

DETECÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS EM ÁGUAS ATRAVÉS DO MÉTODO ENZIMÁTICO

DJANIR DO ESPÍRITO SANTO

Farmacêutica/Bioquímica, Parasitologista e Sanitarista da Saneamento de Goiás S/A.
SANEAGO - Av. B, 570 - Jardim Goiás - CEP 74 805-100 - Goiânia - Goiás

INTRODUÇÃO

Entre as substâncias introduzidas no meio ambiente que poluem a água e o solo e que contaminam os alimentos, encontram-se os pesticidas, que são utilizados na agricultura, no combate às pragas e que são aplicados intencionalmente, como também com ocorrência accidental. Os efeitos positivos para o desenvolvimento da agricultura moderna, pecuária e saúde pública, no combate aos vetores de doenças, como Leptospirose, Chagas e outros, são inúmeros, porém tóxicos, e a toxicidade dos pesticidas é inerente ao produto e, como tal, o risco toxicológico está associado ao uso e às condições de exposição.

Os seres vivos podem absorver os pesticidas diretamente da água, como também por alimentos contaminados e ainda em suas aplicações. A cromatografia gasosa é atualmente a mais empregada na realização das análises de resíduos de pesticidas, porém exige um investimento inicial de grande porte, inviabilizando sua utilização na rotina. Metodologias novas apresentam sensibilidade e especificidade para um efetivo controle de qualidade.

A detecção de Organofosforados e Carbamatos,

através do método da medida da atividade anticolinesterásica, é semi-quantitativa, e serve para indicar se a água dos mananciais está em condições próprias para uso quanto à presença de pesticidas. Fornece, ainda, meios ao cumprimento dos dispositivos da Portaria 036, do Ministério da Saúde, de 19 de janeiro de 1990, em vigor.

Possíveis contaminações existentes nas regiões críticas dos cursos d'água são detectados, bem como são avaliados os despejos industriais e verificada a eficiência dos processos de tratamento. O método enzimático realizado "*In vitro*" é simples, de rápida execução e econômico, não sendo dependente de aparelhagem mais sofisticada, como o cromatógrafo de fase gasosa.

As análises são realizadas, fazendo-se uma bateria de testes, onde os padrões serão de concentrações conhecidas em relação à água destilada e deionizada e à amostra a testar, adicionando-se a todas, a enzima acetilcolinesterase e seu substrato acetilcolina. E os resultados destas análises serão expressos como porcentagem da inibição da atividade enzimática.

AÇÕES FISIOLÓGICAS (*In vivo*)

Um nervo transmite um estímulo de um ponto do organismo para o outro, através de modificações na concentração dos íons e, em muitos nervos, o estímulo é carregado, além do término do neurônio, sob a forma de acetilcolina. A chegada da frente da onda iônica a esse término provoca a liberação de acetilcolina, que se difunde dentro da célula receptora intimamente associado, da mesma forma que uma fibra muscular ou outro neurônio, promovendo a iniciação de uma nova onda de excitação no receptor.

Uma vez que a acetilcolina tenha provocado a resposta desejada, ela deve ser removida para permitir a recuperação do receptor para um estímulo futuro ou para evitar respostas repetidas e desencontradas, após um único estímulo. Esta remoção é feita pela hidrólise do composto com formação de colina e ácido acético, sendo a reação catalisada pela colinesterase. A colina é reaproveitada na biossíntese da acetilcolina.

Interação Enzima e seu Inibidor Organofosforado

Muitos autores têm sugerido ser a inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados "A causa principal das anormalidades da transmissão

neuromuscular", sendo os sinais e sintomas de intoxicação proporcionais ao nível da atividade da enzima.

Experimentos recentes confirmaram essa concepção da dependência dessas anormalidades sobre o acúmulo da acetil colinesterase por organofosforados. Entretanto, alguns autores têm alegado uma reação direta do composto organofosforado na função neuromuscular, não havendo uma relação entre os efeitos desses compostos na acetilcolinesterase e na transmissão neuromuscular.

A reação entre acetilcolinesterase e seu inibidor organofosforado parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, sendo esta estabilidade relacionada fundamentalmente com a estrutura química do inibidor. A menos que um reativo específico seja empregado, esta inibição da acetilcolinesterase é irreversível e a volta aos níveis normais, dependendo da síntese de uma nova enzima.

Desta forma, a acetilcolina é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo um acúmulo da mesma, onde é normalmente liberada, resultando, em consequência, toda a sintomatologia da intoxicação por organofosforados.

A inibição da “acetilcolinesterase” por compostos organofosforados pode ser descrita como:

1) Ação Fisiológica da Acetilcolina

A acetilcolina sintetizada é liberada nas sinapses nervosas interagindo com os seus receptores, produzindo suas respostas características:

- 1 - Estímulo e tono dos músculos esqueléticos.
- 2 - Estímulo geral das secreções.
- 3 - Esvaziamento da bexiga.

2) Ação Fisiológica da Acetilcolinesterase.

As regiões ativas existentes na superfície da acetilcolinesterase permitem uma interação enzima-substrato, resultando da ação hidrolítica do centro esterásico, ocorrendo a transformação da acetilcolina em colina e ácido acético.

3) Mecanismo e Ação Tóxica dos Inseticidas Organofosforados

Os inseticidas organofosforados inibem o centro esterásico da acetilcolinesterase, incapacitando a mesma de exercer a função, ou seja, promove a despolarização da membrana axoplasmática, com conseqüência do acúmulo colinérgico, não havendo desdobramento em ácido acético e colina.

4) Inseticidas Carbamatos

À semelhança dos inseticidas organofosforados, os inseticidas carbamatos e seus metabólitos agem inibindo a acetilcolinesterase, diferenciando-se pelo fato da combinação se processar de uma maneira mais reversível, resultando, todavia, sempre num acúmulo de acetilcolina onde é normalmente liberada.

Princípio do método

Esta técnica baseia-se na extração e purificação da enzima acetilcolinesterase extraída dos cérebros de rato ou boi que têm uma fração solúvel, específica, capaz de interagir com organofosforados e carbamatos.

a) Equipamentos:

- Ultra centrífuga refrigerada (mínimo 20000 rpm)
- Banho-Maria termostatzado a 37°C (com agitação)
- Balança analítica
- Potenciômetro
- Agitador magnético
- Mix (tritador doméstico)
- Cronômetro
- Destilador
- Deionizador
- Pipetador automático de 500 microlitros

b) Reagentes

- Cloreto de Sódio (NaCl)
- Triton X - 100

- Azida sódica (NaN₃) (MERK)
- Tris (hidroximetilaminometano) (MERK)
- Cloreto de magnésio 6H₂O (MERK)
- Acetilcolina (C₇H₁₆ClNO₂) (MERK)
- Ácido Sulfúrico comercial (H₂SO₄)
- Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇)
- Extran

c) Soluções utilizadas

- Solução Fisiológica (NaCl - 0,15 M)
- Triton X-100 (0,5%)
- Tampão Tris (0,08 N) x Cloreto de Magnésio (1,6 N)
- Azida sódica - 0,05% (do peso inicial do cérebro)
- Solução de Acetilcolina (0,28 N)
- Solução padrão de Folidol nas concentrações de: 0,006, 0,012, 0,06, 0,12, 0,24, 0,36 e 0,6 miligramas por litro – extração com água.
- Solução padrão de Folidol nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75 miligramas/litro, extração com diclorometano e suspensão em água.

Obs.: Os reagentes utilizados deverão ser do mais alto grau de pureza, para obter uma enzima com melhor atividade enzimática.

É importante eliminar qualquer traço de interferentes do material a ser utilizado nas análises. Para proceder a limpeza dos mesmos, utilizou-se detergentes neutros (Extran a 1% ou Detertec) e ácido nítrico diluído.

Metodologia para extração da enzima acetilcolinesterase

- 1) Coletar o cérebro de boi imediatamente após sua morte e acondicioná-lo em um bequer, contendo soro fisiológico gelado;
- 2) Limpá-lo criteriosamente, retirando meninges, gorduras e vasos sanguíneos (mantendo-o em solução fisiológica gelada);
- 3) Secar e pesar de acordo com a capacidade de volume das centrífugas, e adicionar 5,5 volumes de água destilada e deionizada gelada (de acordo com o peso inicial do cérebro);
- 4) Homogeneizar num mix por 5 minutos;
- 5) Ultracentrifugar a 5°C com 20.000rpm durante 120 min;
- 6) Desprezar o sobrenadante;
- 7) Suspender o precipitado em 3,3 volumes de solução de Triton X-100 (0,5g%) V/V pelo peso inicial do cérebro (P1);
- 8) Homogeneizar no mix por 15min;
- 9) Ultracentrifugar a 20.000rpm por mais 120min a 10°C;
- 10) Coletar o sobrenadante e descartar o sedimento;
- 11) Adicionar 0,05g% de azida sódica (de acordo com o peso inicial do cérebro);
- 12) Acondicionar em frascos âmbar e em geladeira;
- 13) Proceder o teste de atividade da enzima, realizando a técnica para a dosagem analítica, utilizando água destilada e deionizada e verificando o tempo da atividade enzimática.

Procedimento para realização das análises dos organofosforados e carbamatos.

Coleta de amostras

Os inseticidas organofosforados e carbamatos e alguns herbicidas podem sofrer mais rapidamente alterações químicas, sob condições naturais, formando metabólitos de composição constantemente mutante no ar, na água e nos organismos da cadeia alimentar. Portanto, é importante enviá-la ao laboratório sobre refrigeração, mantê-la, nesta condição, até o momento da análise.

Teste da presença de água tamponada e interferentes.

Consta de um teste prévio que deverá ser feito quando em casos de despejos industriais ou um pH estranho. Outra alternativa seria a extração do pesticida, através do diclorometano.

Técnica de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos e organofosforados em água.

Princípio da metodologia analítica

O método proposto é baseado na queda do pH do meio de incubação provocado pela formação de ácido acético mais colina, produto de hidrólise da acetilcolina. Esta técnica permite a leitura de carbamatos e organofosforados em amostras de águas.

Desenvolvimento da técnica

1) Preparar tubos de ensaio para o teste branco (B),

amostra (A) e padrões (P). Usar sempre tubos testemunhos;

- 2) Colocar nos tubos de ensaios correspondentes: 16,0 ml de água destilada e deionizada, 16,0 ml de cada amostra a ser analisada e 16,0 ml de padrão de concentração conhecida.
- 3) Adicionar a cada tubo de ensaio 3,0 ml da enzima acetilcolinesterase;
- 4) Acrescentar 0,5 ml da solução tampão (Tris X Cloreto de Magnésio);
- 5) Incubar em banho-maria com agitação a 37°C durante 3 horas;
- 6) Retirar os tubos um a um verificando o pH e corrigindo se necessário para aproximadamente 7,4;
- 7) Acrescentar 0,5 ml de acetilcolina (substrato);
- 8) Esperar o pH atingir 7,3, acionar o cronometro, e pará-lo, quando atingir 7,0;
- 9) Anotar o tempo gasto.

Cálculo da porcentagem da inibição da atividade enzimática

$\% \text{ inibição} = \frac{T_2 - T_1}{T_2} \times 100$, sendo:

T_1 = Tempo gasto pelo controle (água destilada)

T_2 = Tempo gasto pela amostra a testar

Obs.: T_1 e T_2 são expressos em segundos

A leitura é feita em comparação à curva de padrões de concentração conhecida (Gráficos 1 e 2 - Anexo).

Interpretação

De acordo com a Portaria 36, do Ministério da Saúde, de 19 de janeiro de 1990, o limite permissível para abastecimento público é de 10 microgramas por litro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das análises realizadas conclui-se que:

- no teste em branco, a enzima ficando livre, atua sobre a acetilcolina que se desdobra em ácido acético e colina. Dependendo da qualidade de enzima, esta reação poderá se processar em curto espaço de tempo;

- na presença da organofosforados e carbamatos, a enzima reagirá com os mesmos. Desta maneira, dependendo da quantidade de resíduo presente na amostra, o desdobramento da acetilcolina será parcialmente inibida. Havendo inibição total, não haverá desdobramento em ácido acético e colina, isto indica proporcionalidade da reação com a quantidade de resíduos presentes na amostra.

Na construção das curvas onde se usa concentrações conhecidas e crescentes de carbamatos

e organofosforados, a metodologia demonstra eficácia, pois a inibição da atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração dos resíduos

De acordo com o tempo ocorrido no desdobramento da acetilcolina, pode-se avaliar o grau de contaminação da amostra. Com o porcentual de inibição da atividade enzimática incidindo na curva de concentração conhecida de carbamato ou organofosforado, pode-se avaliar semi-quantitativamente o teor do resíduo na amostra.

Diante dos mecanismos fisiológicos "in vivo" e das análises realizadas "in vitro" podemos afirmar que a metodologia é eficiente e pode contribuir na detecção de carbamatos e organofosforados em água e viabilizar o atendimento da Portaria em vigor.

CONCLUSÃO

O método "In vitro" para substâncias inibidoras da colinesterase em água é satisfatório, porque os organofosforados e carbamatos possuem o mesmo tipo de atividade biológica, não sendo necessário determi-

nar o total exato de cada pesticida, pois é preferível determinar a inibição da colinesterase total causada pelo pesticida.

É uma metodologia que requer cuidados espe-

ciais, assepsia, atenção e um controle sistemático para verificação da atividade enzimática "in vitro". Por outro lado, como a técnica analítica para detecção de fosforados e carbamatos é simples em comparação a Cromatografia Gasosa, torna-se viável o atendimento à Portaria do Ministério da Saúde em vigor.

As demais metas almejadas será em acondicionar as soluções enzimáticas em ampolas ou frascos de 3ml, para fornecimento aos laboratórios das regionais,

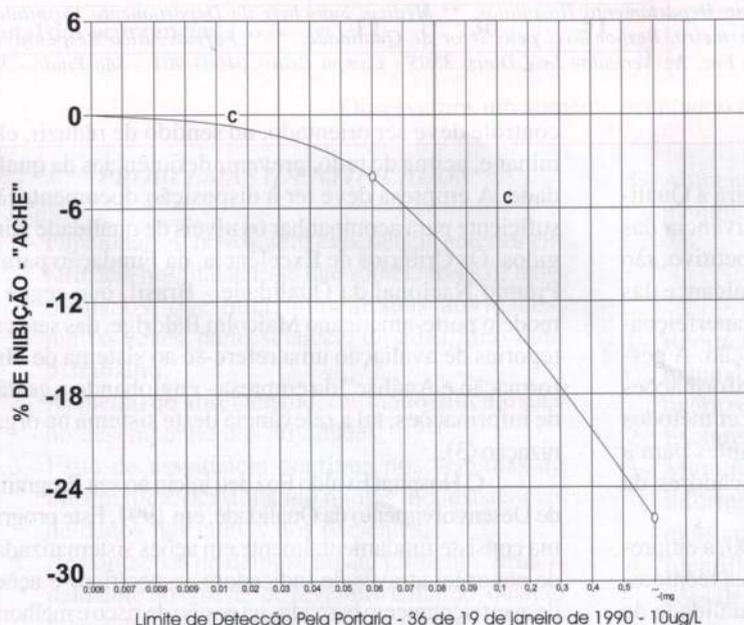
o mais rápido possível, uma vez que os fosforados e carbamatos sofrem alterações químicas, formando metabólitos e passando a não ser indicativa a sua presença. Portanto, a análise deverá ser realizada dentro do prazo de 24 horas.

É também nossa pretensão fornecer a outros laboratórios ambientais de saneamento a custo razoável, de modo a lhes ser útil e também servir de subsídio para nosso laboratório.

BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 15 ed. Washington, D.C., AWWA/WPCF, 1980. 113P. il.
- BERTRAM, G. Katzung, MD, Phd - *Introdução à Farmacologia Autônômica*, 61-65.
- COHEN, P.P. Transamination with purified enzyme preparations (transaminase). *J Biol. Chem.*, 136: 665-85, 1940.
- DALELA, R.C. et alii. Adenosine triphosphatase in few tissues of a fresh water teleost, *Channegachua* following "In Vivo" exposure to endowsulfan. *Toxicology*, 11: 361-68, 1978.
- DU BOIS, K.P. et alii, studies on the toxicity and mechanisms of action of p. mitrophenil die thy trionophosphate (Parathion) *J. Pharmacol. Exp. ther*, 95: 79-91, 1949.
- DUFFUS, I. H. Environmental toxicology. S. 1. Ed. Edward Arnold, 1980. p. 58-68.
- E.U.A. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, *Water quality criteria*. Washington, DC., 1972.
- E.U.A. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY & MASSACHUSETTS, UNIVERSITY. Department of Enviromental Science. *Principles and procedures of aquatic foxicology* por C. Medeiros et alii. Cintinnatti, Ohio, 1981. 24f. il.
- MAIN, A.R. Stecture and inhibitions of cholinesterase. In: Goldberg, M. & Marin, I. ed., *Biology of cholimargia function*, New York, Ravem Press, 1976.
- MURPHY, S.D. Malathion inhibition of esterases as a determinaret of malathion toxicity. *J Pharmacd Exp Ther*, 199:572-83, 1957.
- NELSON, S.C. Effects of the inseticide endrin erpon the alkaline phosphatase level of the albino rat. *Wah Agric. Coll. Mono. Ser. 3*: 79-80, 1955.
- NOCE, E. Técnicas Bioquímica "in vitro" para controle de qualidade de água. Sociedade Brasileira de Toxicologia, 1988.
- POORE, R. E. & NEAL, R. A. Evidence for extrahepatic metabolism of parathion, toxicol. *App. Pharmacol.*, 22: 759-68, 1972.
- RARONCZAY, Z. et alii, Purification and properties of the membrane Bound acetyl cholinesterase from adult rat brain. *Biophys. J.*, 49:491-93, 1951.

GRÁFICO 1: CURVA PADRÃO DO METIL PARATION EM ÁGUA PELA INIBIÇÃO DO ENZIMA ACETILCOLINESTERASE



Legenda

C	XT	% I.A.
B	391"	---
0.006	384"5	00
0.012	397"	1.51
0.06	407"	3.93
0.12	410"5	4.75
0.24	477"5	18.1
0.36	476"	---
0.6	534"	26.8

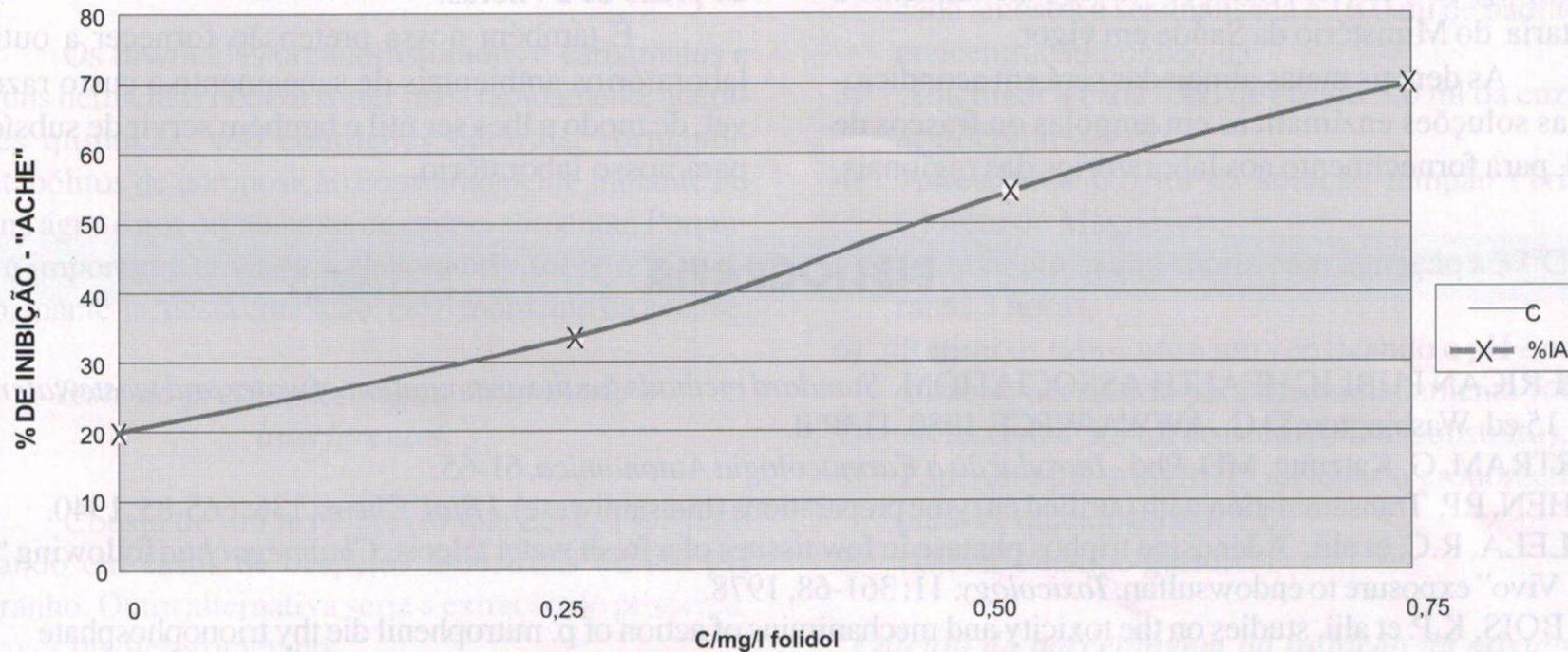
Obs.: C = Concentração

XT = Média de Tempo Gasto

% I.A. = Inibição da Acetilcolinesterase (ACHE)

Limite de Detecção Pela Portaria - 36 de 19 de janeiro de 1990 - 10µg/L

CURVA DE PADRONIZAÇÃO DA RESPOSTA DO ENZIMA AO METIL PARATION (FOLIDOL) DOSADO COLORIMETRICAMENTE UTILIZANDO-SE COMO REFERÊNCIA UMA SOLUÇÃO 1mM DE p-NITROFENOL EM ÁGUA



Limite Detecção Pela Portaria 36 de 19 de Janeiro de 1990 - 10ug/l de carbamatos e fosforados em água

LEGENDA		
C	XT	% iA
B	268"	O
0,25	390"	34
0,50	680"	55
0,75	905"	70

OBS.:

C = Concentração

XT = Média de Tempo Gasto

% I.A. + Perc. Inibição da Acetilcolinesterase (ACHE)

Utilizado na extração pelo dicloro metano