semads) e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Uerj). Sua execução coube ao Laboratório de Toxicologia Enzimática – Enzitox – do Departamento de Biologia Celular e Genética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (Ibrag) da Uerj.

Metodologias e estratégias utilizadas

Kit enzimático de acetilcolinesterase

A técnica utilizada foi a anteriormente descrita para análises de alimentos, sendo os contaminantes porventura encontrados subdivididos em grupos de acordo com as propriedades de solubilidade, ativação e sensibilidade à alcalinidade, no intuito de facilitar o trabalho cromatográfico posterior.

Método cromatográfico – cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A extração de homogeneizados de amostras previamente selecionados pelo *kit* de acetilcolinesterase foi feita de modo semelhante ao usado para o teste enzimático. Devido, porém, à necessidade de maior concentração dos resíduos no extrato final, usou-se uma quantidade maior de homogeneizado (30 g), sendo evaporadas alíquotas de 20 ml do extrato de diclorometano. Alíquotas do mesmo homogeneizado eram também fortificadas, antes da extração, com concentrações conhecidas de padrões dos prováveis organofosforados ou carbamatos que poderiam ser encontrados, de acordo com a catalogação prévia feita por teste enzimático.

Caso, no teste enzimático, o agrotóxico fosse encontrado apenas na fase aquosa (o que ocorre com o fosforado metamidofós), 20 ml desta fase eram extraídos por acetato de etila – sulfato de sódio, conforme anteriormente descrito para amostras de água. Alíquotas iguais do mes-

mo homogeneizado eram também fortificadas por concentrações conhecidas do mesmo agrotóxico.

Os padrões cromatográficos de agrotóxicos organofosforados e carbamatos utilizados durante este estudo foram os de: aldicarb, carbaril, carbofuran, diazinon, diclorvos, dimetoato, etion, fenitrothion, fention, forato, malation, metamidofós, metil paration, metomil, monocrotofos, propoxur, pirimicarb, triclofon. No entanto, nem todos estavam disponíveis durante todo o período do projeto.

Para clarificação do extrato de diclorometano, o resíduo, após evaporação do solvente, era dissolvido em 0,75 ml de acetonitrila, sendo, a seguir, adicionado 0,25 ml de água. O extrato era transferido para tubo Eppendorf, e o sedimento formado removido por centrifugação a 5.000x g, por dez minutos. Após filtragem do sobrenadante em poro de 45 μ , alíquotas de 25 μ l eram injetadas na coluna.

Para a fase aquosa, após extração com acetato de etila – sulfato de sódio, o resíduo de evaporação do solvente era redissolvido em 1 ml de acetonitrila:água (1:1), filtrado em 45 μ , e injetado na coluna (25 μ l).

Foram usadas colunas C-18 (Varian 250 x 4,6 mm, 5 μ m) acopladas a aparelho Varian composto por duas bombas e detector de UV, ajustado no comprimento de onda de 222 nm. Os sinais do detector foram transmitidos a um computador Pentium 3, sendo os cromatogramas processados pelo programa ProStar Varian. A fase móvel, acetonitrila:água em diversas proporções, foi usada em sistema isocrático ou em gradiente, sendo o sistema escolhido de acordo com as características dos compostos presumidamente presentes. O fluxo foi de 0,5 a 1,5 ml/min e o tempo de corrida variável, conforme o caso. O cálculo das concentrações do agrotóxico em uma amostra foi feito por comparação da área do pico do agrotóxico em extrato de homogeneizado sem fortificação com a área do pico do extrato deste mesmo homogeneizado previamente fortificado com concentração conhecida do agrotóxico.

Coleta e tratamento geral das amostras de hortaliças e frutas

Foram coletados cerca de 1,0-1,5 kg de cada produto, apanhados aleatoriamente nas bancadas da Ceasa-RJ ou em caminhões que continssem ou desembarcavam produtos de uma mesma origem (estando iden-

tificados estado e município). Caso fossem de grande porte, como melancia, abóbora etc., eram coletados de três a quatro exemplares. As estratégias referentes a número de amostras, frequência de coletas, produtos escolhidos e suas origens foram traçadas de acordo com dados de produção e comercialização levantados junto à Emater e à Ceasa-RJ.

Transportado para o laboratório em sacos plásticos, o material era imediatamente homogeneizado em processador de alimentos e/ou liquidificador de alta rotação. A análise destes homogeneizados pelo *kit* enzimático era feita no mesmo dia da coleta.

Neste projeto, estabeleceu-se que apenas as amostras que, após análise pelo *kit* enzimático, apresentassem resíduos de organofosforados e carbamatos totais superiores a 0,2 ppm em equivalentes de metil paration seriam processadas para identificação e quantificação do(s) agrotóxico(s) presente(s) por cromatografia, caso possível. Dessa forma, as amostras selecionadas eram catalogadas, ainda pelo teste enzimático, em grupos de prováveis agrotóxicos presentes, estando este resultado pronto no dia seguinte à coleta. Neste segundo dia, os homogeneizados correspondentes, guardados congelados desde o dia anterior, eram processados para a avaliação cromatográfica, estando prontos os extratos finais, que, guardados a -20°C, eram analisados no prazo de até 10-12 dias, aproximadamente, por cromatografia líquida de alta performance.

Classificação das amostras quanto ao nível de contaminação

Entre dezembro de 2000 e novembro de 2001, foram analisadas 935 amostras de 37 diferentes produtos agrícolas comercializados pela Ceasa-RJ, sendo 50 em dezembro de 2000 e 50, 50, 62, 71, 77, 62, 114, 113, 105, 127 e 54, de janeiro a novembro de 2001, respectivamente.

As amostras foram selecionadas em dois grupos (quanto à contaminação por resíduos totais de organofosforados e carbamatos) pelo *screening* enzimático, tendo como limite divisório o valor de 0,2 ppm em equivalentes de metil paration, agrotóxico fosforado usado como referência, como descrito anteriormente. As amostras do grupo que continha resíduos superiores a 0,2 ppm em equivalentes de metil paration foram ava-

liadas por cromatografia. Dentro desta estratégia, os resultados finais de todas as análises puderam ser classificados em quatro grupos:

- 1) resíduos não detectados – amostras com ausência de contaminação pelo teste enzimático ou com presença de resíduos totais inferiores a 0,2 ppm em equivalentes de metil paration;
- 2) menores que o limite de tolerância – amostras que, após análise cromatográfica, apresentaram níveis de contaminação abaixo dos preconizados como limites máximos aceitáveis pela legislação (Agrofit – Ministério da Agricultura) para cada agrotóxico e para cada tipo de cultura;
- 3) maiores que o limite de tolerância – amostras que, após análise cromatográfica, apresentaram níveis de contaminação superior aos preconizados como aceitáveis pela legislação (Agrofit – Ministério da Agricultura);
- 4) resíduos não identificados – após análise cromatográfica de amostras positivas no teste enzimático, o agrotóxico presente não foi identificado, possivelmente porque não estavam disponíveis todos os padrões cromatográficos de organofosforados e carbamatos necessários.¹

Resultados

Produtos comercializados pela Ceasa-RJ que não apresentaram contaminação detectável por organofosforados e carbamatos durante todo o período de estudo (dezembro de 2000 – novembro de 2001)

A Tabela 3 relaciona os produtos que não apresentaram resíduos detectáveis de organofosforados e carbamatos, considerando-se o nível de detecção estabelecido, em todas as amostras coletadas e analisadas durante o projeto. Vinte dos 37 produtos estudados (54%) se enquadra-

¹ Nos meses de dezembro de 2000 e janeiro de 2001, organizou-se o plano e a estrutura de coletas. A amostragem, nesses dois meses, teve um caráter puramente exploratório, não tendo sido possível, naquele momento, definir quer prioridades de coleta, quer os municípios de origem dos produtos. Por esse motivo, os resultados desse período não foram sempre computados no conjunto de dados.

ram nesta categoria. Estes produtos englobaram 301 das 935 amostras analisadas (32%) no período dezembro de 2000 – novembro de 2001.

Tabela 3 – Produtos da Ceasa-RJ que não apresentaram níveis detectáveis de resíduos de organofosforados e carbamatos nas amostras coletadas de dezembro de 2000 a novembro de 2001*

Produto	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	Total
Abóbora	2	3	-	-	-	-	-	4	5	4	4	2	24
Aipim	-	-	-	-	-	-	-	5	4	-	-	-	9
Banana	-	-	4	-	-	-	-	-	1	3	4	2	14
Batata-doce	-	-	-	-	-	-	-	5	3	-	-	-	8
Caqui	2	3	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Cenoura	3	-	4	-	-	-	-	5	4	4	4	2	26
Chuchu	1	1	-	5	-	-	-	5	4	3	4	2	25
Couve-flor	1	-	4	3	-	2	5	-	2	4	3	2	26
Figo	-	-	-	0	1	2	-	-	-	-	-	-	3
Inhame	2	3	-	-	-	-	-	5	3	-	-	-	13
Jiló	-	-	-	-	-	-	-	5	3	-	-	-	8
Laranja	5	6	-	-	-	-	4	-	4	4	5	2	29
Limão	3	1	-	1	-	1	-	-	1	4	4	2	17
Mamão	3	3	-	4	-	-	-	-	1	4	4	2	21
Manga	-	-	-	-	2	3	-	-	1	4	4	2	16
Melancia	3	3	4	-	-	-	-	-	1	3	3	2	19
Melão	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	5
Milho	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Pepino	-	-	4	-	-	-	-	3	2	-	-	-	9
Quiabo	1	1	-	5	-	-	-	5	3	-	-	-	15
Total													301

* Os valores indicam o número de amostras de cada produto analisadas por mês e no total do período.

Quadro geral dos níveis de contaminação por organofosforados e carbamatos das 835 amostras, englobando os 37 produtos da Ceasa-RJ estudados de fevereiro a novembro de 2001

A Figura 6 apresenta os resultados globais da distribuição, dentro da classificação antes mencionada, de todos os produtos, por mês. Em média, em todo o período, 26% das amostras dos 37 produtos apresentaram contaminação, sendo que cerca de 10% com concentrações de resíduos acima dos limites de tolerância admitidos pela legislação. Há um aumento da contaminação especialmente nos meses de maio e junho, nos

quais a percentagem de amostras contaminadas atingiu 35 e 50% do total, respectivamente, estando 16% (maio) e 22% (junho) das amostras acima do limite de tolerância.

Nas 217 amostras com resíduos detectáveis, os organofosforados mais freqüentemente encontrados foram: metamidofós (15,7%), metil paration (13%) e fenitrotion (4,6%). Em relação aos carbamatos, os principais foram: carbaril (17,5%), pirimicarb (16,5%) e carbofuran (1,8%). Os resíduos não puderam ser identificados em 13,4% das 217 amostras (3,5% do total de 835 amostras analisadas).

Níveis de contaminação por organofosforados e carbamatos em amostras da Ceasa-RJ por produto analisado de fevereiro a novembro de 2001

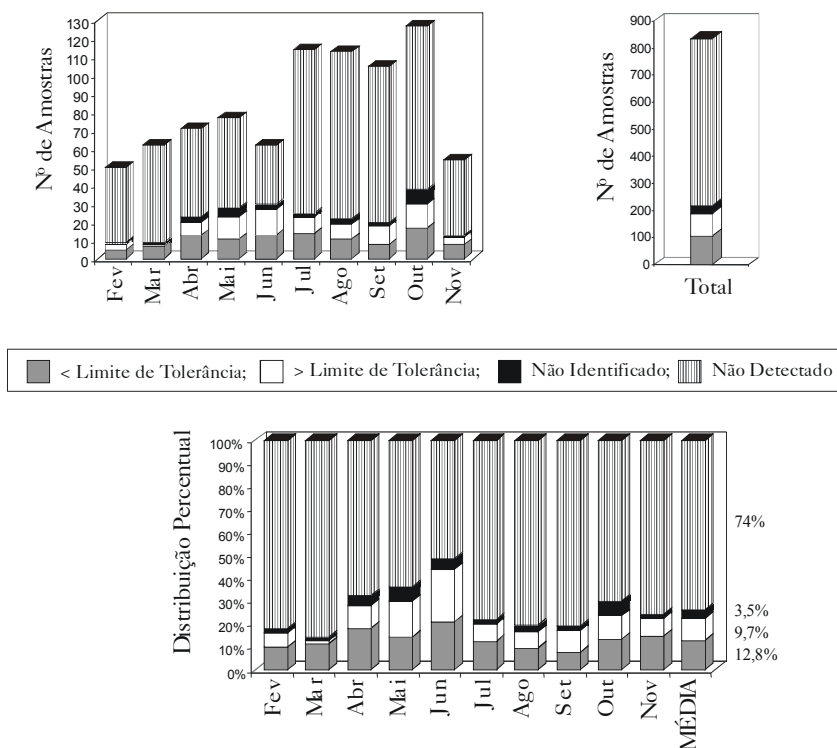
Dentre os 17 produtos que, em algum momento, apresentaram resíduos detectáveis, destacam-se: a salsa, com a média de 78% das amostras apresentando resíduos (42% do total acima da tolerância); o agrião, com 86% das amostras com resíduos (29% do total acima da tolerância). Segue-se a alface, com 45% (18% do total acima do limite), espinafre e couve (58% e 52% com resíduos, 13% e 11% acima da tolerância, respectivamente).

Dentre os tubérculos, a batata é um caso à parte. Em 46% das amostras foram detectados resíduos (27% do total acima do limite de tolerância, em alguns casos acima de 20 vezes). Das hortaliças-fruto, apenas o pimentão merece destaque, já que 35% das amostras apresentaram resíduos, sendo 10% acima da tolerância.

Em relação às frutas, destacam-se o abacaxi, o morango, a uva e a maçã, com 35%, 18%, 16% e 4% de amostras com resíduos acima do limite de tolerância, respectivamente.

Dentre os demais produtos, 5% das amostras de brócolis e 2,1% das de tomate apresentaram resíduos acima do limite, enquanto repolho, abobrinha, beringela e vagem apenas abaixo do limite (4%, 8%, 5% e 26% do total de amostras, respectivamente).

Figura 6 – Níveis de contaminação por organofosforados e carbamatos em 37 amostras coletadas na Ceasa/RJ



CONCLUSÕES

É de grande interesse prático o desenvolvimento de métodos alternativos de detecção de agrotóxicos no ambiente e em alimentos, desde que satisfaçam às exigências de sensibilidade, confiabilidade e reprodutibilidade e que, naturalmente, sejam de baixo custo e aplicáveis em pequenos laboratórios. Nesse sentido, exemplificou-se, no presente trabalho, a utilização de uma estratégia em que um método enzimático de detecção de agrotóxicos organofosforados e carbamatos pôde ser eficientemente empregado como precursor de método cromatográfico no monitoramento destes agrotóxicos nos principais produtos agrícolas comercializados no Rio de Janeiro. Os custos foram bastante reduzidos, já que em apenas 25% das amostras foi necessária a identificação cromatográfica do(s) resíduo(s) detectado(s).

Estes métodos, quando executados rotineiramente em pequenos laboratórios estrategicamente situados próximos a áreas cultivadas, seriam de extrema eficácia para equacionar uma série de problemas, tais como:

- 1) avaliar, com continuidade, produtos agrícolas colhidos e prontos para a comercialização;
- 2) verificar se a aplicação de agrotóxicos e/ou os períodos de carência usados estão adequados, considerando as peculiaridades locais e as variações das condições climáticas;
- 3) monitorar a contaminação de cursos d'água, lagoas e lençóis freáticos adjacentes, bem como a água utilizada para abastecimento público;
- 4) avaliar a contaminação do solo;
- 5) dar subsídios e verificar a eficácia de ações corretivas tomadas.

Quanto aos aspectos legais, é preciso notar que a legislação brasileira já abrange o método enzimático para organofosforados e carbamatos desde 1986 (Resolução Conama nº 20, que define classes de água, estabelecendo, conforme o uso da água, limites de 10 a 100 ppb em equivalentes de paration para organofosforados e carbamatos totais). Mais recentemente, a Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000, do Ministério da Saúde também recomenda o teste da acetilcolinesterase como um dentre os que compõem as normas de controle e vigilância da água para consumo humano.

Ao considerarmos um teste enzimático com tal finalidade, porém, é preciso frisar que sejam bem definidas e padronizadas todas as condições e observadas as características cinéticas da enzima. Uma simples alteração na concentração da enzima pode fornecer resposta diferente a um mesmo inibidor. Uma forma de resolver este problema e, assim, permitir o uso de enzimas de diferentes fontes em diferentes condições, é padronizar a resposta enzimática a um inibidor escolhido como referência. No caso do *kit* de acetilcolinesterase detalhado neste trabalho, foi escolhido o organofosforado metil paration como agrotóxico de referência pelas seguintes razões:

- 1) é um tionofosforado altamente tóxico usado na agricultura (classe toxicológica I), que necessita de 'ativação' para ser um potente inibidor da acetilcolinesterase, o que testa a sensibilidade da preparação enzimática a tais compostos;

- 2) está disponível uma técnica colorimétrica bastante simples e precisa de dosagem de metil paration a partir de preparações comerciais, baseada na medida do produto colorido formado (p-nitrofenol) após hidrólise alcalina. Isto permite a preparação precisa de soluções padrão de metil paration para a construção de curvas de inibição da ACE;
- 3) já existe na legislação brasileira (Resolução Conama nº 20, de 18 de junho de 1986) a referência a limites máximos em água de organofosforados e carbamatos totais expressos em equivalentes de paration.

Por fim, acreditamos que o desenvolvimento de técnicas similares que englobem outras classes de agrotóxicos e outros xenobióticos permitiria a montagem de eficientes, abrangentes e exeqüíveis sistemas de monitoramento do ambiente e de alimentos quanto à presença destes tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURONFOSSE, T. & BURONFOSSE, F. Intoxications des carnivores domestiques par les inhibiteurs des cholinestérasés. *Recueil de Médecine Vétérinaire: spécial toxicologie des carnivores domestiques*, 135-141, 1995.
- CUNHA BASTOS, V. L. F. et al. Brain acetylcholinesterase as an 'in vitro' detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Water Research*, 25(7): 835-840, 1991.
- ELLIS, R. L. Changing pesticide technology in meat and poultry products. *J Assoc Off Anal Chem*, 72, 521-524, 1989.
- FERRER, A. & CABRAL, R. Recent epidemics of poisoning by pesticides. *Toxicology Letters*, 82/83: 55-63, 1995.
- FONT, G. et al. Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. *J of Chromat*, 642: 135-161, 1993.
- HENAO, S. H. & COREY, G. O. *Plaguicidas organofosforados y carbamatos*. México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/Opas/OMS, 1986. (Serie Vigilancia 2).
- JACKSON, E. R. High pressure and gas-liquid chromatographic methods for the determination of parathion in formulations: colaborative study. *J Assoc Of Anal Chem*, 61 (3): 495-499, 1978.
- JEFFERY, G. H. et al. *Análise Química Quantitativa*. 5.ed. São Paulo: LTC, 1992.
- KLAASSEN, C. D. (Ed.) *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 6.ed. EUA: McGraw-Hill, 2001.

- KUMARAN S. & TRAN-MINH C. Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques. *Electroanalysis*, 4: 949-954, 1992.
- LACORTE, S.; MOLINA, C. & BARCELÓ, D. Screening of organophosphorus pesticides in environmental matrices by various gas chromatographic techniques. *Anal Chim Acta*, 281: 71-84, 1993.
- LA ROSA, C. et al. Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate. *Anal Chim Acta*, 295: 273-282, 1994.
- LEHOTAY, S. J. et al. Development of a sample preparation technique for supercritical fluid extraction for multiresidue analysis of pesticides in produce. *J AOAC International*, 78(3): 831-840, 1995.
- LIMA, J. S. et al. Methyl parathion activation by a partially purified brain fraction. *Toxicology Letters*, 87(1): 53-60, 1996.
- PIMENTEL, D. Green revolution agricultural and chemical hazards. *The Science of the Total Environment*, 188 (Supl.1): S86-S98, 1996.
- PYLPIW JR., H. M. Rapid gas chromatographic method for the multiresidue screening of fruits and vegetables for organochlorine and organophosphate pesticides. *J AOAC International*, 76(6): 1369, 1993.
- ROY, R. R.; WILSON, P. & LASKI, R. R. Monitoring of domestic and imported apples and rice by the U. S. Food and Drug Administration Pesticide Program. *J AOAC International*, 80(4): 883-894, 1997.
- SMITH, K. W. et al. Cholinergic activity of selected methanesulfonate insecticides: a pharmacological profile. *Pest Sci*, 46: 247-253, 1996.
- SMITH, R. M.; THOMAS, N. J. & HULSE, C. Application of brain cholinesterase reactivation to differentiate between organophosphorus and carbamate pesticide exposure in wild birds. *J Wildlife Diseases*, 31(2): 263-267, 1993.
- TORRES, C. M.; PICÓ, Y. & MANES, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *J of Chromat*, 754: 301-331, 1996.
- VANDERLAAN, M.; WATKINS, B. E. & STANKER, L. Environmental monitoring by immunoassay. *Environ Sci Technol*, 22: 247-254, 1988.
- VAN EMON, J. S. & MUMMA, R. O. (Eds.) *Immunochemical methods for Environmental Analysis*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1990. (ACS Symposium Series 443).
- WALKER, C. H. et al. *Principles of Ecotoxicology*. Londres: Taylor & Francis, 1996.
- WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme). *Public health impact of pesticides used in agriculture*. Geneva: WHO/Unep, 1990.

