

Presença de pesticidas anticolinérgicos (organofosforados e carbamatos) em frutas e hortaliças no município de Cabo Frio, RJ

Presence of anticholinergic pesticide (organophosphate and carbamate) in fruits and vegetable in Cabo Frio city, RJ

Claudia Cristina Machado de Figueiredo de Oliveira*

Kayte Chaves Oliveira**

Moacelio Verânio Silva Filho***

Manildo Marcião de Oliveira****

No estudo em questão, utilizou-se a inibição da enzima acetilcolinesterase para detectar pesticidas organofosforados e carbamatos em frutas e hortaliças consumidas na cidade de Cabo Frio. Hortaliças e frutas ali coletadas, em anos distintos (1996 e 2007) apresentaram pesticidas em todas as amostras. As amostras de alface (1996) e agrião (2007) foram as que apresentaram maiores teores de equivalentes de metil-paration, 0,7 e 1,4 ppm, respectivamente. Os níveis mais baixos foram detectados nas uvas: 0,2 ppm. A solubilização dos compostos envolvidos no estudo em Triton X-100 foi eficiente sem inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase. Entre os alimentos estudados, a alface, o agrião e a maçã são merecedores de atenção para monitoramento de resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos.

The study used acetylcholinesterase enzyme inhibition to detect organophosphate and carbamate pesticides in fruits and vegetable consumed in the City of Cabo Frio. Vegetable and fruits collected in the area in distinct years (1996 and 2007) present pesticide in all samples. The samples of lettuce (1996) and watercress (2007) presented the highest rates of parathion-methyl equivalent 0,7 and 1,4 ppm, respectively. The lowest levels were detected in grapes: 0,2 ppm. The solubilization of compounds involved in the study in Triton X-100 were efficient without inhibiting the activity of acetylcholinesterase enzyme. Among the samples studied, lettuce, watercress and apples are valuable in the monitoring of residues of organophosphorus and carbamate pesticides.

Palavras-chave: Organofosforados.
Carbamatos. Acetilcolinesterase. Frutas.
Hortaliças.

Key words: Organophosphates. Carbamates. Acetylcholinesterase. Fruits. Vegetables.

Introdução

O uso de pesticidas ainda é a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento suficiente e de qualidade para a população (CALDAS; SOUZA, 2000). De um modo geral, os agentes químicos mais usados são os herbicidas, os inseticidas e os fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais

* Mestre em Biologia – Universidade Veiga de Almeida – *Campus* Cabo Frio

** Graduanda em Enfermagem - Universidade Veiga de Almeida – *Campus* Cabo Frio

*** Doutor em Biologia – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

**** Doutor em Biologia – UPEA/Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense – *Campus* Campos Centro

utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001). Os inseticidas pertencentes às categorias dos compostos organofosforados e dos carbamatos apresentam mecanismo comum de ação, baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), e são os responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (MACQUEEN, 1995). Os objetivos do presente estudo são, usando como base a técnica enzimática de detecção de organofosforados e carbamatos, avaliar a possibilidade de solubilizar pesticidas presentes na superfície de frutas e hortaliças com Triton X-100 e determinar sua concentração pela inibição de uma preparação de AChE. Para tal, utilizamos frutas e hortaliças consumidas cruas, vendidas à população em feiras livres, mercados e “hortifrutis”, comparando coletas realizadas em 2007 com as realizadas em alfaces, em 1996, na cidade de Cabo Frio.

Métodos

Preparação de AChE

Ratos albinos adultos (200g) foram sacrificados, após anestesia com éter, sendo que, na sequência, seus cérebros foram removidos e homogeneizados em 3 a 5 volumes de água destilada, através de 20 passagens em aparelho de Potter. Em seguida, este material foi centrifugado a 20000 x g por duas horas, a 5o C, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 3 a 5 volumes de Triton X-100 a 0,5% e passado cinco vezes em aparelho de Potter. Após 30 minutos, sob agitação constante, este material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sedimento foi descartado e, ao sobrenadante, foi adicionada azida sódica até concentração de 0,05%.

Soluções do pesticida

As soluções de uso foram preparadas a partir do produto comercial FOLIDOL P-600, que tem como único princípio ativo metil-paration a 600 g/L. Uma solução estoque a 300 ppm foi preparada por diluição direta deste produto em uma solução contendo 3 mM de Triton X-100 e 1 mM de HCl (pH=3). Após confirmação da concentração do metil-paration por formação de para-nitrofenol, uma solução de uso com exatamente 16 ppm foi preparada por diluição da solução estoque em tampão de extração. A solução estoque foi conservada por até três meses em geladeira, confirmando-se o título a cada diluição. A solução de uso foi preparada no mesmo dia da dosagem.

Tampão de extração

Este tampão foi idealizado de modo a garantir a solubilização dos resíduos de pesticida da superfície dos vegetais e conferir um pH ideal para a ativação. O EDTA foi adicionado para proteger a enzima de possíveis metais pesados. A composição do

tampão foi a seguinte: 3 mM de Triton X-100 para espectroscopia; 3mM de EDTA e 5 mM de TRIS.HCl pH=7,2. Este tampão permite que a enzima seja avaliada, tanto por métodos colorimétricos, quanto pela variação do pH.

Teste com diferentes detergentes

Foram testados o detergente iônico dodecilsulfato de sódio (SDS) e o detergente não iônico Triton X-100.

Extração dos pesticidas e inibição de AChE

Cerca de 50 g de folhas e/ou de frutas, adquiridas no comércio local, foram colocadas em sacos de polipropileno e lavadas por 10 minutos com 50 mL de tampão de extração. Após filtração, 1 mL deste extrato foi diluído com 1 mL de tampão de extração, seguindo-se uma diluição seriada com base 2 até 1/32, neste mesmo tampão. Estas diluições, com volume final de 1 mL, foram feitas em tubos 13/100 mm, usados diretamente no colorímetro para a dosagem da enzima. A cada tubo, foram adicionados 100 µL da preparação de AChE, diluída para uma atividade de 0,15 unidades por mililitro. Estes tubos foram incubados por diferentes tempos, seguindo-se a avaliação da atividade residual de AChE. Em todas as determinações foram conduzidos controles nos quais a enzima foi incubada em tampão de extração.

Locais de coleta

As alfaces, em 1996, e as hortaliças e frutas de 2007 foram obtidos de “hortifrutis”, supermercados e feiras livres da cidade de Cabo Frio.

Determinação colorimétrica da atividade residual de AChE [conforme adaptação do método de Ellman (1961)]

Para o colorímetro Metronic, foram adicionados 1000 µL de reagente de cor (DTNB) e 1000 µL de substrato (33-14,1 mM de propioniltiocolina), levando o volume final para 2100 µL. As variações de absorvância a 410 nm foram anotadas a cada 30 segundos, por 300 segundos, e a atividade, expressa em absorvância/minuto.

Ao colocarmos o tubo no colorímetro, foi necessário zerar a absorvância a 410 nm, contra um “branco” de água destilada. Medimos o acréscimo de absorvância (densidade ótica) a cada 30 segundos, durante, pelo menos, cinco minutos. Usamos um cronômetro para medir, com exatidão, o tempo. O acréscimo da absorvância deve ser linear em função do tempo.

Calculamos a média de acréscimo de absorvância por minuto. Este valor determinado para o controle (extrato de água destilada) corresponderá a 100% da atividade enzimática. Determinamos 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.

Interpolamos os resultados de percentagem de inibição das amostras na curva padrão de metil-paration e expressamos os resultados em ppm de equivalentes em metil-paration.

Para fins práticos de rotina, foi necessário fazer-se, apenas, um padrão correspondente a 0,5 ppm de metil-paration, pois este é o limite que deve definir se a amostra está dentro ou fora das especificações (ANVISA, 2003a).

Resultados

A determinação da sensibilidade do extrato de cérebro de rato rico na enzima acetilcolinesterase foi estabelecida por ensaio de inibição com metil-paration e confirma a sensibilidade do extrato utilizado nos ensaios (figura 1).

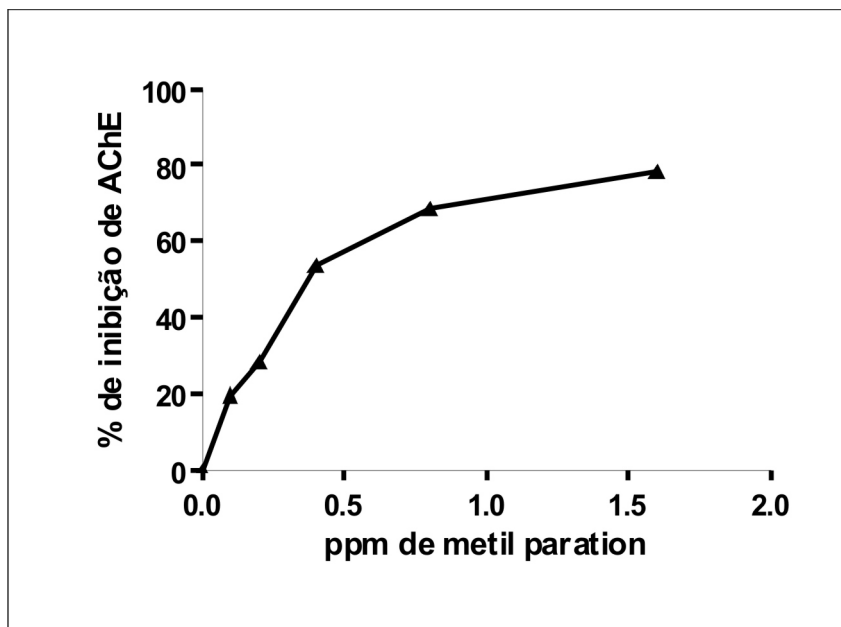


Figura 1 - Curva de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) do *kit* obtido do Laboratório EnzitoX-UERJ, realizada em 21 mar. 2007

Na comparação entre os detergentes, o dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100, o SDS inibiu a AChE em valores acima de 1 mM, enquanto o Triton X-100 não promoveu alteração na atividade enzimática (figura 2).

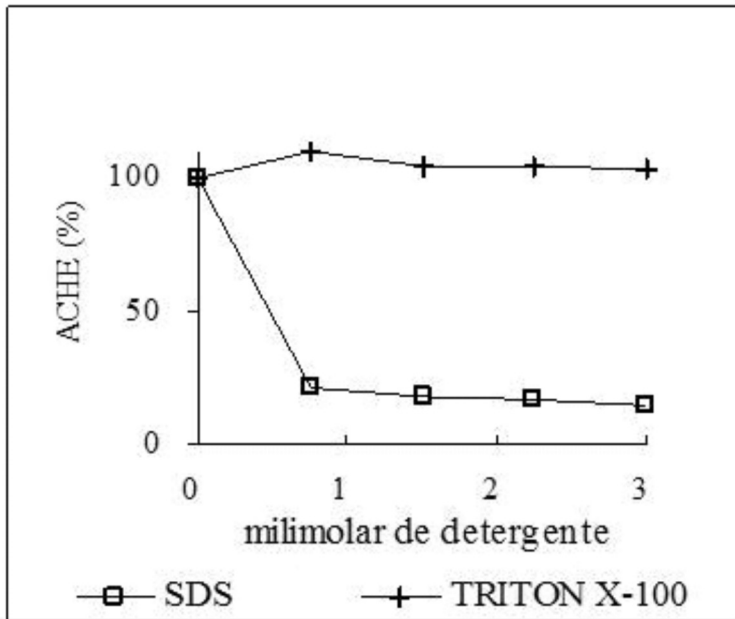


Figura 2 – Influência dos detergentes SDS e Triton X-100 sobre a atividade da enzima AChE

Entre as amostras coletadas, o agrião foi a hortaliça que apresentou valor acima de 0,5 ppm, seguido pela alface, couve e maçã (figura 3).

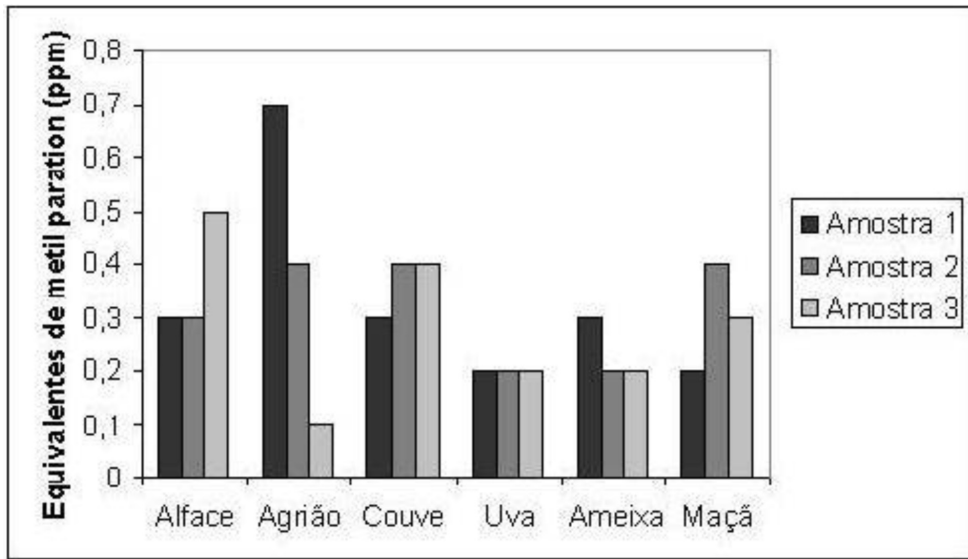


Figura 3 - Avaliação de Resíduos de Pesticidas Anticolinérgicos (Organofosforados e Carbamatos) em Frutas e Hortaliças no Município de Cabo Frio em 2007. Cada barra é obtida por média de duas dosagens

Entre as amostras de alface, as coletadas em 17/01/96 e em 08/02/96 estão acima dos 0,5 ppm. Estes valores de equivalentes de metil-paration representam mais de 40% de inibição da enzima acetilcolinesterase. O terceiro maior valor em equivalente de metil-paration foi encontrado na coleta do dia 07/02/96 (0,47 ppm) (figura 4).

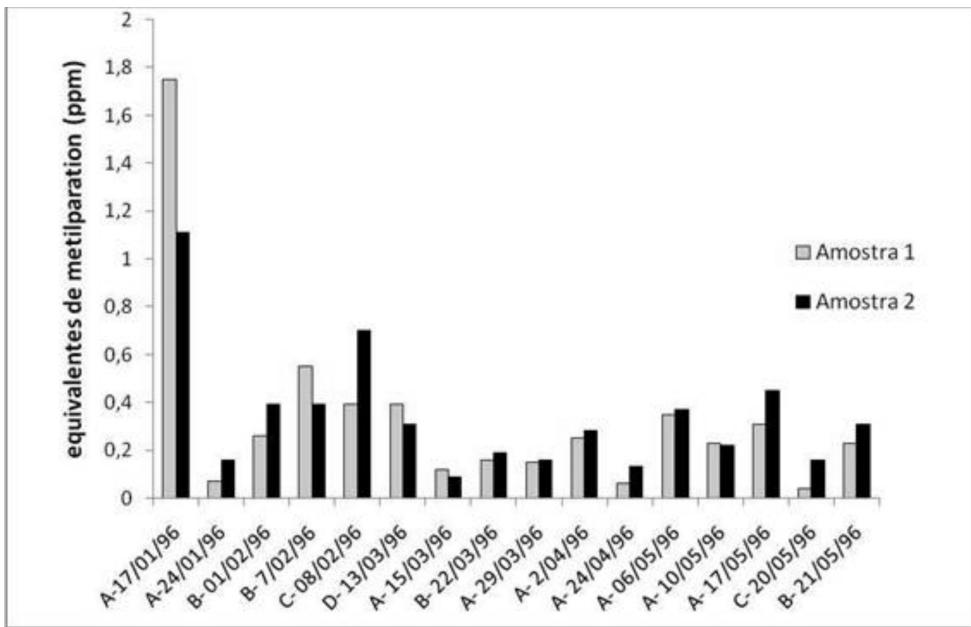


Figura 4 – Biodetecção de resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos pelo método enzimático (AChE) em alfaces coletadas na cidade de Cabo Frio no ano de 1996. A, B, C e D = locais de coleta. Cada barra é obtida por média de duas dosagens

Discussão

A curva de inibição para o extrato enzimático de acetilcolinesterase expressa em equivalentes de metil-paration indicou sensibilidade da enzima a um agrotóxico (Folidol P-600) usado em frutas e hortaliças, garantindo a confiança no método.

O detergente não iônico Triton X-100 é produzido por síntese química total, o que garante elevado grau de pureza. É também muito empregado na indústria devido ao seu elevado grau de detergência, ou seja, devido à sua alta capacidade de agir sobre substâncias aderidas a suportes sólidos. O fato de a enzima AChE ser completamente resistente a este detergente (figura 2), sem modificação de seu comportamento cinético e sem alteração da ativação de inibidores indiretos, como o parathion, permite claramente o seu emprego na solubilização de pesticidas aderidos à superfície de frutas e verduras (CUNHA-BASTOS *et al.*, 1991).

No Brasil, o limite permitido para pesticidas organofosforados e carbamatos em alimentos é variável de acordo com o composto químico e o alimento. Todavia, o LMR (limite máximo de resíduos) está entre 0,01 e 5 ppm (ANVISA, 2003a).

Dentre as amostras testadas, somente uma, em 2007 (0,7 ppm, para o agrião) e duas em 1996 (1,4 e 0,55 ppm, para a alface) foram mais elevadas (figuras 3 e 4).

Entretanto, mesmo de posse destes resultados, não podemos afirmar que estas amostras seriam capazes de promover algum dano à saúde da população que as consumisse, pois ficamos na dependência do reconhecimento exato do agrotóxico e seu grau de toxicidade, bem como se o consumidor ultrapassou o IDA (ingestão diária aceitável). De qualquer forma, um nível mínimo de inibição foi observado em todas as amostras, que pode ser devido a este ou a outros fatores que não a presença de pesticidas.

O método empregado neste estudo não é capaz de identificar qual é o agrotóxico (organofosforado ou carbamato) responsável pela inibição, mas possui a vantagem de ser um método de baixo custo e de rápida execução em relação aos métodos cromatográficos. Os imunoenaios baseados em ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) são métodos que ganham cada vez mais espaço, porém necessitam da produção de anticorpos específicos para os agrotóxicos (*apud* STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005). Contudo, a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde no capítulo IV que se intitula “do padrão de qualidade” da água de consumo humano, em seu parágrafo 2, do artigo 14, estabelece o uso desta metodologia para controle de compostos organofosforados e carbamatos em água. Os limites máximos estão na ordem de 15 e 20% de inibição da enzima acetilcolinesterase de insetos e mamíferos, respectivamente.

Da mesma forma que esta técnica é aceita para análises de pesticidas anticolinérgicos em água, o mesmo pode se aplicar para os alimentos testados neste estudo.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou no Brasil, em 2001, o Programa de Análise de Registros de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e, já nos primeiros anos do programa, foi detectada redução na maior parte dos nove produtos analisados inicialmente (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate) (ANVISA, 2003a). Um ponto importante foi a detecção de mais de um tipo de agrotóxico nos alimentos analisados. Atualmente, o programa envolve grande parte dos estados da União, onde são monitorados resíduos de mais de 90 tipos de pesticidas e representa um avanço dentro das medidas relacionadas à avaliação de risco a saúde humana.

Em nosso estudo a alface e a maçã também estavam na lista da ANVISA. A alface, em especial, chama a atenção, por apresentar no relatório de 2007, 40% de resultados insatisfatórios. Em grande parte, este resultado se deve à inclusão de um pesticida carbamato não autorizado para a cultura: o ditiocarbamato. Nossos resultados com alface demonstram, tanto em 1996 quanto em 2007, que algumas amostras apresentaram alta taxa de inibição pelo método enzimático e um teor de equivalente de metil-paration alto para a maioria dos pesticidas autorizados para esta cultura: 1,4 ppm (1996) e 0,5 ppm (2007). Nesta situação, não estamos contando a possível presença de pesticidas não autorizados, nos quais os teores deveriam ser nulos.

Em relação à maçã, nossos resultados não foram tão altos, porém teores entre 0,2 ppm e 0,4 ppm podem ser excessivos para qualquer pesticida não autorizado pela ANVISA (2007). Os teores de uva foram sempre baixos: 0,2 ppm. O agrião apresentou teor mais alto entre as hortaliças em 2007 (0,7 ppm), demonstrando que este alimento, embora tenha apresentado apenas uma amostra contaminada, deve ter sua cultura monitorada mais ativamente. As hortaliças e frutas com teores mais altos de pesticidas chamam a atenção, pois em geral são alimentos consumidos *in natura*, o que aumenta os riscos de se ultrapassar a ingestão diária aceitável (IDA) destes pesticidas.

Conclusões

- O detergente não iônico Triton X-100 age de forma eficiente na solubilização de pesticidas orgânicos, sem promover inibição na atividade da Enzima utilizada como Biosensor;
- Alfaces, em pelo menos uma coleta em 1996, e agrião, em 2007, apresentaram teores mais altos, acima de 0,5 ppm de equivalentes de metil-paration, indicando serem hortaliças importantes para continuidade de monitoramento;
- Entre as frutas, a maçã alcançou o teor 0,4 ppm de equivalente de metil-paration.
- Extratos obtidos de igual forma de uvas estavam, todos, com teores inferiores a 0,25 ppm.

Referências

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos*: PARA. Resultados Analíticos de 2002. 2003a. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2002_an2.pdf>. Acesso em 22 jul. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos*: PARA. Relatório de atividades 2001-2006. 2007. <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 22 jul. 2008.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Rev. Saúde Pública*, v.34, n 5, p. 529-37, 2000.

CUNHA BASTOS, V. L. F.; CUNHA BASTOS, J.; LIMA, J. S. *et al.* Brain Acetylcholinesterase as an *in vitro* detector of organophosphorus and carbamates insecticides in water. *Water Research*, v. 25, n. 7, p. 835-840, 1991.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.

MACQUEEN, M. J. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin. Chim. Acta*, v. 237, p.91-105, 1995.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v.35, n 2, p.130-135, 2001.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 10(supl.), p. 91-100, 2005.

Artigo recebido em: 27 abr. 2010

Aceito em: 28 out. 2010

