

UTILIZAÇÃO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
APLICADO NO ESTUDO DA DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DOS AGROTÓXICOS  
ORGANOFOSFORADOS

DAMILA SILVA DE AZEVEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2013

UTILIZAÇÃO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
APLICADO NO ESTUDO DA DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DOS AGROTÓXICOS  
ORGANOFOSFORADOS

DAMILA SILVA DE AZEVEDO

Monografia apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de  
Licenciado em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina  
Canela Gazotti.

Co-orientador: Prof. Ms. Thiago Moreira  
de Rezende Araújo.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2013

UTILIZAÇÃO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
APLICADO NO ESTUDO DA DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DOS AGROTÓXICOS  
ORGANOFOSFORADOS

**DAMILA SILVA DE AZEVEDO**

“Monografia apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de  
Licenciado em Química.”

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2013.

---

Dr<sup>a</sup>. Mônica Santana Viana  
IBELGA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Garcia Vega  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Canela Gazotti (Orientadora)  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

---

Prof. Ms. Thiago Moreira de Rezende Araújo (Co-Orientador)  
Instituto Federal Fluminense

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, sinceramente, a minha orientadora Professora Maria Cristina Canela e ao meu coorientador Thiago Araújo, por todo apoio, atenção, paciência e pelo conhecimento transmitido, e a todos os meus amigos do laboratório 103.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	16
LISTA DE TABELAS .....	17
SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS.....	18
Resumo.....	19
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1 HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DE AGROTÓXICOS.....	10
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS .....	11
1.2.1 Agrotóxicos organoclorados.....	12
1.2.2 Agrotóxicos organofosforados .....	13
1.2.2.1 Metamidofós.....	16
1.2.2.2 Paration Metílico.....	17
1.2.2.3 Clorpirifós.....	19
1.3 IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE .	20
1.4 ENZIMA ACETILCOLINESTERASE .....	22
1.4.1 Metodologia de Ellman .....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
3 METODOLOGIA .....	28
3.1 TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE .....	28

3.2	CURVAS ANALÍTICAS .....	28
3.2.1	Curva paration metílico .....	28
3.2.2	Curva paraoxon metílico .....	29
3.3	TESTE DE DEGRADAÇÃO .....	29
3.4	TESTE METAMIDOFÓS .....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1	CURVAS ANALÍTICAS .....	31
4.1.1	Paration metílico .....	31
4.1.2	Paraoxon metílico .....	32
4.2	TESTE DE DEGRADAÇÃO .....	34
4.3	TESTE METAMIDOFÓS .....	35
5	CONCLUSÕES .....	37
	Referências Bibliográficas .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de agrotóxicos organoclorados	13
Figura 2 – Estrutura química básica de inseticidas organofosforados	14
Figura 3 – Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos por classes de uso	16
Figura 4 – Fórmula estrutural do metamidofós	17
Figura 5 – Fórmula estrutural do paration metílico	18
Figura 6 – Fórmula estrutural do clorpirifós	19
Figura 7 – Formas de contaminação dos agrotóxicos no meio ambiente	22
Figura 8 – Degradação da acetilcolina promovida pela ação catalítica da acetilcolinesterase	23
Figura 9 – Esquema das interações acetilcolina-acetilcolinesterase no sítio ativo da enzima.	23
Figura 10 – Fosforilação da serina pelo organofosforado com posterior processo de envelhecimento da enzima.	24
Figura 11 - Reação entre a acetiltiocolina com o íon 5-ditiobis-2-nitrobenzoato, seguida da produção de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico de coloração amarela	25
Figura 12 – Placa de 96 poços com o produto da reação da tiocolina com o íon 5-ditiobis-2-nitrobenzoato para obtenção de curva analítica para o metamidofós	26
Figura 13 – Distribuição dos tubos de borossilicato na piscina para o teste de degradação	30
Figura 14 - Curva analítica para o paration metílico	31
Figura 15 – Gráfico de resíduos para a curva do paration metílico	32
Figura 16 - Curva analítica para o paraoxon metílico	33
Figura 17- Gráfico de resíduos para a curva de paraoxon metílico	33
Figura 18 – Resultados do teste de degradação. AHC: ácido húmico claro, AHE: ácido húmico escuro, ADC: água destilada claro e ADE: água destilada escuro.	34
Figura 19 – Gráfico com os resultados do teste de degradação do metamidofós	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Agrotóxicos e seus alvos	12
Tabela 2 – Classificação da persistência dos agrotóxicos quanto à periculosidade	20
Tabela 3 – Classificação da persistência dos agrotóxicos segundo a EPA	21
Tabela 4 – pHs e seus respectivos tampões	30
Tabela 5 – Dados da curva do paration metílico	31
Tabela 6 – Dados da curva analítica do paraoxon metílico	32

## SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
ANDEF	Associação Nacional de Defesa Vegetal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatógrafo a Gás
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDT	Para-diclorodifeniltricloroetano
DNTB	Dinitrotiobenzeno Reagente de Ellman
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
pH	Potencial hidrogeniônico
PUC – RJ	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Agrícola
SNC	Sistema Nervoso Central
EPA	United States Environmental Protection Agency

## Resumo

**Título:** Utilização do Teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase Aplicado no Estudo da Degradação Abiótica dos Agrotóxicos Organofosforados

**Autor:** Damila Silva de Azevedo

**Orientadora:** Maria Cristina Canela

**Palavras chave:** organofosforados, acetilcolinesterase, degradação abiótica.

Devido ao crescente aumento da utilização de agrotóxicos na agricultura, inúmeros problemas de contaminação ambiental vêm ocorrendo. A utilização de agrotóxicos afeta não somente o solo onde é aplicado, mas também outros compartimentos do meio ambiente como o ar e a água, tanto superficial como subterrânea. A principal classe de agrotóxicos utilizados no Brasil atualmente é a dos organofosforados, compostos conhecidos pela sua rápida degradação no meio ambiente. Porém, muitas vezes estes compostos acabam gerando metabólitos mais tóxicos que os compostos originais. Os agrotóxicos organofosforados são amplamente conhecidos como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que atua no sistema nervoso central hidrolisando a acetilcolina, substância responsável pela transmissão de impulsos nervosos no cérebro. Em 1961, Ellman e colaboradores desenvolveram a metodologia colorimétrica para determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase. O teste colorimétrico com esta enzima é uma alternativa importante, simples e barata para o acompanhamento toxicológico da presença de agrotóxicos organofosforados em ambientes aquáticos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo mostrar a aplicabilidade desta enzima para monitorar a transformação abiótica do paration metílico, clorpirifós e metamidofós em diferentes condições e avaliar a sua toxicidade. Inicialmente, foram realizados testes com acetilcolinesterase para verificar o melhor volume inicial nos estudos de degradação abiótica e curvas analíticas, relacionando a porcentagem de inibição da enzima e a concentração dos agrotóxicos. Em seguida, os testes foram utilizados para estudar a hidrólise do metamidofós em diferentes valores de pH e finalmente acompanhar a degradação fotoquímica do paration metílico juntamente com o clorpirifós. Os resultados mostraram que a hidrólise do metamidofós está diretamente ligada ao pH do meio, conforme descrito pela literatura, sendo que a inibição da acetilcolinesterase diminui a medida que o agrotóxico se decompõe. Em contraste, nos estudos de degradação fotoquímica, observou-se que a conversão dos agrotóxicos gera compostos ainda mais tóxicos que os originais, apresentando mais riscos para o ambiente e para o homem. A possibilidade de utilizar a AChE como indicador de toxicidade no meio, auxilia no real impacto dos agrotóxicos quando aportam os ambientes aquáticos naturais.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DE AGROTÓXICOS

Substâncias químicas com o objetivo de combater pragas agrícolas, como insetos, ervas daninhas, fungos, etc. e aumentar a produção e a disponibilidade de alimentos vem sendo utilizadas há milhares de anos pela humanidade. Estas substâncias são denominadas defensivos agrícolas, pesticidas ou agrotóxicos, sendo este último termo, indicado pela Legislação Brasileira. Segundo a Lei nº 7.802, de 11/07/1989 define o termo agrotóxico da seguinte forma (BRASIL, 1989):

*[...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao seu uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção das florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;*

O uso mais antigo de agrotóxicos que se tem registro é a queima de enxofre para fumigar os lares gregos, cerca do ano 1000 a.C. (BAIRD e CANN, 2011). Inicialmente os agrotóxicos utilizados eram compostos inorgânicos e organometálicos, tais como: dióxido de enxofre, fluoreto de sódio, compostos de arsênio e de mercúrio. Porém tais substâncias são extremamente tóxicas para os seres humanos e outros mamíferos nos níveis requeridos para torná-las agrotóxicos efetivos. Durante a Segunda Guerra Mundial foram sintetizados muitos agrotóxicos orgânicos, também utilizados como armas químicas, para substituir os compostos inorgânicos, os quais deixaram de ser utilizados.

Os agrotóxicos orgânicos, em geral, possuem a vantagem de serem efetivos contra as pragas utilizando uma menor quantidade dos mesmos, e foram inicialmente projetados para serem biodegradáveis, embora isso não tenha resultado verdadeiro em muitos casos (BAIRD e CANN, 2011).

Os agrotóxicos possuem um papel de grande importância no cenário mundial atual já que a demanda por alimentos se torna maior à medida que a população cresce exponencialmente. Por isso, eles são necessários para evitar as perdas nas lavouras e aumentar a sua produtividade.

No Brasil, a partir da segunda metade dos anos 1970, a indústria de agrotóxicos cresceu de forma significativa e a comercialização desses produtos tem crescido continuamente. Durante o período de 1975 a 2009, o País sempre esteve entre os seis maiores mercados de agrotóxicos do mundo (IBAMA, 2010).

Em 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Segundo levantamento feito pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (Sindag), no Brasil, em 2010, as vendas de agrotóxicos somaram US\$ 7,3 bilhões diante de US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos (ANDEF, 2011). Este alto consumo de agrotóxicos pode ser explicado pela expansão do setor agrícola brasileiro nos últimos anos. O Brasil já é o terceiro maior exportador agrícola do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e da União Europeia (IBAMA, 2010).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Atualmente estima-se que mais de 1500 substâncias são utilizadas como ingredientes ativos de produtos agrotóxicos, que podem estar presentes em diversas formulações, quantidades e associadas de diversas maneiras (PATNAIK, 2007).

Devido à diversidade dos compostos, os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a sua ação e seus grupos funcionais. As várias categorias de agrotóxicos com relação ao organismo alvo estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 – Agrotóxicos e seus alvos (BAIRD e CANN, 2011).

<b>Tipo de agrotóxico</b>	<b>Organismo alvo</b>
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Aves
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Micro-organismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematóides
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores
Cupicida	Cupins

De acordo com suas estruturas químicas, os agrotóxicos ainda são subdivididos, obtendo-se as seguintes subclasses principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, além de outros.

### **1.2.1 Agrotóxicos organoclorados**

Os agrotóxicos organoclorados foram os primeiros pesticidas orgânicos sintéticos desenvolvidos. Esta classe de inseticidas é caracterizada por compostos à base de carbono com átomos de cloro, derivados do clorobenzeno, do cicloexano ou do cicloexadieno. A Figura 1 apresenta alguns exemplos de organoclorados.

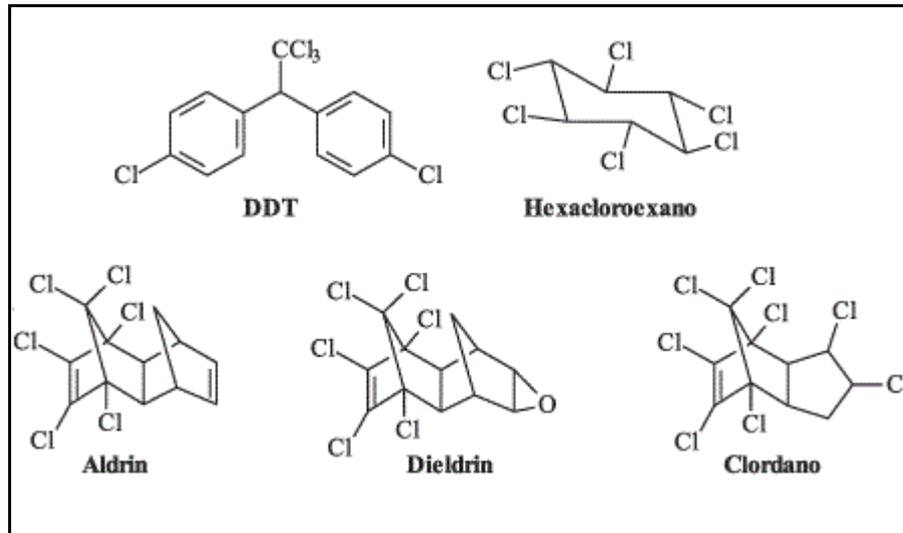


Figura 1 – Exemplos de agrotóxicos organoclorados

Os organoclorados possuem certas propriedades que se destacam: são muito estáveis à degradação ambiental, baixa solubilidade em água, alta solubilidade em hidrocarbonetos e alta toxicidade para insetos, mas baixa para os humanos. Porém são extremamente tóxicos em consequência destas mesmas características. Como são muito estáveis, podem persistir na natureza por anos e se biomagnificar na cadeia alimentar já que são muito solúveis na gordura dos animais.

O para-diclorodifeniltricloroetano (DDT) é um exemplo clássico de organoclorado que foi utilizado por muito tempo e em grande quantidade. Ele foi utilizado na Segunda Guerra contra os mosquitos transmissores da malária e da febre amarela salvando milhares de vidas. O seu uso intensivo, inclusive na agricultura, fez com que sua concentração ambiental se elevasse rapidamente e começasse a afetar a capacidade reprodutiva das aves que foram expostas a esse composto (BAIRD e CANN, 2011). O seu uso foi proibido devido a sua persistência e toxicidade devido à bioacumulação no ambiente.

### 1.2.2 Agrotóxicos organofosforados

Em substituição aos agrotóxicos organoclorados, começaram a serem utilizados os organofosforados, que atualmente são a classe de maior interesse comercial e toxicológica (Santos *et al.*, 2007). São ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico e usualmente têm a estrutura geral descrita na Figura 2.

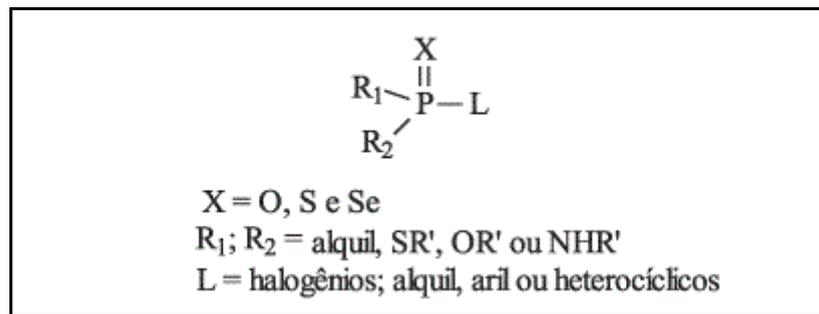


Figura 2 – Estrutura química básica de inseticidas organofosforados

A aplicação industrial e comercial de compostos organofosforados na agricultura começou com Schrader e colaboradores, que descobriram, em 1941, o inseticida octametilpirofosforamida, que foi chamado de Scharadan (Santos *et al.*, 2007).

O grande avanço dos agrotóxicos organofosforados com relação aos organoclorados é que estes são menos persistentes na natureza. Contudo, eles apresentam geralmente um efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os organoclorados (BAIRD e CANN, 2011). Ambos concentram-se nos tecidos gordurosos, porém os organofosforados se decompõem em dias ou semanas, sendo raramente encontrados nas cadeias alimentares. É importante mencionar que isso não necessariamente indica que esta classe de inseticidas cause menos danos ao meio ambiente já que seus componentes podem se degradar em substâncias mais tóxicas que as originais e que baixas concentrações já podem ser perigosas para os organismos vivos (Wolfe *et al.*, 1990; Mansour *et al.*, 1997).

O mecanismo de ação dos organofosforados é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) nos sistemas nervosos de vertebrados e de invertebrados. Segundo Patrick (2001) este fenômeno só ocorre quando a ligação P=S é oxidada a P=O, ou seja, os agrotóxicos organofosforados são convertidos em seus produtos de degradação. Benke *et al.* (1974) já afirmavam que os análogos com oxigênio são muitos mais tóxicos que os organofosforados originais. Este fato pode ser explicado pela diferença de eletronegatividade entre o fósforo e o oxigênio, que é maior que a diferença entre o fósforo e o enxofre, o que facilita a reação de hidrólise do produto de degradação no sítio ativo da enzima, desativando-a mais facilmente.

A utilização dos agrotóxicos no Brasil, por classes de ataque a organismos-alvo, segundo o IBGE (2010), é mostrada na Figura 3. No caso dos inseticidas, os mais utilizados são o metamidofós, endosulfan e a parationa metílica ou paration metílico, respectivamente, demonstrando a grande importância do estudo dos inseticidas organofosforados. Apesar de o paration metílico estar sendo reavaliado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), quanto a sua toxicidade e possível proibição, juntamente com mais 8 ingredientes ativos, a SINDAG e as empresas fabricantes seguem pressionando para que estes testes não sejam feitos (Jornal da Ciência, 2013). O paration metílico, juntamente com o metamidofós, está proibido na China desde 2007 e desde então a importação brasileira deste agrotóxico duplicou de um ano para outro.

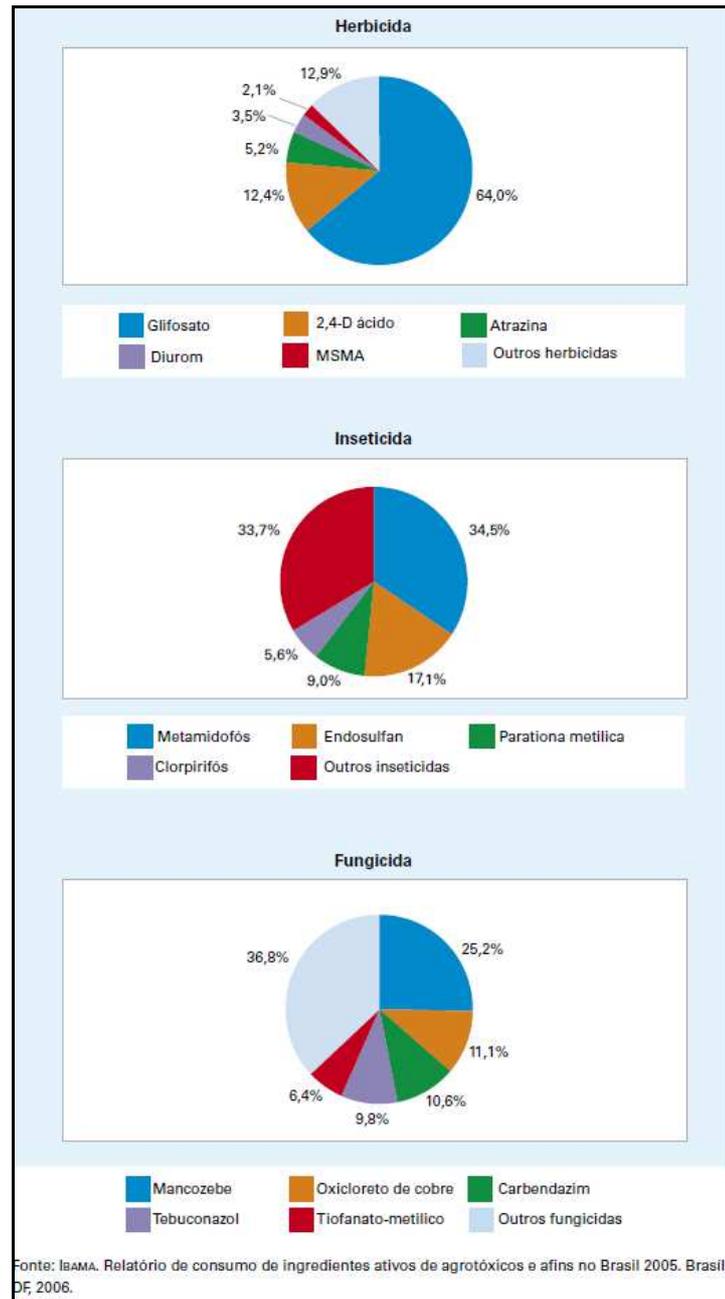


Figura 3 – Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos por classes de uso. (Brasil, 2005)

### 1.2.2.1 Metamidofós

O metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotioato) é um inseticida e acaricida, com classificação toxicológica I segundo a ANVISA e obtido como subproduto do acefato. A sua fórmula estrutural está representada na Figura 4.

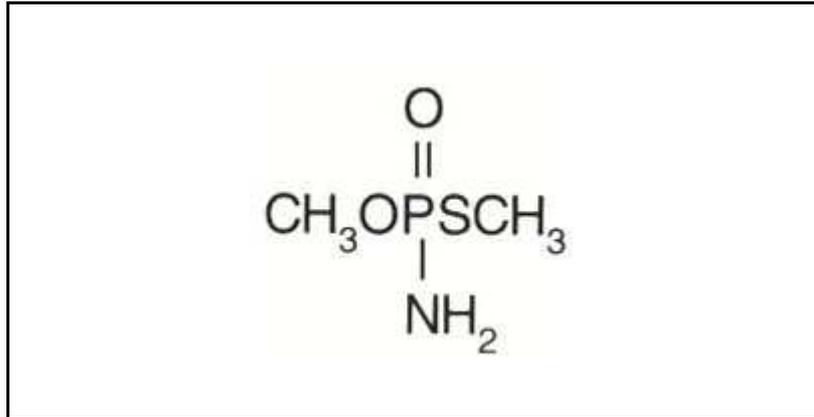


Figura 4 – Fórmula estrutural do metamidofós

Este ingrediente ativo é altamente transportável, muito persistente, muito tóxico para organismos do solo e altamente tóxico para aves e abelhas (IBAMA, 2010). Segundo a Silva (2010), o metamidofós foi identificado como neurotóxico e indicativo de interferente endócrino. Trata-se de um sólido cristalino de odor acre, com pressão de vapor em torno de  $3 \times 10^{-4}$  mmHg a 30 °C, logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log K_{ow}$ ) de -1,74 e ponto de fusão igual a 46,1 °C. Em ambientes aquáticos, o tempo de meia-vida do metamidofós varia basicamente conforme o pH do meio. Em pH 5,0, este tempo é de 309 dias; em pH neutro, de 27 dias, e em pH levemente alcalino (pH~9,0) de 3 dias (LIMA, 2001).

O anexo VII da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde estabelece que o limite máximo de metamidofós na água potável é 12 µg/L. A CONAMA 357 não estabelece limites para este composto na legislação de águas superficiais (BRASIL, 2005). Apesar da ANVISA já ter sugerido que este composto seja banido no Brasil, ele ainda continua sendo comercializado (SILVA, 2010).

#### 1.2.2.2 Paration Metílico

O paration metílico (O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato) é um exemplo de organofosforado no qual o oxigênio da dupla ligação foi substituído por enxofre (BAIRD e CANN, 2011). A estrutura do paration metílico pode ser visualizada na Figura 5.

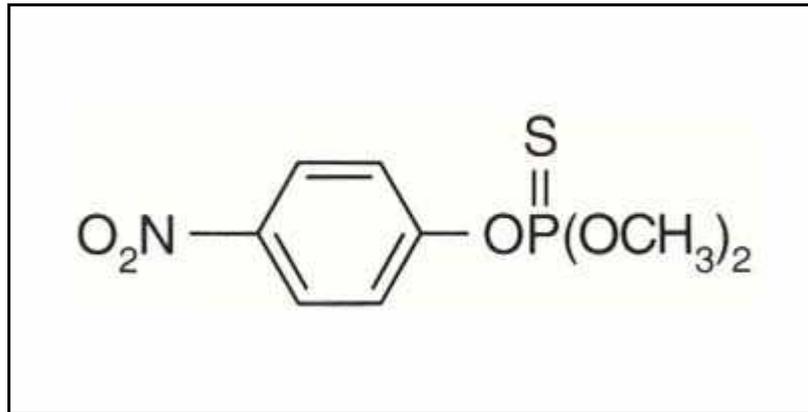


Figura 5 – Fórmula estrutural do paration metílico

Segundo a monografia de agrotóxicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), este composto é um inseticida e acaricida pertencente à classe toxicológica I (extremamente tóxico) (BRASIL, 2002). Possui pressão de vapor de 0,5 mmHg a 20°C e logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log K_{ow}$ ) entre 1,81 e 3,43 e tempo de meia vida por volta de 25 dias em água e sob radiação solar.

De acordo com Baird e Cann (2011), atualmente, seu uso está proibido em alguns países industrializados do primeiro mundo, porém ainda é largamente utilizado em países em desenvolvimento. Um fato considerável é que a ANVISA exige que esteja presente nos rótulos dos produtos formulados com este princípio ativo, a seguinte frase: "O metil paration é um inibidor das colinesterases. Além dos efeitos próprios do paration, durante sua biotransformação é formado o paraoxon, um metabólito, que aumenta e prolonga os efeitos tóxicos. No tratamento devem ser utilizadas atropina e pralidoxima, e o paciente deve ser observado e se necessário, receber tratamento por um maior período de tempo" (ANVISA, 2002).

Esta citação comprova que a periculosidade dos organofosforados está presente principalmente em seus produtos de degradação, neste caso o paraoxon metílico, proveniente do paration. A alta biodegradabilidade destes inseticidas, sua principal vantagem com relação aos organoclorados, não se mostra uma característica completamente positiva, quando o mesmo gera produtos bastante tóxicos.

O anexo VII da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde estabelece que o limite máximo de paration metílico na água potável é 9 µg/L (BRASIL, 2011). A CONAMA 357 estabelece um limite máximo de paration metílico

para água doce de 0,04 µg/L, no caso das classes I e II e 35 µg/L para classe III (BRASIL, 2005). Em janeiro de 2012, a ANVISA recomendou o banimento do paration metílico após comprovar efeitos a saúde humana, como à diminuição do peso do timo, diminuição da proliferação dos linfócitos T, diminuição da quimiotaxia de neutrófilos, diminuição da resposta secundária de anticorpos (ANVISA, 2012).

### 1.2.2.3 Clorpirifós

O O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate, também conhecido como clorpirifós é um agrotóxico organofosforado utilizado como inseticida, formicida e acaricida, sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 6.

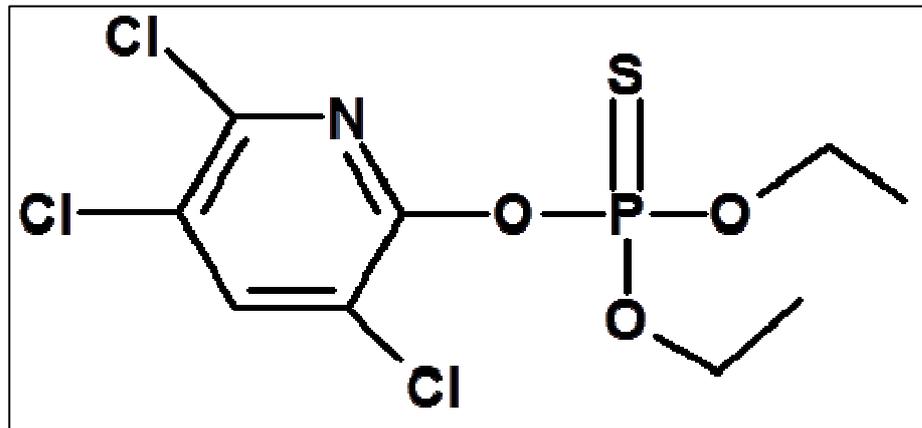


Figura 6 – Fórmula estrutural do clorpirifós

Segundo a ANVISA, este composto possui classificação toxicológica II (altamente tóxico) (BRASIL, 2002). E conforme mostrado na Figura 3 foi o terceiro ingrediente ativo mais utilizado com inseticida no Brasil em 2005. Seu ponto de fusão é 42 °C, e possui baixa solubilidade em água, apenas 2 mg.L<sup>-1</sup>, e seu logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água (log K<sub>ow</sub>) é 4,6.

O anexo VII da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde estabelece que o limite máximo de clorpirifós na água potável é 30 µg/L (BRASIL, 2012). A CONAMA 357 não estabelece limites para este composto na legislação de águas superficiais (BRASIL, 2005).

### 1.3 IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) classifica os agrotóxicos, quanto a sua periculosidade, em quatro tipos de acordo com o mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Classificação da persistência dos agrotóxicos quanto à periculosidade (IBAMA, 1996).

<b>Classe</b>	<b>Grau de periculosidade</b>
I	Produto altamente perigoso
II	Produto muito perigoso
III	Produto perigoso
IV	Produto pouco perigoso

Esta classificação baseia-se em uma série de parâmetros que incluem: a taxa de bioacumulação, a persistência dos agrotóxicos ou seus componentes no meio ambiente, o tipo de transporte, o nível de toxicidade para diversos organismos, os potenciais mutagênico, teratogênico, carcinogênico, e tem como objetivo diminuir os impactos ambientais causados pelos agrotóxicos.

A utilização de agrotóxicos afeta não somente as pragas agrícolas, devido a sua potencial toxicidade, mas também o meio ambiente e a saúde humana. De acordo com Uaska (1987), há várias formas de contaminação ambiental por agrotóxicos, mas que podem ser divididas em dois grandes grupos: contaminação direta e contaminação indireta. A contaminação direta resulta da aplicação do agrotóxico para controle de pragas agrícolas e a indireta deriva de outras fontes não resultantes da aplicação direta para o controle de pragas, tais como, lançamento de resíduos industriais contendo agrotóxicos diretamente nos rios, as partículas de agrotóxicos suspensas após pulverização, o descarte de sobras de agrotóxicos, a lavagem dos aplicadores em córregos, valas e o lançamento de agrotóxicos em esgoto doméstico (UASKA, 1987).

Os agrotóxicos presentes no meio ambiente, como a maioria dos compostos orgânicos, sofrem decomposição e formam outros compostos, também chamados produtos de degradação. Embora alguns destes compostos persistam por muito tempo no ambiente, a maioria sofre reações químicas e bioquímicas em poucos dias

ou meses, produzindo outros compostos orgânicos e/ou inorgânicos (BAIRD e CANN, 2011).

A Environmental Protection Agency (EPA), Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente, classifica os agrotóxicos de acordo com seu tempo de meia-vida conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3 – Classificação da persistência dos agrotóxicos segundo a EPA (BAIRD e CANN, 2011).

<b>Classificação</b>	<b>Tempo de meia-vidas (dias)</b>
Não persistente	<30
Moderadamente persistente	30-100
Persistente	>100

No ar, o processo de degradação normalmente começa com o ataque sobre a molécula orgânica pelo radical hidroxila, ou com uma reação fotoquímica. A decomposição fotoquímica é possível também para agrotóxicos presentes na água ou adsorvidos no solo que está sob a superfície da Terra (BAIRD e CANN, 2011).

Os agrotóxicos ainda podem ser degradados por hidrólise em ambientes aquáticos e no solo. Este tipo de reação ocorre principalmente quando a água está um pouco ácida ou básica, uma vez que a catálise por  $H^+$  ou  $OH^-$  pode acelerar o processo significativamente. Os inseticidas organofosforados, por exemplo, sofrem hidrólise em água e solos alcalinos decorrente do ataque do  $OH^-$  na ligação P–O–C (BAIRD e CANN, 2011).

Reações de oxidação e redução também são responsáveis pela decomposição dos agrotóxicos. Alguns agentes redutores comumente encontrados em águas e solos anaeróbios são o  $Fe^{2+}$  e o íon sulfeto,  $S^{2-}$  (BAIRD e CANN, 2011).

Outra forma de degradação dos agrotóxicos na água e no solo é a microbiológica que é tão importante quanto os processos químicos citados acima.

A Figura 7 demonstra as várias formas de contaminação do meio ambiente, como a contaminação do ar, dos solos e das águas, e as reações de degradação dos agrotóxicos.

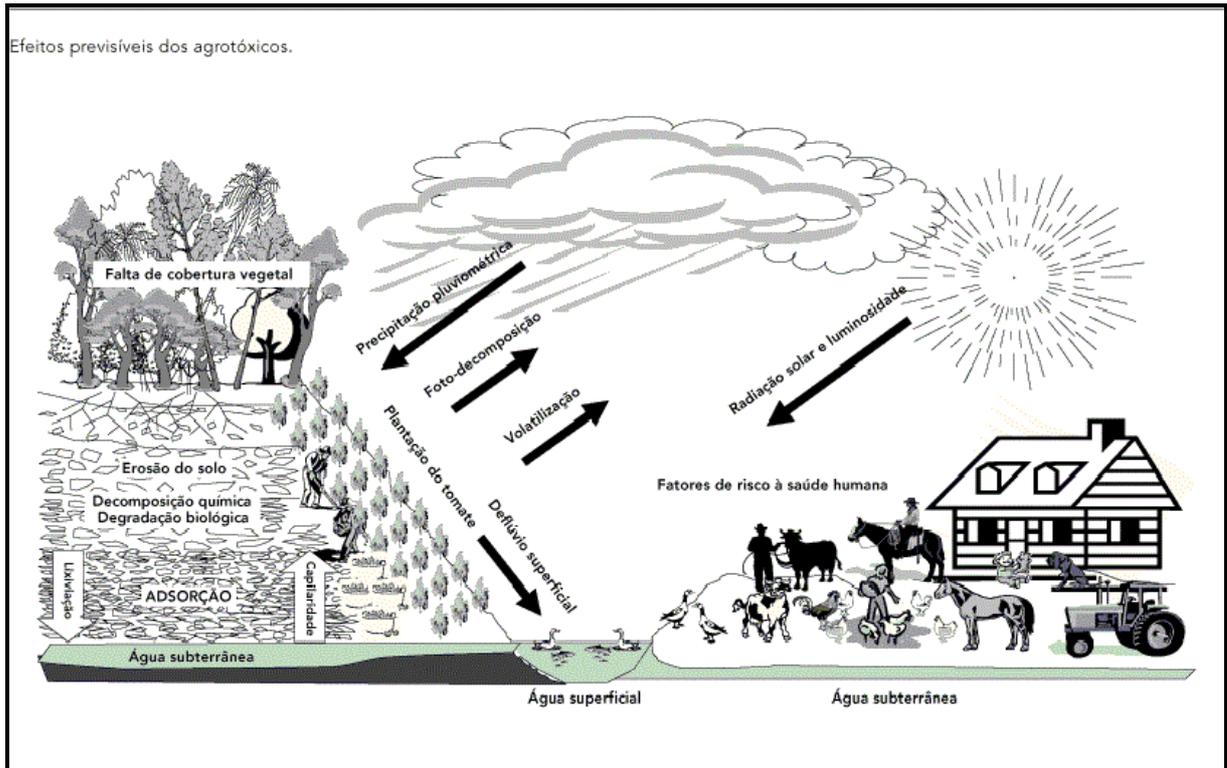


Figura 7 – Formas de contaminação dos agrotóxicos no meio ambiente (VEIGA *et al.*, 2006)

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional ou escoamento superficial a partir das áreas onde ocorreram as aplicações (TOMITA, 2002). Além de contaminar as águas superficiais, eles podem alcançar os lençóis freáticos, por lixiviação através do solo. Estudos realizados por Vidal (2011) e Portal (2011) demonstraram a presença do agrotóxico organofosforado paration metílico na água dos poços utilizada para consumo dos agricultores familiares no Assentamento Zumbi dos Palmares, localizado no Norte Fluminense.

#### 1.4 ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um neurotransmissor e está presente em grande parte dos animais. Sua principal função é ser catalisador na reação de quebra da acetilcolina em colina e acetato conforme a Figura 8.

A acetilcolina transmite os impulsos nervosos através das sinapses até os receptores. A hidrólise da mesma encerra essa comunicação (FIGUEROA-VILLAR, 2012). Quando a acetilcolinesterase é inibida, a acetilcolina se acumula no



Quando a AChE é inibida por pesticidas organofosforados, o resíduo de serina se liga ao átomo de fósforo do agrotóxico ao invés de estar acetilado, como seria se sua ligação fosse com a acetilcolina, conforme a Figura 10. Uma vez que a ligação fósforo(fosforilante)-oxigênio(serina) é extremamente forte, a quebra da mesma é lenta e a enzima encontra-se inibida. Dependendo da estrutura do pesticida organofosforado, a recuperação da enzima pode levar dias e, ainda, pode acontecer o processo de inativação da mesma. (Fukuto, 1990; Patrick, 2001; dos Santos *et al.*, 2007).

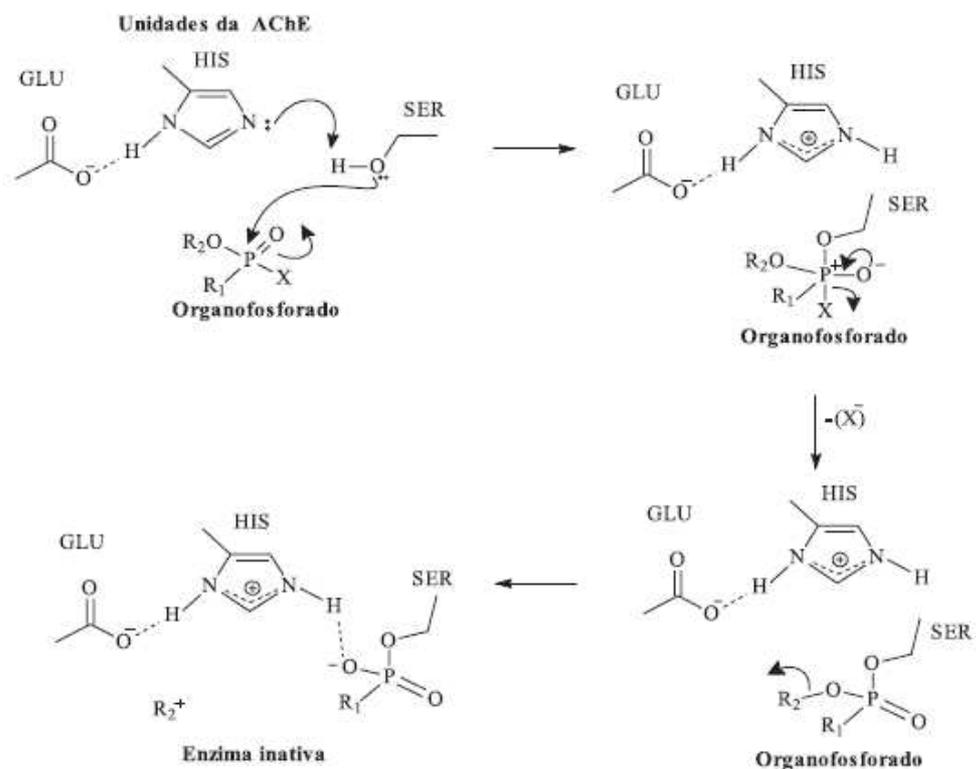


Figura 10 – Fosforilação da serina pelo organofosforado com posterior processo de envelhecimento da enzima. (Extraído de dos Santos *et al.*, 2007).

#### 1.4.1 Metodologia de Ellman

O método colorimétrico para determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase foi desenvolvido em 1961 por Ellman e seus colaboradores. A medida espectrofotométrica permite a quantificação da variação da atividade da acetilcolinesterase e possíveis sinais de inibição (VIDAL, 2011).

O princípio deste método 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-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico, que possui coloração amarela conforme Figura 11.

Vale ressaltar que o substrato da acetilcolinesterase nos organismos é a acetilcolina, porém no procedimento do método de Ellman é sugerido o uso da acetiltiocolina.

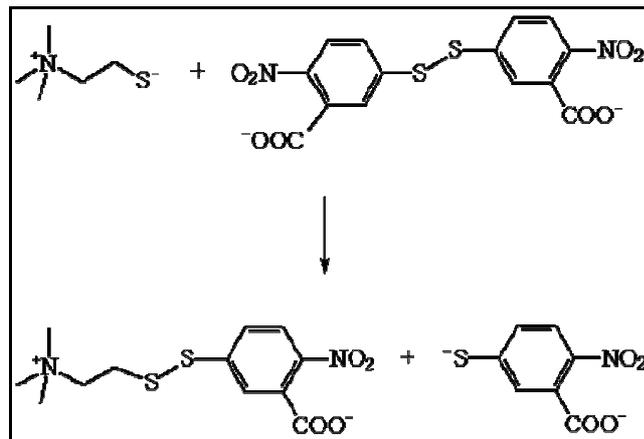


Figura 11 - Reação entre a acetiltiocolina com o íon 5-ditiobis-2-nitrobenzoato, seguida da produção de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico de coloração amarela (ELLMAN *et. al*, 1961).

A intensidade da coloração amarela do meio é diretamente proporcional à quantidade de acetiltiocolina que está sendo hidrolisada num determinado intervalo de tempo, conforme a Figura 12. Conseqüentemente, quanto maior a intensidade da cor, maior é a atividade catalítica da enzima acetilcolinesterase testada. Logo, uma baixa atividade catalítica pode indicar que parte da enzima foi inibida por uma substância, por exemplo, por um composto organofosforado.

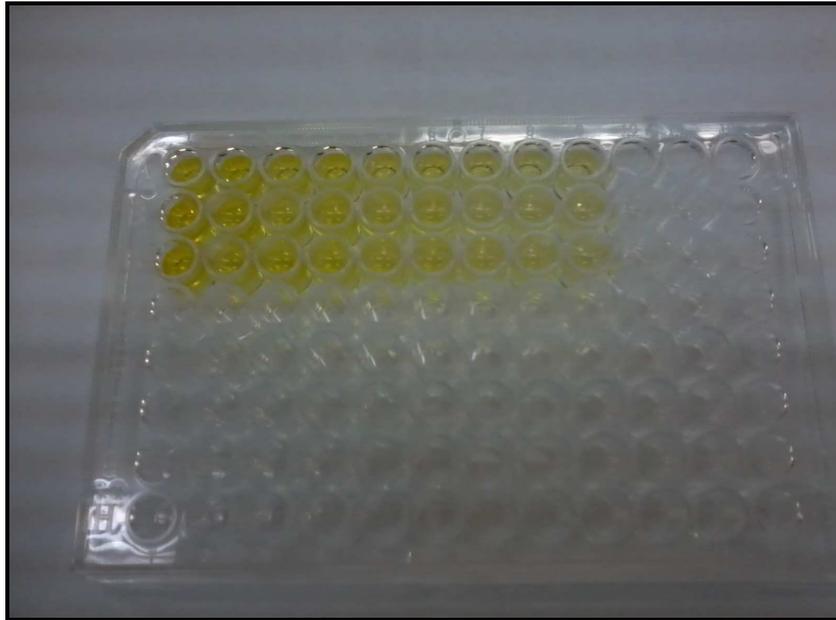


Figura 12 – Placa de 96 poços com o produto da reação da tiocolina com o íon 5-ditiobis-2-nitrobenzoato para obtenção de curva de calibração para o metamidofós.

A metodologia desenvolvida por Ellman (1961) pode ser aplicada a diferentes finalidades além de sua importante atuação como teste de toxicidade. Como exemplo, pode-se citar o seu emprego no trabalho de Feitosa (2011) como ferramenta para testes com plantas medicinais brasileiras para combate ao Mal de Alzheimer.

O método colorimétrico de Ellman (1961) para determinação da atividade catalítica da enzima acetilcolinesterase aplicado em testes de toxicidade pode ser uma alternativa para verificar a presença de organofosforados e carbamatos e seus produtos de degradação em água, pois possui diversas vantagens sobre os métodos analíticos tradicionais. Estes métodos, tais como, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) exigem um alto custo operacional tornando inviável sua utilização em larga escala e para obtenção rápida de uma resposta, principalmente quanto a toxicidade do meio. A utilização do teste com a acetilcolinesterase é uma opção mais simples e de baixo custo para avaliação toxicológica de águas, quando o objetivo está diretamente relacionado com verificação da qualidade, principalmente para consumo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Demonstrar as vantagens do teste com a enzima acetilcolinesterase, de acordo com a metodologia de Ellman, aplicado a verificação qualitativa do destino de agrotóxicos organofosforados durante processos de degradação abiótica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar a metodologia de Ellman para a utilização do equipamento leitor de placas de 96 poços Hidex Chameleon Multi-technology e das melhores concentrações iniciais para o acompanhamento dos ensaios a serem realizados;
- Construir curvas de calibração mostrando a relação entre a porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase e a concentração dos agrotóxicos paration metílico e seu principal produto de degradação: paraoxon metílico;
- Acompanhar os valores de inibição da enzima acetilcolinesterase durante o teste de degradação do paration metílico sob irradiação;
- Estudar o processo de hidrólise do metamidofós em diferentes valores de pH, através do teste de inibição pela enzima acetilcolinesterase.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A metodologia utilizada para verificar a porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase foi adaptada do trabalho de Ellman e colaboradores (1961) e é descrita a seguir.

A enzima utilizada neste teste foi gentilmente fornecida pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RIO) e é extraída do cérebro de ratos (Vianna, 2012).

Para a análise da inibição enzimática, são transferidos para tubos de ensaio 55  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão fosfato  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  previamente preparada e com valor de pH igual a 7,4, 10  $\mu\text{L}$  do extrato da enzima acetilcolinesterase e 10  $\mu\text{L}$  do analito. Após a homogeneização, os frascos foram incubados por 2 horas em banho a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, são acrescentados 65  $\mu\text{L}$  do reagente de cor DNTB (dinitrotiobenzeno ou reagente de Ellman-Aldrich). O conteúdo dos tubos de ensaio é transferido para uma placa de 96 poços e são adicionados 65  $\mu\text{L}$  do substrato acetiltiocolina (Aldrich). A leitura da absorbância em 405 nm é realizada a cada 30 segundos, durante 3 minutos com um leitor de placas Hidex Chameleon Multi-technology.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da acetilcolinesterase é realizada uma regra de três simples, onde a média da absorbância por minuto para o controle é considerado como sendo 100% de atividade e o valor que se quer obter é igual a X. Este valor X obtido é subtraído de 100% para se obter a porcentagem de inibição.

#### 3.2 CURVAS ANALÍTICAS

Foram realizadas curvas analíticas em água para o paration metílico e para seu principal produto de degradação: paraoxon metílico.

##### 3.2.1 Curva paration metílico

Pesou-se 0,0100 g de padrão de paration metílico (Paration metílico-PESTANAL-Aldrich) e dissolveu-se em aproximadamente 10 mL de acetona para

facilitar sua solubilização. Transferiu-se quantitativamente esta alíquota para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada, obtendo-se uma concentração de paration metílico em água de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir desta solução foram retiradas alíquotas de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5  $\mu\text{L}$  para realização, em triplicata, do teste de inibição com a enzima acetilcolinesterase e construção da curva analítica. Tomou-se o cuidado para que o volume final de incubação fosse o mesmo com a adição de água desionizada para completar os volumes dos diferentes padrões.

### **3.2.2 Curva paraoxon metílico**

Pesou-se 0,0100 g de padrão de paraoxon metílico (Paraoxon metílico-PESTANAL-Aldrich), transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada, obtendo-se uma concentração de paraoxon metílico em água de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Uma alíquota de 0,1 mL desta solução foi transferida para outro balão volumétrico de 1000 mL que teve seu volume completado, em triplicata, com água deionizada obtendo-se uma nova solução de concentração  $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir desta última foram retiradas alíquotas de 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 e 80,0  $\mu\text{L}$  para realização, em triplicata, do teste de inibição com a enzima acetilcolinesterase e construção da curva analítica. Tomou-se o cuidado para que o volume final de incubação fosse o mesmo com a adição de água deionizada para completar os volumes dos diferentes padrões.

### **3.3 TESTE DE DEGRADAÇÃO**

Para realização do teste de degradação abiótica foi utilizada a metodologia desenvolvida por Araújo em sua tese de mestrado “Degradação do paration metílico em ambientes aquáticos naturais” (ARAÚJO, 2006). Foram preparadas soluções aquosas contendo paration metílico e clorpirifós na concentração de  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  com adição ou não de ácido húmico. Estas soluções foram expostas a radiação solar em frascos de borossilicato imersos em água e cobertos ou não com papel alumínio conforme mostra a Figura 13. O experimento foi realizado por 24 dias e a toxicidade do meio ao longo do tempo foi avaliada utilizando o teste com a enzima acetilcolinesterase.



Figura 13 – Distribuição dos tubos de borossilicato na piscina para o teste de degradação.

### 3.4 TESTE METAMIDOFÓS

Para os testes de hidrólise do metamidofós foram preparadas três soluções de concentração  $2,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de metamidofós (Metamidofós- PESTANAL-Aldrich) em soluções tampão de três diferentes valores de pH: 5,0; 7,0 e 9,0 e com volume de 1 L cada. Os tampões que foram utilizados seguem na Tabela 4.

Tabela 4 – pHs e seus respectivos tampões

pH	Solução Tampão
5,0	Solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido cítrico/Solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato dibásico de sódio
7,0	Solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato monobásico de sódio/Solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato dibásico de sódio
9,0	Solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de carbonato de sódio anidro/Solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio

As soluções foram acondicionadas em frascos âmbar e foram retiradas alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  de cada frasco nos dias 0, 1, 2, 3, 11, e 17 para realização do teste com a enzima acetilcolinesterase. O teste foi realizado em quintuplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CURVAS ANALÍTICAS

#### 4.1.1 Paration metílico

Os valores obtidos para a média de absorvância por minuto e porcentagem de inibição para a curva do paration metílico encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Dados da curva analítica do paration metílico

Massa (ng)	Média da variação das absorvâncias médias por minuto	Porcentagem de inibição (%)
Branco	0,133	
25	0,114	14,4
50	0,105	21,1
75	0,102	23,1
100	0,097	27,0
125	0,088	33,6

A Figura 14 apresenta a curva obtida da variação da massa de paration metílico com a porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase e o gráfico de resíduos (Figura 15), o qual não apresenta nenhum padrão, o que revela concordância entre as variáveis massa e %inibição.

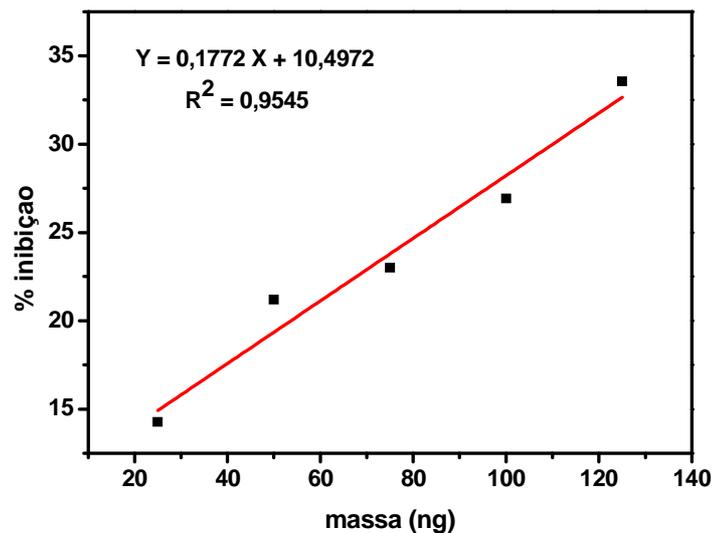


Figura 14 - Curva de calibração para o paration metílico

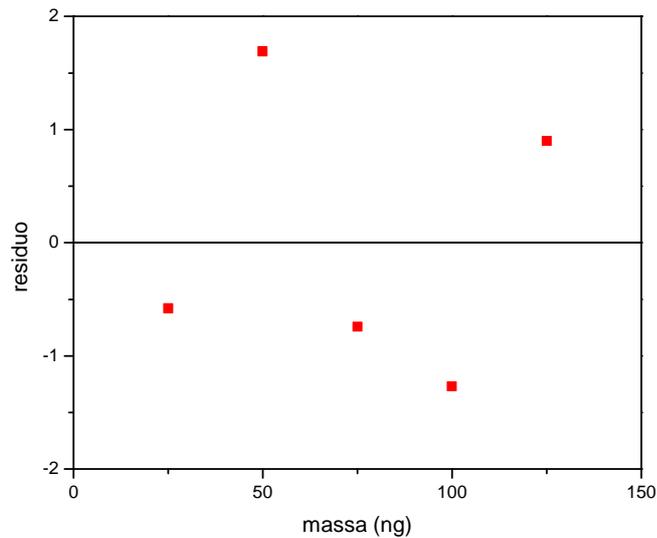


Figura 15 – Gráfico de resíduos para a curva do paration metílico

Nos estudos realizados neste trabalho, observou-se que com massas de paration maiores que 1 micrograma a inibição da AChE ocorre em 100% e valores abaixo de 1 nanograma não é possível detectar inibição desta enzima.

#### 4.1.2 Paraoxon metílico

Os valores obtidos para a média de absorvância por minuto e porcentagem de inibição para a curva do paraoxon metílico encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Dados da curva de calibração do paraoxon metílico

Massa (pg)	Média da variação das absorvâncias médias por minuto	Porcentagem de inibição (%)
Branco	0,117	
10,00	0,110	6,0
20,00	0,094	19,7
40,00	0,086	26,5
60,00	0,063	46,2
80,00	0,058	50,4

A curva analítica obtida para o paraoxon metílico apresentou aspecto de uma reta o que comprova uma relação linear entre a porcentagem de inibição da enzima e a massa de paraoxon metílico. O gráfico desta curva pode ser visualizado na

Figura 16. E o gráfico de resíduos (Figura 17), o qual não apresenta nenhum padrão, o que revela concordância entre as variáveis massa e %inibição.

Comparando a curva do paration com a curva do paraoxon, podemos perceber que para uma mesma inibição, 20% por exemplo, a massa necessária de paraoxon (20 pg) é 2500 vezes menor que a massa do paration (50 ng), o que comprova que o primeiro é realmente mais tóxico para os seres vivos, conforme mostrado anteriormente.

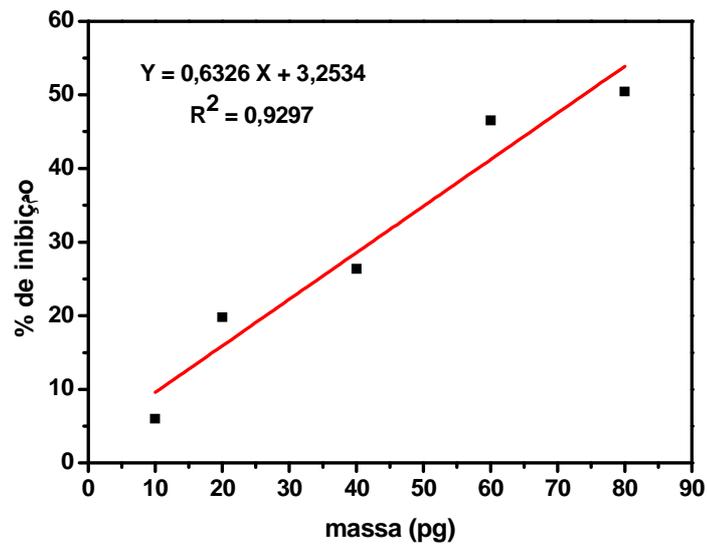


Figura 16 - Curva de calibração para o paraoxon metílico.

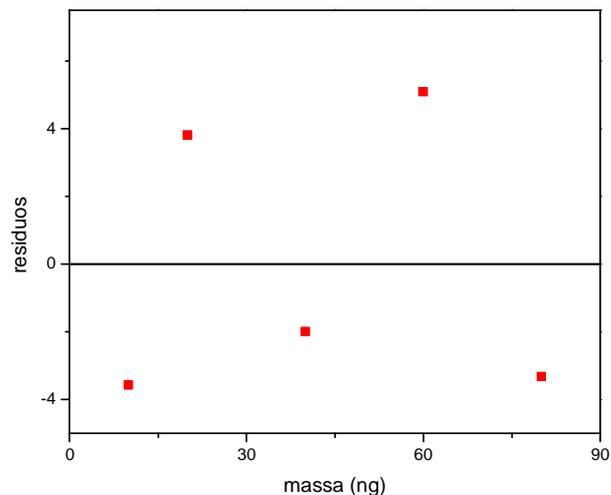


Figura 17- Gráfico de resíduos para a curva de paraoxon metílico

## 4.2 TESTE DE DEGRADAÇÃO

Soluções contendo os agrotóxicos organofosforados paration metílico e clorpirifós tiveram seu comportamento acompanhado por 24 dias, com a utilização do teste com a enzima acetilcolinesterase. Vale ressaltar que parte das amostras estava exposta a radiação solar (C-claro) e parte não, pois estavam cobertas com papel alumínio (E-escuro). A Figura 18 mostra os resultados obtidos durante este período.

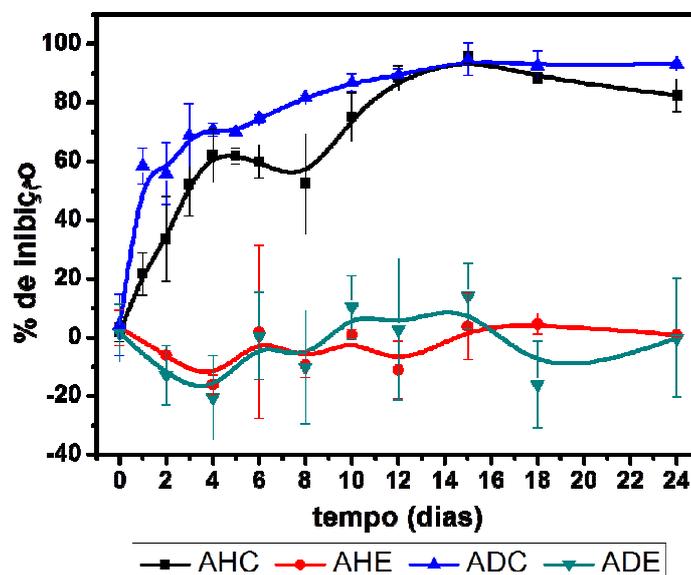


Figura 18 – Resultados do teste de degradação. AHC: ácido húmico claro, AHE: ácido húmico escuro, ADC: água destilada claro e ADE: água destilada escuro.

Podemos verificar, ao observar a Figura 18, que no tempo zero (antes da exposição solar), a porcentagem de inibição para todas as variáveis é aproximadamente zero. Ou seja, a massa contida na alíquota de 10  $\mu$ L (12 ng de paration metílico e 12 ng de clorpirifós) utilizada no início do experimento foi calculada para que a AChE apresentasse muito baixa inibição.

A partir do dia 1 (um) e nos dias seguintes, é possível notar que as amostras “claras”, ou seja, expostas diretamente a radiação solar, apresentaram uma curva ascendente de porcentagem de inibição, enquanto que as amostras “escuras”, não expostas à radiação solar, permaneceram estabilizadas próximas ao zero por cento de inibição. Este fato claramente nos leva a acreditar que a exposição dos

agrotóxicos organofosforados a luz solar gera produtos de degradação muito mais tóxicos que as substâncias originais, conforme demonstrado no trabalho de Araújo (2006). Conforme já comentado, a enzima acetilcolinesterase é mais sensível aos produtos de degradação, pois eles apresentam a ligação P=O diferentemente dos organofosforados originais que apresentam a ligação P=S. Uma vez que os organofosforados clorpirifós e paration metílico podem estar perdendo o S e formando os análogos oxon, espera-se que haja uma maior toxicidade do meio, comprovada por este teste.

As amostras “escuras” também apresentaram inibição da enzima, porém em menor grau o que talvez se deva ao fato que na ausência de luz solar ocorra outras reações de degradação que dão origem aos mesmos produtos ou outros, porém em menor quantidade.

A presença ou não de ácido húmico nas amostras, atua aumentando a velocidade em que ocorrem as reações de degradação conforme o trabalho de Araújo (2006), porém não apresentou diferenças significativas quanto à porcentagem de inibição da acetilcolinesterase nos experimentos realizados neste trabalho.

#### 4.3 TESTE METAMIDOFÓS

Os resultados obtidos no teste de degradação do metamidofós com variação do pH podem ser observados na Figura 19.

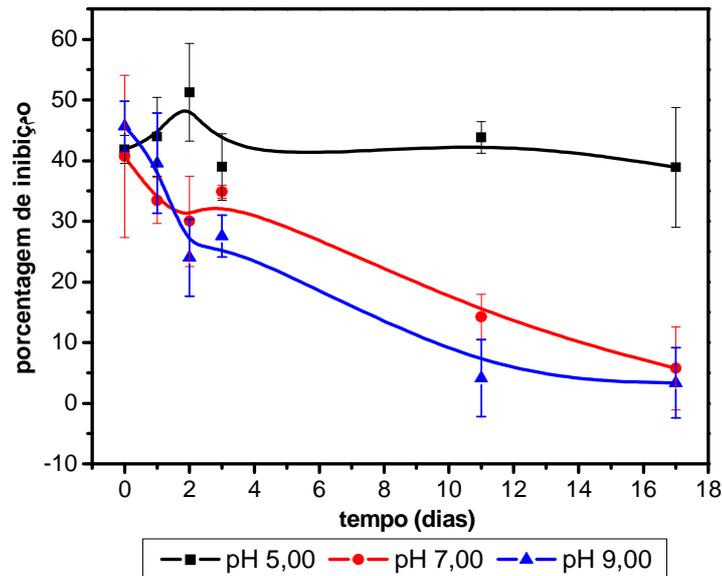


Figura 19 – Gráfico com os resultados do teste de degradação do metamidofós.

Uma vez que as soluções estavam acondicionadas em frascos âmbar podemos considerar que a degradação do metamidofós nessas condições ocorreu apenas por hidrólise. No dia zero, a inibição para os três valores de pH foi de aproximadamente 40%. Nos dias seguintes é possível notar que a inibição da solução de pH 5,0 se mantém constante, enquanto as inibições das soluções para pH 7,0 e 9,0 caem rapidamente. A diminuição da inibição da enzima ao longo da degradação por hidrólise do metamidofós nos leva a acreditar que são formados produtos menos tóxicos que o agrotóxico original. A Figura 15 também mostra que na solução de pH 5,0, a inibição é mais lenta, mostrando a menor taxa de degradação do metamidofós neste valor de pH em comparação ao da solução de pH 9,0. A degradação mais rápida em valores de pH 7,0 e 9,0 mostra uma maior instabilidade do metamidofós na solução e portanto sugere um menor tempo de meia vida, concordando com os resultados apresentados na literatura com relação a decomposição em altos valores de pH (LIMA, 2001).

## 5 CONCLUSÕES

O teste com a enzima acetilcolinesterase é simples e de fácil execução e já vem sendo utilizado na literatura, de acordo com a metodologia de Ellman, desde 1961 para diversos propósitos, tais como, biomarcador ambiental, testes de toxicidade e teste de novas drogas para o combate do mal de Alzheimer. A sua utilização para acompanhamento de degradação de agrotóxicos *in vitro*, conforme este trabalho, ainda é pouco explorada, porém com potencial para ser aplicada com o objetivo de avaliar a toxicidade em diferentes ensaios.

As curvas de calibração obtidas para o paration metílico e, seu produto de degradação, paraoxon metílico mostraram uma relação linear entre a massa dos agrotóxicos e a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase. Estes resultados mostraram também, que a faixa de inibição da enzima para o paration metílico ocorre na escala de nanograma do agrotóxico, enquanto que para o paraoxon metílico, a escala é de picograma, mostrando que para os organofosforados, muitas vezes, os produtos de degradação são mais tóxicos que os agrotóxicos originais, pois uma menor escala de massa provoca a mesma faixa de inibição.

O acompanhamento do teste de degradação nos leva a concluir que a exposição direta dos agrotóxicos organofosforados à radiação solar gera produtos de degradação mais tóxicos que quando as amostras não são expostas a esta mesma radiação.

O teste com o metamidofós nos mostrou que o pH influencia diretamente na estabilidade deste agrotóxico em solução. Para um pH mais baixo (5,0), o metamidofós parece permanecer mais tempo em solução, uma vez que sua toxicidade frente a acetilcolinesterase permaneceu alta durante todo o período do experimento. Em valores de pH mais altos, observa-se uma maior instabilidade do metamidofós, uma vez que sua toxicidade diminui com o tempo de armazenamento. Estes resultados podem estar diretamente relacionados com o tempo de meia-vida do metamidofós em diferentes valores de pH, que fazem com que sua hidrólise, gere compostos menos tóxicos no meio, diminuindo assim a toxicidade da solução frente a AChE.

## Referências Bibliográficas

ANDREESCU, S., MARTY, J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensor: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, v. 23, n. 226, 2006, p. 1-15.

ANVISA. Nota Técnica – Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo da Parationa Metílico, Gerência Geral de Toxicologia, Ministério da Saúde, 2012, 95p.

ARAÚJO, T. M. R. Degradação de paration metílico em ambientes aquáticos naturais. UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, 2006, 117 p.

ARAÚJO, T. M. R. Princípios e diferentes usos do teste que avalia a inibição da enzima acetilcolinesterase. UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, 2012.

ARIAS, A. R. L., BUSS, D. F., ALBUQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R., BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e saúde coletiva*, v.12, n.1, Rio de Janeiro, Jan./Mar., 2007.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL (ANDEF). Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. *Revista Defesa Vegetal*, Maio de 2009.

BAIRD, C., CANN M. *Química Ambiental*. 4. ed., Porto Alegre: Bookman, 2011, 844p.

BENKE, G. M. Comparative Toxicity, Anticholinesterase Action and Metabolism of Methyl Parathion and Parathion in Sunfish and Mice. *Toxicology and applied pharmacology*, n. 28, p. 97-109, 1974.

BOCQUENÉ, G., Galgani, F. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Sciences: IFREMER internal report*, 1998.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Monografias dos Agrotóxicos*, 2002. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm)>. Acesso em: 31 mar. 2012.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Ambiente (CONAMA), 2005.

COLOMBI, J. S. Avaliação da acetilcolinesterase como biomarcador em experimento de contaminação in vitro com MeHg e HgCl<sub>2</sub> em *Hoplias malabaricus*. UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, 2009.

EDWARDS, C.A. Persistent pesticides in the environment. 2. ed. U.S.A.: CRC Press, 170p., 1973.

ELFVENDAHL, S. Detection of pesticide residues in water, sediment and fish in Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, State of São Paulo, Brazil. Uppsala. 50p., 2000.

ELLMAN, G. L.; K. COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. Jr.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

FIGUEROA-VILLAR, J. D., SILVA, G. R., BORGES, I., CASTRO, A.T.. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. *Química Nova*, vol. 35, Nº 10, 2083-2091, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília: Ibama, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996.

LIMA, F. J. C., MARQUES, P. R. B. O., NUNES, G. S., TANAKA, S. M. C. N.. Inseticida Organofosforado Metamidofós: Aspectos Toxicológicos e Analíticos. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 11, jan./dez. 2001.

LINDE, A. R., INÁCIO, A. F., NOVO, L. A., VIANA, T. A. P., AIBUQUERQUE, C.. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. *Mundo & Vida*, 2005.

MANSOUR, M., FEICHT, E. A., BEHECTHI, A., SCHEUNERT, I. Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil. *Chemosphere*, nº 35, p. 39-50, 1997.

PATNAIK, P. A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances. 3 ed., 2007.

PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2001.

PORTAL, T. P. Avaliação da qualidade de águas de poços rasos consumida por agricultores familiares no Norte Fluminense. UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, 2011.

RAND, G. M., PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York: Hemisphere, p.1-28, 1985.

SANTOS, V. M. R., DONICCI, C. L., DACOSTA, J. B. N., CAIXEIRO, J. M. R.. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. Química Nova, vol.30, n.1, p. 159-170, 2007.

SILVA, L.R. Reavaliação de Agrotóxicos no Brasil, Seminário da ANVISA, 2010. <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/tallerplagui/Brasilrodriguez2.pdf>, acessado em fevereiro de 2013.

SPRAGUE, J. B. Factors that modify toxicity. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York: Hemisphere, p.124-163, 1985.

STENESH, J. Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). Biochemistry. New York: Plenum, 1998.

TOMITA, R. Y., BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Biológico, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, jul./dez., 2002.

UASKA, Â. R.. O uso indiscriminado de agrotóxicos: Uma reflexão sobre o município de Morretes. (PUC-PR), Curitiba. 1987.

VEIGA, M. M., SILVA, D. M., VEIGA, L. B. E, FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, nov, 2006.

VIANNA, M. S. Desenvolvimento de biosensor multiparâmetros para análise de neurotoxinas em amostras clínicas e ambientais. PUC-RIO, 2012, 213 p.

VIANNA, M. S. Pesticidas em solos agrícolas de Nova Friburgo, RJ: aplicação da metodologia enzimática de inibição da AChE e estudos da influência dos parâmetros de fertilidade do solo. PUC-RIO, 2008, 141 p.

VIDAL, S. P. Determinação da inibição da acetilcolinesterase nas águas de poços superficiais no Assentamento Zumbi dos Palmares por agrotóxicos organofosforados. UENF, Campos dos Goytacazes/RJ, 2011.

WOLFE, N. Abiotic Transformations in water, sediments and soil. Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America. p. 103-168, 1990.