Método desenvolvido no IQ **detecta presença de pesticida**

Varredura determina se amostra analisada contém inibidores de enzima

ISABEL GARDENAL
bel@unicamp.br

Foto: Antoninho Perri

Pulverização de lavoura: uso indiscriminado de pesticida pode piorar o nível de contaminação

O pesquisador Marcos Paulo Silva, do Instituto de Química (IQ), orientado pelo docente do mesmo instituto Matthieu Tubino, conseguiu determinar a presença de pesticidas da classe dos organofosforados em amostras aquosas com o emprego do método enzimático em sua tese de doutorado. Trata-se de um método analítico de varredura capaz de verificar se a amostra analisada contém inibidores da enzima colinesterase, uma vez que "esses pesticidas em questão são inibidores desta enzima", explica o químico. Com isso, o trabalho permitiu identificar as amostras contaminadas. A sua intenção era propor uma metodologia alternativa de varredura, que respondeu bem aos compostos organofosforados estudados, com a vantagem de apresentar um custo reduzido por análise, comenta ele. Embora as avaliações tenham sido feitas em laboratório, a ideia é desenvolver futuramente um *kit* compacto de análise que possa ser facilmente transportado para o campo.

Além da água, o método pode ser extrapolado para outros meios, como os alimentos e o solo. "É possível aplicar tal técnica também em frutas, desde que se faça a extração desse composto o que, neste caso, envolve uma etapa adicional de análise", frisa o autor da tese. O método não distingue o pesticida, porém é capaz de determinar se a amostra está contaminada por inibidores da acetilcolinesterase (importante na regulação dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor; tal enzima acelera a hidrólise de acetilcolina).

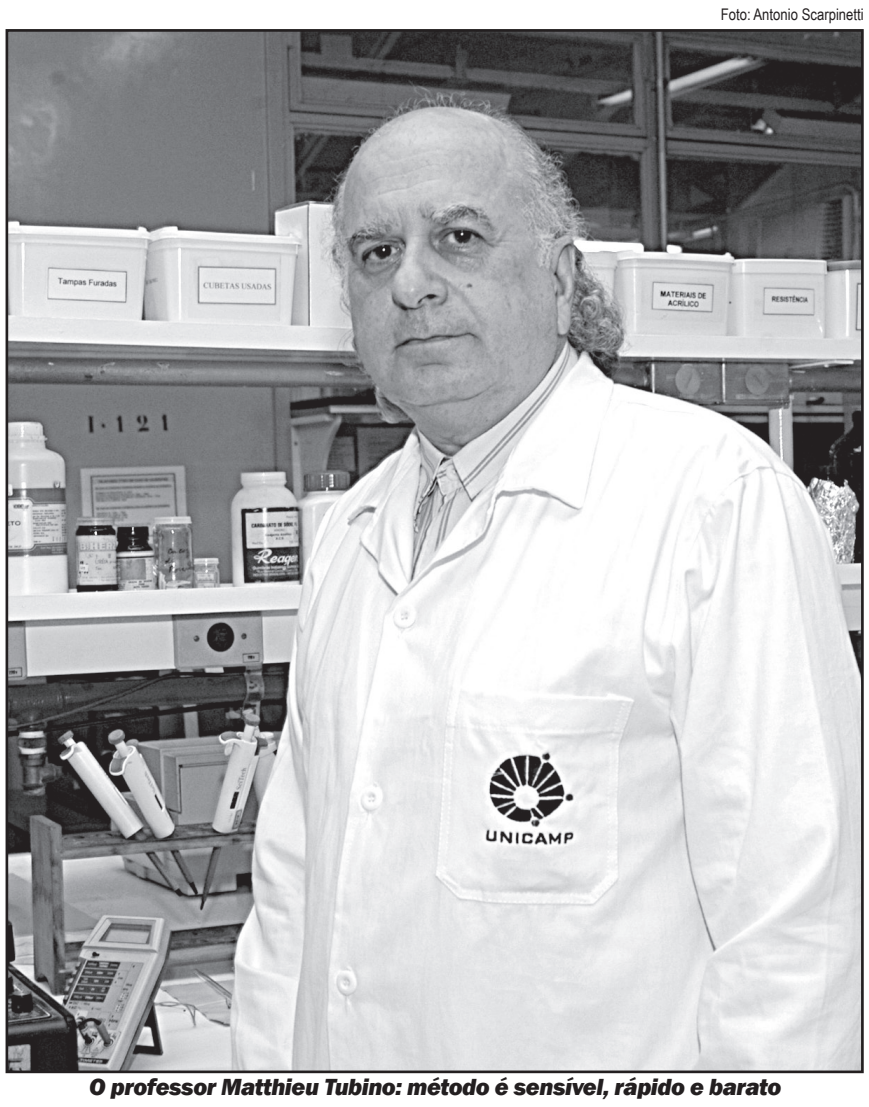
Esse método, revela Matthieu Tubino, é bastante sensível, rápido e dá mostras de chegar a um custo final relativamente baixo em relação aos métodos usuais. Ao colocar a amostra em contato com esta enzima, verifica-se se ocorre a sua inibição, que pode inclusive ser medida. O orientador informa que a acetilcolinesterase está presente nos insetos e nos mamíferos. Ele afirma que o seu orientando conseguiu multiplicar satisfatoriamente a sensibilidade do método a fim de aplicá-lo na varredura para determinar concentrações muito baixas. O docente garante que, para esse método, basta saber se existe algum nível de problema na amostra, o que já contribui para eliminar algumas etapas de trabalho em laboratório e economizar na realização das análises específicas.

Insegurança

Os pesticidas, afirma Marcos Paulo Silva, congregam várias classes. Na sua pesquisa, o químico estudou apenas a classe dos organofosforados, uma das mais utilizadas atualmente. É sabido que os organofosforados são amplamente adotados na agricultura como inseticidas. Também já foram usados como armas químicas e como agentes terapêuticos.

Para a sua determinação, o químico empregou um biossensor contendo a enzima acetilcolinesterase, responsiva aos pesticidas organofosforados e carbamatos. "A enzima ficava imobilizada em um reator através do qual o pesticida passava provocando a inibição enzimática. Baseando-se nessa inibição, fazia-se a determinação, permitindo identificar se a amostra estava contaminada ou não."

Foto: Antonio Scarpinetti



O professor Matthieu Tubino: método é sensível, rápido e barato

O pesquisador não chegou a obter amostra de campo. Ele próprio contaminou as amostras no Laboratório I-125 do IQ, com o fim de testar o método e verificar se ele respondia adequadamente. O método foi desenvolvido como uma técnica de varredura, reagindo aos pesticidas organofosforados. Para identificar um composto desta classe de maneira específica seria necessário realizar uma etapa adicional de análise empregando outra técnica para a sua identificação. O autor da tese de doutorado pontua que esse método é uma alternativa para conseguir detectar amostras contaminadas por organofosforados.

A enzima, conta o pesquisador, é sensível à temperatura e, assim, é perfeitamente possível influenciar os resultados dos experimentos. Como o trabalho foi desenvolvido no laboratório, a temperatura conseguiu ser controlada. Por outro lado, se a análise fosse conduzida no campo, sem controle algum da temperatura, isso certamente poderia influenciar nos resultados. "Não necessariamente de forma negativa", aponta o químico, "porém seria capaz de comprometer o tempo de vida da enzima", salienta.

Efeitos

Além dos organofosforados, existem mais classes ainda de pesticidas como a dos carbamatos e a dos organoclorados, por exemplo, entre outros. A diferença entre as classes de modo geral está mais localizada na estrutura química da molécula. Estes últimos, os organoclorados, foram inclusive proibidos no Brasil, por apresentarem uma grande estabilidade química, o que os levava a permanecer por um tempo demasiadamente maior do que o ideal no meio ambiente, sem falar nos efeitos cumulativos ao organismo, trazendo vários riscos.

No trabalho de Marcos Paulo Silva, o método foi idealizado para a determinação de pesticidas organofosforados, não sendo aplicável a compostos organoclorados e nem a outras classes, uma vez que eles não reagem a esta enzima, informa ele. "No caso dos pesticidas empregados neste estudo, o método seria útil para amostras de regiões agrícolas específicas, onde o uso de organofosforados é observado de maneira intensa como por exemplo nas culturas de soja, algodão e milho."

Um dos gargalos ainda por ser solucionado na problemática dos pesticidas é que o seu uso indiscriminado com certeza pode piorar o nível de contaminação, especificamente o seu excesso no ambiente. "Atualmente, com a demanda por alimentos, é preciso elevar a sua produção e está claro que sem o uso destes compostos isso não se tornará então possível", sugere o químico. "De outra via, o uso em quantidades adequadas é benéfico e colabora muito para aumentar a produção agrícola."

Segundo ele, alguns produtores lamentavelmente não seguem de modo algum as recomendações do agrônomo, profissional que faz os cálculos adequados para saber qual é exatamente o tipo de composto e a quantidade necessária a ser aplicada para aquela determinada cultura. "Existe inclusive uma série de diretrizes hoje para proceder a esta aplicação. O fato de não segui-las pode levar à contaminação ambiental e dos trabalhadores."

Impulsos

No sistema nervoso, os impulsos nervosos são transmitidos através de células nervosas denominadas neurônios. A comunicação ente os neurônios ocorre através dos axônios terminais de um neurônio e os dentritos de outro neurônio. Esses dentritos recebem os sinais de outra célula, que são difundidos do axônio da célula transmissora para o dentrito da célula receptora.

O contato entre os neurônios, assim como entre os neurônios e as células musculares ou células glandulares, são chamados de sinapses. Em uma típica sinapse, a membrana pré-sináptica (por exemplo, o axônio de um neurônio) é separada da membrana pós-sináptica (por exemplo, o dentrito de outra célula) pela fenda sináptica. Os impulsos nervosos se comunicam através da maioria das sinapses mediante transmissores químicos, que são pequenas moléculas difusíveis, como a acetilcolina (ACh) e a noradrenalina.

A acetilcolina é também um transmissor nos terminais das placas motoras (conexões neuromusculares), que são uniões entre o nervo e o músculo estriado. A chegada de um impulso nervoso dá lugar à liberação de acetilcolina na fenda sináptica. Então, a molécula de acetilcolina difunde-se até a membrana pós-sináptica, onde se combina a moléculas receptoras específicas, abrindo poros na membrana com diâmetros de aproximadamente 0,5 nm, suficientemente grandes para a passagem de cátions com bastante facilidade.

Isso produz uma despolarização da membrana pós-sináptica, a qual se propaga ao lado da membrana eletricamente excitável da segunda célula nervosa. Porém, a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase em milésimos – em ácido acético e colina –, e se restabelece a polarização da membrana pós-sináptica.

O período de tempo muito curto em que a acetilcolina permanece em contato com a membrana da fibra muscular é quase sempre suficiente para excitar a fibra muscular, e a remoção rápida da acetilcolina evita uma nova excitação após a fibra muscular ter-se recuperado do primeiro potencial de ação.

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal, contudo é rapidamente absorvida em várias pequenas vesículas sinápticas, cerca de 300.000 das quais existem normalmente em todos os terminais de uma única placa motora. Na matriz das fendas secundárias, há grande quantidade de enzima acetilcolinesterase (AChE), comumente denominada de forma reduzida como ChE, capaz de hidrolizar a acetilcolina.

A acetilcolina reage com uma serina específica do centro ativo da AChE para formar um intermediário covalente acetil-enzima, ocorrendo assim a liberação da colina. O intermediário acetil-enzima reage então com a água para formar acetato e regenerar a enzima livre o suficiente para iniciar uma onda de despolarização.

Publicação

Tese: "Determinação de pesticidas organofosforados através de método enzimático"
Autor: Marcos Paulo Silva
Orientador: Matthieu Tubino
Unidade: Instituto de Química (IQ)