



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**RENALLY BARBOSA DA SILVA**

**ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL DE RESERVATÓRIOS**  
**AQUÁTICOS POR MEIO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE**  
**HUMANA**

**SUMÉ-PB**

**2014**

**RENALLY BARBOSA DA SILVA**

**ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL DE RESERVATÓRIOS  
AQUÁTICOS POR MEIO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE  
HUMANA.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz**

**SUMÉ-PB**

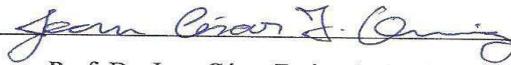
**2014**

RENALLY BARBOSA DA SILVA

**ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL DE RESERVATÓRIOS  
AQUÁTICOS POR MEIO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE  
HUMANA.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



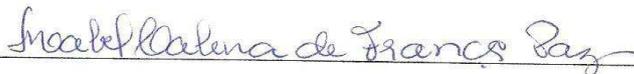
Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

Orientador



Prof. Examinador 01 – Examinador Interno UATEC- UFCG

Dra. Glauciane Danusa Coelho



Prof. Examinador 02 – Examinador Externo CCBS - UFCG

Dra. Mabel Calina de França Paz

Aprovada em, 12 de setembro de 2014.

S586a Silva, Renally Barbosa da.  
Análise da contaminação ambiental de reservatórios aquáticos por meio da atividade da acetilcolinesterase humana. / Renally Barbosa da Silva. - Sumé - PB: [s.n], 2014.

38 f; il.

Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Contaminação ambiental. 3. Água contaminada. 4. Saúde humana. 5. Sumé. I. Título.

CDU: 579.63 (043.3)

Aos meus pais, Severino Normando e Lúcia  
Barbosa, pela educação, incentivo, amor,  
carinho, compreensão e apoio ao longo da  
minha vida.

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido minha rocha e fortaleza nos bons e maus momentos da minha vida, por jamais me deixar desistir dos meus sonhos e por me dar a paz que é sede de todo entendimento e sabedoria nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus queridos Pais, Severino Normando e Lúcia Barbosa, pelo amor, pela dedicação, por sempre acreditar em mim e respeitarem as minhas escolhas, por estarem sempre tão perto mesmo estando tão longe. Sem vocês não teria chegado até aqui!

Aos meus irmãos, Pedro e Ruth, por apoiarem meus sonhos, por acreditarem na minha capacidade, por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem sempre.

Aos meus avós paternos Antônio (*in memoriam*) e Josefa, e maternos José Manoel (*in memoriam*) e Sebastiana por todo carinho, amor, confiança e admiração.

A Tales Rodolfo pelo seu apoio nas horas de desânimo, pelas palavras de estímulo, pelo amor e carinho que me fizeram encontrar paz em meio às turbulências.

Ao meu querido professor e orientador Jean César Farias de Queiroz pela amizade e carinho. Por jamais me deixar desistir desse projeto e por me mostrar que a pesquisa não acontece como idealizamos, e o aprendizado maior só acontece quando ela segue outro rumo.

À queridíssima professora Glauciane Danusa Coelho pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais. Com a senhora aprendi coisas que irei levar para vida, como a trabalhar a “inteligência emocional”.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer e crescer como profissional e pessoa, muito obrigada! A todos os professores sem distinção, aos que amam a profissão e aos que nem tanto. Pois, com os que amam aprendi como ser, como agir, aprendi que para ser professor uma formação não basta, é preciso doar-se. Com os que não amam o que fazem o aprendizado foi maior, pois, aprendi que a frustração envenena o homem e que uma vida sem amor de nada vale.

Aos meus queridos do PIVIC: Breno, Raíssa, Rhyanne e Rayza pela amizade, pelas deliciosas risadas, pelo trabalho em equipe. Um ano de ciência e de boas recordações!

À minha segunda família, que sempre esteve presente na minha vida nos últimos cinco anos: Bruna, Camila, Dayse, Felipe, Neto, Jucilene, Leandro, Raíssa, Rayza e Rhyanne, agradeço muito a Deus por ter colocado vocês na minha vida. Obrigada pelos momentos inesquecíveis, pelas risadas, pelo amor construído a cada dia, vocês tornaram meus dias mais agradáveis e me fizeram crescer muito como pessoa.

A José Marreiro (Neto) por está sempre comigo. Pelo carinho, pela amizade, por me aturar todos os dias. Tenha certeza que lhe conhecer me fez ser uma pessoa melhor.

Aos técnicos de laboratório, Adriano e Paloma pelo apoio e amizade.

À Amanda Nunes pelo apoio técnico e disponibilidade para realização das coletas de sangue.

Aos amigos que conquistei em Sumé: Mirelle Sampaio, Polly Souza, Raquel Juvêncio, Alêh Bernardo, Pablo Veronese, Fernanda Raquel, Dani Araújo e Julah Vasconcelos pela amizade, pelo apoio, pelo amor, pelas noites de estudos e risos, por fazerem parte da minha história.

À cidade de Sumé, por me acolher e por me proporcionar momentos inesquecíveis.

Muito Obrigada!

*“... Mas a vereda dos justos é como a luz da aurora que vai brilhando mais e mais até o dia perfeito...”*

Provérbios, 4: 18.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE- Acetilcolinesterase

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BchE- Butilcolinesterase

CDSA- Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

ChEs- Colinesterases

CONAMA- Conselho Nacional de Meio Ambiente

DBO- Demanda Bioquímica de Oxigênio

DDT- 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil) etano

DQO- Demanda Química de Oxigênio

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OD- Oxigênio dissolvido

OMS- Organização mundial da Saúde

ONU- Organizações das Nações Unidas

OPs- Organofosforados

RS- Resíduos Sólidos

RSU- Resíduos Sólidos Urbanos

UFMG- Universidade Federal de Campina Grande

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Mapa do Brasil com representação dos municípios segundo a forma de disposição final dos RSU .....	5
<b>Figura 2-</b> Disposição de embalagens de agroquímicos em vazadouros a céu aberto, segundo gestores municipais, 2008. ....	10
<b>Figura 3-</b> Mapa do Brasil, Estado da Paraíba, Município de Sumé e Localização do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido. ....	20
<b>Figura 4-</b> Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta de água para análise de contaminação .....	21
<b>Figura 5-</b> Pontos de coleta de água para análise de contaminação .....	21
<b>Figura 6-</b> Reação descrita no Método de Ellman e Colaboradores (1961) para detecção da atividade colinesterásica. ....	24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Produtos Domésticos Potencialmente Perigosos.....	7
<b>Tabela 2-</b> Efeitos nocivos dos metais a saúde humana e onde são encontrados.....	9
<b>Tabela 3-</b> Valores de absorvância, porcentagem de inibição e desvio padrão da curva.....	25
<b>Tabela 4-</b> Valores de absorvância e porcentagem de inibição das amostras de água obtidas no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA). .....	27

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Relação entre a absorvância e a atividade enzimática, relação entre concentração de inibidor e porcentagem de atividade de AchE .....	26
<b>Gráfico 2-</b> Relação entre concentração do inibidor (Malathion) e porcentagem de inibição da AchE do soro humano da curva padrão com erro .....	27
<b>Gráfico 3-</b> Concentração de inibidor e porcentagem de inibição enzimática da AchE do soro humano. ....	28

## RESUMO

O despejo de substâncias químicas, resultantes da disposição inadequada dos resíduos sólidos urbanos, é responsável pelas altas concentrações de substâncias tóxicas ao ambiente aquático. A maioria das cidades de pequeno porte, não dispõe de local adequado para disposição final dos resíduos, sendo utilizados vazadouros a céu aberto (lixões). As substâncias tóxicas presentes nos resíduos ficam expostas no solo e percolam atingindo os lençóis freáticos e depósitos de água. Testes enzimáticos *in vitro* para análise de águas contaminadas por pesticidas organofosforados e metais pesados tem sido alvo de várias pesquisas devido à alta sensibilidade e eficácia. Desse modo, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar se as águas dos reservatórios do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) recebem contaminantes oriundas do vazadouro a céu aberto do município de Sumé – PB. Para isso utilizou-se um método biológico, para detecção da inibição da enzima acetilcolinesterase (AchE) utilizando amostras de águas coletadas em dois pontos no CDSA. Neste teste *in vitro* utilizando como inibidor a água coletada do CDSA, a diminuição da atividade catalítica da enzima AchE em soro humano foi detectada. Na Represa 1 o valor de inibição AchE encontrado foi de 32,73% e na Represa 2 de 19,45%. Assim, pode-se afirmar que os reservatórios do CDSA estão contaminados por substâncias inibidoras da acetilcolinesterase provenientes do vazadouro municipal. Além disso, a utilização de um bioindicador humano permitiu inferência direta de riscos à saúde da população.

**Palavras-chave:** Resíduos Sólidos, Contaminação Aquática, Bioindicador, Saúde Humana.

## **ABSTRACT**

The dumping of chemical substances from improper disposal of solid waste is responsible for high concentrations of toxic substances in aquatic environment. Most small cities do not have adequate location for waste disposal, consequently, dumps are being used. The toxic substances in waste are exposed in the soil and percolate reaching groundwater and water reservoirs. Enzymatic in vitro tests for analysis of water contaminated by organophosphate pesticides and heavy metals has been the subject of numerous studies due to the high sensitivity and efficiency. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether the waters of the Center for Sustainable Development in Semi-Arid (CDSA) reservoirs receive contaminants originating from the Sumé city's dump. For this we used a biological method to detect inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) using water samples at two reservoirs in CDSA. In this in vitro test using as inhibitor of water collected at reservoirs, the decrease of the catalytic activity of the enzyme AChE was detected in human serum. At Reservoir 1, the value of AChE inhibition was 32.73% and 19.45% at Dam 2. Therefore, it can be stated that the CDSA's reservoirs are contaminated, from the municipal dump, by substances that inhibit acetylcholinesterase. Furthermore, the use of a human bioindicator allowed direct inference of risks to public health.

**Keywords:** Solid Waste, Aquatic Pollution, Bioindicator, Human Health.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>4</b>
2.1	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS	4
2.2	QUALIDADE DA ÁGUA	10
<b>2.2.1</b>	<b>Substâncias inibidoras da Acetilcolinesterase</b>	<b>12</b>
2.2.1.1	Metais Pesados	12
2.2.1.2	Agrotóxicos do grupo dos Organofosforados	12
2.3	BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA	16
2.4	BIOMARCADORES DE NEUROTOXIDADE- COLINESTERASES	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES	22
4.2	LOCAL E COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS	20
4.3	DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	22
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O monitoramento dos recursos ambientais vem ganhando destaque e sendo utilizado frequentemente para identificação dos mais diversos contaminantes, uma vez que as atividades antrópicas acarretam danos irreversíveis ao ecossistema. Apesar de muitos países, inclusive o Brasil, ter desenvolvido mecanismos reguladores, a fiscalização não é eficiente, assim, o despejo de substâncias químicas, resultantes do uso inadequado de agrotóxicos, e a disposição inadequada dos resíduos sólidos urbanos, são responsáveis pelas altas concentrações de substâncias tóxicas ao ambiente aquático. Os locais de disposição de resíduos sólidos tem tido atenção especial devido aos efeitos nocivos que acarretam ao solo, água e ar. O descarte inadequado de resíduos sólidos ocorre corriqueiramente e os resíduos são dispostos sem a observação das limitações impostas pelo ambiente e desobedecendo a normas e técnicas de manejo adequado (CARVALHO, 2010).

No Brasil a maioria das cidades de pequeno porte, não dispõe de local adequado para disposição final dos resíduos, sendo utilizados vazadouros à céu aberto (lixões). Substâncias consideradas perigosas como pilhas, baterias, embalagens de defensivos agrícolas e outras substâncias ficam expostas e a partir do processo natural percola atingindo o lençol freático e depósitos de água (COSTA; ALVES, 2011).

Os biomarcadores consistem em um meio efetivo para mensurar os efeitos tóxicos. Para isso, utilizam-se métodos físico-químicos e biológicos que possibilitam determinar a resposta ou o efeito do poluente sobre organismos expostos aos contaminantes e testes que avaliam a toxicidade aguda e possibilitam a determinação da concentração de biomoléculas e atividade de enzimas e proteínas (BANASSI, 2004). Os biomarcadores são considerados ferramentas sensíveis que podem ser quantificados através de procedimentos simples e padronizados. Atualmente, os indicadores biológicos têm sido muito utilizados tanto *in vivo*, quanto, *in vitro*, a fim de avaliar os efeitos que os xenobióticos causam nos mais diversos organismos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; DORIA, 2010, RODRIGUES, 2011).

Testes enzimáticos *in vitro* para análise de águas contaminadas por pesticidas organofosforados, agroquímicos e metais pesados tem sido alvo de muitos estudos devido à alta sensibilidade do método, uma vez que expõe as enzimas diretamente a ação do xenobiótico, e eficácia, pois, analisam enzimas-alvo da ação desses agentes tóxicos, como a acetilcolinesterase (AChE). A AChE atua na regulação dos impulsos nervosos, a partir da degradação da acetilcolina, um neurotransmissor que age nas sinapses colinérgicas do sistema

nervoso e são sensíveis a presença de contaminantes como metais pesados e agroquímicos (GUYTON, 1993; OLIVEIRA, 2003).

A maioria das cidades brasileiras ainda destinam seus resíduos em vazadouros a céu aberto. Na região do Cariri Paraibano não é diferente, os resíduos são dispostos sem nenhum tipo de tratamento e os mais diversos tipos de materiais alguns considerados perigosos como pilhas, embalagens de agroquímicos, embalagens de tintas e outros contaminantes ficam expostos ocasionando a contaminação das fontes de água a partir do processo de percolação (CARVALHO, 2010). Nesse sentido este estudo justifica-se na tentativa de avaliar a contaminação dos reservatórios de águas da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG-CDSA) campus Sumé, que está localizado nas proximidades do vazadouro à céu aberto do município e potencialmente recebe contaminantes advindos do mesmo. A avaliação da contaminação dos reservatórios de água do CDSA-UFCG foi realizado utilizando um método biológico para detecção da inibição da acetilcolinesterase (AChE) uma enzima sensível a presença de metais pesados e compostos organofosforados.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

Atualmente, o nível de compostos xenobióticos no ambiente aquático vem aumentando de forma frenética como resposta a ação antrópica sobre a biota. Esse fator faz com que a qualidade ambiental seja comprometida, afetando a saúde dos mamíferos, vertebrados, invertebrados, plantas, algas, microrganismos e outros seres vivos que habitam esses ambientes. Os ecossistemas aquáticos estão suscetíveis a contaminações a partir de substâncias lançadas no meio, oriundas das mais diversas fontes emissoras e que podem agir de forma direta ou indireta na contaminação dos mananciais. Efluentes industriais e domésticos, resíduos sólidos urbanos, processos de drenagem agrícola, derrames acidentais de substâncias tóxicas, uso indevido de insumos agrícolas, atividades mineradoras, entre outras, contribuem para a contaminação de rios e mares, interferindo no ecossistema como um todo (ARIAS *et al.*, 2007; CARVALHO, 2010).

A contaminação da água ocorre quando nela é encontrada um ou mais componentes que não existiam originalmente, ou um ou mais elementos em concentrações acima das que ocorriam na natureza. Em quantidades pequenas, alguns desses elementos, são essenciais para o desenvolvimento dos seres vivos, porém em quantidades maiores podem ser consideradas tóxicas. Com isso, o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico da contaminação das águas torna-se de fundamental importância para as diversas áreas de conhecimento (ALVES, 2003).

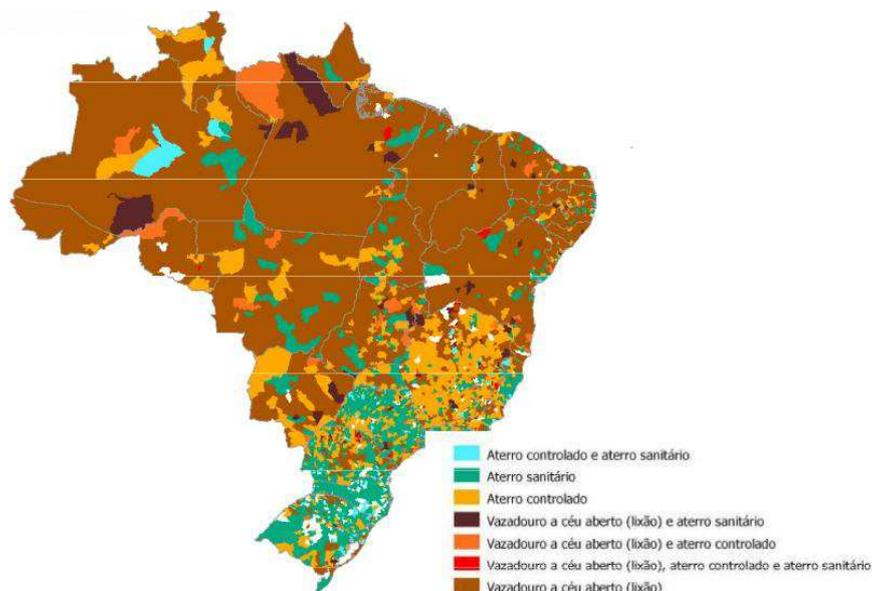
O crescimento demasiado da população e o intenso processo de urbanização, associado ao mau uso dos recursos naturais, gera uma combinação perfeita para o desequilíbrio no ambiente, fenômeno que atualmente caracteriza o cenário mundial. Com o desenvolvimento da comunicação, das máquinas e da tecnologia tudo é fabricado para durar menos, para que o consumo seja requerido mais rapidamente. Assim, o planeta vem se tornando um grande depósito de resíduos. Nesse contexto, as mudanças comportamentais do homem com relação aos recursos naturais ainda são pequenas, principalmente quando se trata de problemas causados pela má condução do gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos (RSU) (FRANÇA; RAURO, 2009).

Resíduo sólido (RS) é considerado como toda mistura de materiais ou restos destes, oriundos dos mais diversos tipos de atividade humana, que são descartados por não apresentarem utilidade ou valor econômico (ABNT, 1987). A produção e disposição desses

resíduos têm se constituído um dos maiores problemas ambientais de todo o mundo, principalmente nos países mais desenvolvidos, já que o volume de resíduos gerados é diretamente proporcional ao grau de desenvolvimento de um povo, como resultado das maiores atividades econômicas e dos hábitos de consumo decorrentes. Outra problemática é a forma de disposição desses resíduos uma vez que em países em desenvolvimento como no Brasil, principalmente nos municípios de pequeno porte, não há um destino final adequado para os resíduos sólidos. Assim, nem todos esses materiais são depositados em aterros sanitários de maneira adequada, sendo uma grande quantidade destinada a vazadouros a céu aberto (lixões) provocando danos ao meio ambiente e as populações que moram em áreas circunvizinhas (COSTA, 2011).

Segundo Faria (2012), o depósito de resíduos sólidos a céu aberto (lixão ou vazadouros) é uma forma de disposição desordenada e sem controle sobre tipo, volume ou periculosidade do que é descarregado no mesmo. Neste tipo de disposição, não há também a compactação ou cobertura dos resíduos, propiciando a contaminação do solo, água e ar, além da proliferação de vetores de doenças. Tal forma de disposição está relacionada à liberação de odores desagradáveis e à poluição das águas subterrâneas e superficiais, devido à infiltração do lixiviado, líquido de elevado potencial poluente, ácido e com possível presença de outros contaminantes persistentes como metais pesados, agrotóxicos e medicamentos. Segundo o IBGE (2008) 50,8 % dos resíduos sólidos urbanos são dispostos em vazadouros a céu aberto e que cerca de 1600 municípios do nordeste destinam seus resíduos nesse tipo de depósito. A Figura 1 representa os municípios segundo a forma de disposição final dos RSU.

**Figura 1-** Mapa do Brasil com representação dos municípios segundo a forma de disposição final dos RSU.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2008.

A NBR 10004 classifica os resíduos sólidos em três classes: perigos (Classe I), não inertes (Classe II) e inertes (Classe III) (ABNT, 1987). Os resíduos sólidos perigosos são aqueles resíduos ou misturas de resíduos sólidos que, em função de suas características, podem apresentar risco à saúde pública, provocando ou contribuindo para o aumento de mortalidade ou incidência de doenças, podendo ainda trazer efeitos adversos ao meio ambiente, quando manuseados ou dispostos de forma inadequada (FONSECA, 1999). O perigo proveniente desses resíduos podem ser propriedades físicas, químicas e infecto-contagiosas que apresentam características de corrosividade, reatividade, explosividade, toxicidade, inflamabilidade, patogenicidade e radiatividade (SHIO, 2001). A tabela 1 apresenta alguns produtos de uso doméstico encontrados em vazadouros à céu aberto que fazem parte da Classe I da NBR tidos como produtos potencialmente perigosos.

Oliveira e Pascal (2004) afirmam que muitos produtos perigosos são conhecidos e utilizados no dia-a-dia, entretanto a busca por soluções para o seu correto gerenciamento tem sido limitada, devido à concepção de que o problema que representam pode ser completamente eliminado por processos no ambiente natural, o que não ocorre. Dentre as substâncias classificadas como nocivas estão as lâmpadas, principalmente as fluorescentes, que fazem parte dos resíduos domésticos perigosos e necessitam de controle e de descarte adequado, uma vez que muitas delas contêm mercúrio e/ou chumbo na sua composição. Outro contaminante presente nos resíduos sólidos domésticos são as pilhas e baterias compostos por uma série de metais e outras substâncias nocivas para saúde humana e do ambiente (JARDIM, 1995; SHIO, 2001). Os metais pesados, liberados no ambiente, a partir do armazenamento incorreto e do descarte de produtos em local não adequado, representam grande risco à saúde humana e ao ambiente. A tabela 2 apresenta alguns metais que podem ser encontrados nos resíduos sólidos domésticos e que possuem efeitos nocivos ao organismo humano e ao ambiente. De acordo com a ABINEE (2012) no Brasil são produzidos por ano cerca de três bilhões e meio de pilhas e baterias para uso doméstico e cerca de 40% das pilhas vendidas no país são ilegais e não seguem as normas técnicas e os padrões brasileiros, possuindo quantidades de substâncias tóxicas além do permitido pela legislação, o que inviabiliza o descarte em lixo comum. Pilhas e baterias apresentam, em sua composição metais perigosos à saúde e ao ambiente, pois possuem eletrodos que são constituídos de uma variedade de metais (chumbo, níquel, cádmio, mercúrio, cobre, zinco, manganês), responsáveis por possíveis danos causados ao ambiente e à saúde dos seres vivos. Grimberg e Blauth (1998) afirmam que cerca de 88% do mercúrio oriundo do lixo doméstico provém das pilhas.

**Tabela 1-** Produtos Domésticos Potencialmente Perigosos

Utilização	Produtos	Propriedades
Produtos de limpeza	Pó abrasivo, amônia e produtos baseados de amônia, água sanitária, desentupidores, limpadores de vidro, limpadores defogão e removedores de manchas, Aerossóis, polidores de móveis, polidores de sapatos, polidores de metais, limpadores de tapetes.	Corrosivos, Tóxicos
Produtos de uso pessoal	Crems para alisamento, xampus, tinturas para cabelos, produtos para limpeza de unhas	Inflamáveis, Tóxicos
Produtos automotivos	. Fluídos de freio e de transmissão de gasolina, óleo diesel, óleos usados e querosene.	Extremamente tóxicos e Inflamáveis
Diversos	Baterias, pilhas, produtos para piscina, lâmpadas fluorescentes, produtos contendo Amianto.	Corrosivos e Tóxicos
	Pesticidas, herbicidas, fertilizantes e inseticidas.	Extremamente Tóxicos, alguns inflamáveis

Fonte: GOMES; OGURA, 1993.

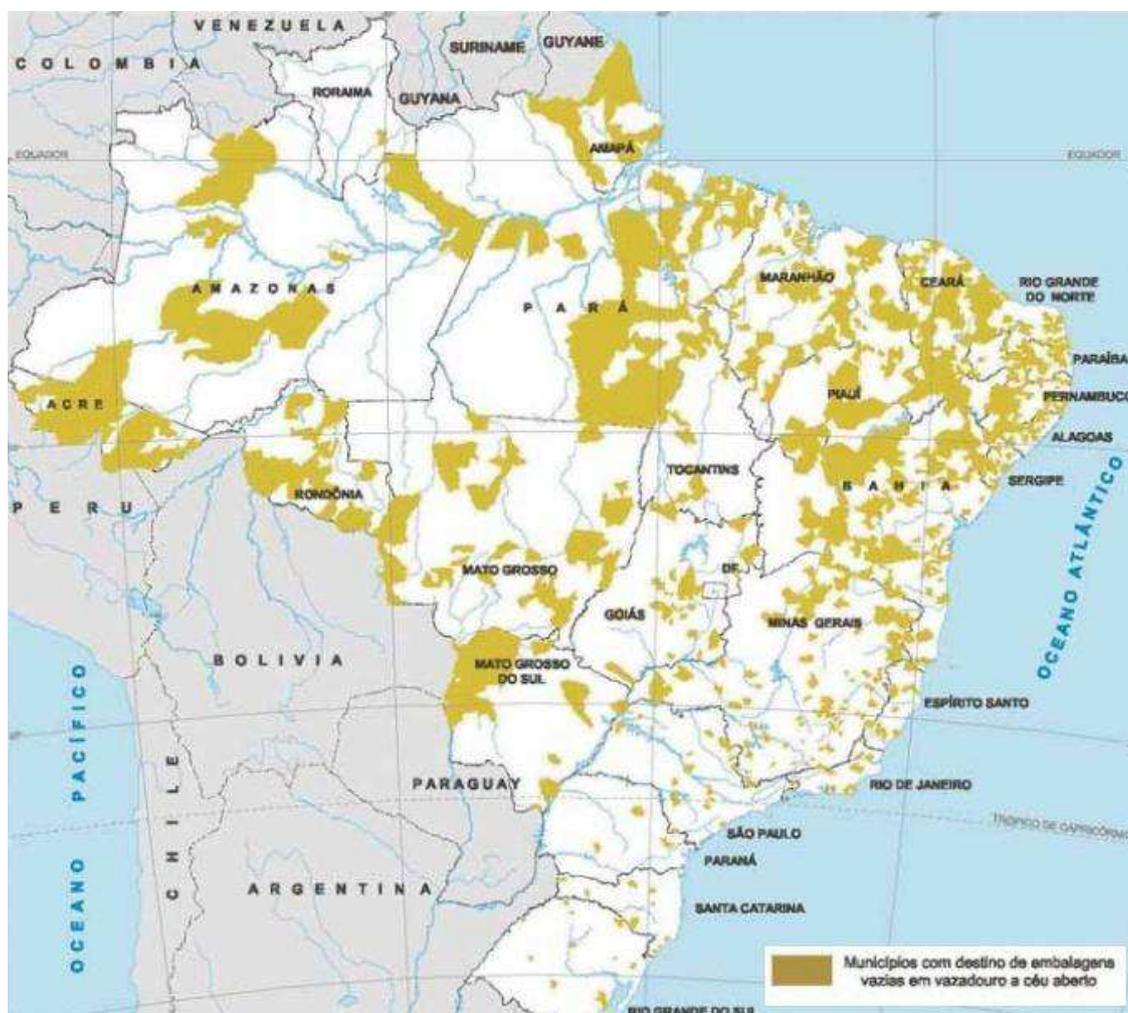
Além das pilhas e baterias a disposição de embalagens de agrotóxicos em vazadouros a céu aberto vem despertando atenção crescente, devido aos efeitos adversos dessas substâncias. A contaminação dos recursos hídricos por agroquímicos acarreta uma série de impactos relacionados à utilização da água, pois, causam danos irreversíveis aos organismos que entram em contato com a mesma. Segundo IBGE (2002) 978 dos 5.560 municípios brasileiros descartam embalagens de agrotóxicos em vazadouros a céu aberto em todo o país (Figura 2), apenas 600 municípios informaram possuir posto ou central de recebimento de embalagens de agrotóxicos. Outros 996 municípios destinam as embalagens para posto de coleta em outro município. Os agrotóxicos e fertilizantes são fatores de contaminação da água em 16,2% dos municípios brasileiros.

**Tabela 2-** Efeitos nocivos dos metais a saúde humana e onde são encontrados.

<b>Elemento</b>	<b>Onde estão presentes</b>	<b>Efeitos</b>
Cádmio	Baterias/pilhas; plásticos; ligas metálicas; pigmentos; papéis; resíduos de galvanoplastia	Carcinogênico; Dores reumáticas e miálgicas; Distúrbios metabólicos levando à osteoporose; Disfunção renal, doenças cardiovasculares, em particular hipertensão.
Chumbo	Tintas como as de sinalização de rua; impermeabilizantes; anticorrosivos; cerâmicas; vidros; plásticos; inseticidas; embalagens; pilhas, utensílios domésticos.	Perda de memória; Dor de cabeça; Tremores musculares; Lentidão de raciocínio; Alucinação; Anemia; Depressão; doenças cérebro vasculares, distúrbios digestórios e cólicas abdominais, redução da fertilidade.
Lítio	Baterias de celular	Irritante ao sistema nervoso central, visão turva, ruídos nos ouvidos, vertigens, debilidade e tremores.
Mangânes	Ligas com alumínio, pilhas, vidros cerâmicas, tintas remédios, fungicidas, fertilizantes, dentre outros.	Desordem crônica do sistema nervoso central (manganismo ou Parkinson mangânico), bronquite, Pneumonia
Mercúrio	Equipamentos e aparelhos elétricos de medidas; produtos farmacêuticos; lâmpadas de néon, fluorescentes e de arco de mercúrio; interruptores; baterias / pilhas; tintas; amaciantes; antisépticos; inseticidas, herbicidas, fungicidas; termômetros.	Distúrbios renais; Distúrbios neurológicos; Efeitos Mutagênicos; Alterações no metabolismo; Perda de memória, Deficiências nos órgãos sensoriais. Na cavidade oral causa gengivite, estomatite, salivação aumentada, Danos aos rins e ao sistema respiratório; irritações na pele e nas mucosas. É considerado o elemento mais tóxico para o homem e grandes animais.
Níquel	Utensílios de aço inoxidável; baterias de celulares.	Aumenta o risco de câncer de pulmão, na cavidade nasal, na laringe e no estômago. Irritação crônica do aparelho respiratório superior, irritação e fibrose pulmonar (pneumoconiose), bronquite asmática, aumenta a susceptibilidade a infecções respiratórias e dermatites de contato alérgico.
Zinco	Produtos farmacêuticos, tintas, pilhas, produtos galvanizados.	Irritação da pele, dos olhos e das mucosas do nariz e garganta e dos brônquios, irritações no aparelho digestório e respiratório, deterioração dentária, perfuração do septo nasal, câncer nos testículos.

Fonte: SCHIO, 2008

**Figura 2-** Disposição de embalagens de agroquímicos em Vazadouros a Céu aberto, segundo gestores municipais, 2008.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Perfil dos Municípios Brasileiros, Meio ambiente, 2008.

## 2.2 QUALIDADE DA ÁGUA

A água é um recurso natural essencial para saúde do homem, bem-estar, alimentação e produção de energia, produção agrícola e industrial, na produção de bens e serviços, nos valores sociais e culturais, estabilidade econômica, proteção e manutenção da biodiversidade. No entanto, é um recurso esgotável e vulnerável a ação humana. Além disso, com o aumento demográfico e tecnológico das civilizações na medida em que crescem, aumentam o consumo e a poluição das mananciais. De acordo análises feitas pela Organização das Nações Unidas (ONU), a demanda de água doce até 2050 poderá ultrapassar 40% e a população que reside em regiões áridas e semiáridas, que sofrem com estresse hídrico poderá dobrar (ONU, 2013).

Atualmente as questões relacionadas com o consumo e utilização da água, deixam de ser somente quantitativa e assume o fator qualitativo. Do ponto de vista molecular, a água não se encontra no estado puro na natureza, a não ser na forma de vapor. A água pura (H<sub>2</sub>O) do ponto de vista físico-químico deve ser incolor, inodora e insípida, no entanto, quando se trata de água para o consumo humano essas características são dispensáveis ou até indesejáveis. Na natureza, a água é encontrada associada a outras substâncias dissolvidas, como sais e gases que são necessários para manter o equilíbrio osmótico das células. No entanto, essas substâncias devem estar presentes em pequenas quantidades, o que nem sempre ocorre devido a contaminação por resíduos industriais e domésticos, agrícolas e inúmeras ações antropogênicas (PEIXOTO, 2008).

A qualidade da água representa uma série de características, que podem ser mensuradas e, em geral, são de natureza biológica, química e física. Para minimizar os efeitos antrópicos e proteger os corpos d'água, a legislação estabeleceu padrões, níveis e proporções que a água, os sedimentos e a biota devem ter para que seja considerada adequada para o uso e consumo. A biota aquática incorpora substâncias naturais, geralmente em pequenas concentrações, sem nenhuma interferência humana, que pode interferir no comportamento químico da água e seus usos. Outras substâncias submetidas ao ambiente aquático sob a ação do homem, em decorrência da ocupação e mau uso do solo, utilização de insumos inadequadamente, extração de minerais, disposição inadequada de resíduos sólidos, podem causar sérios danos ao ambiente comprometendo a qualidade da água (CONAMA, 2005).

Segundo Berti (2009), devido ao uso de quantidades elevadas de agrotóxicos a contaminação dos ecossistemas terrestres para os aquáticos é constante, até nas regiões polares, onde, não ocorre atividade agrícola, podem ser detectados presença de agrotóxicos em tecidos adiposo de mamíferos aquáticos. Além disso, a persistência de alguns agrotóxicos os transformam em contaminantes encontrados por muito tempo no ambiente aquático, comprometendo toda a cadeia alimentar, influenciando no ciclo de nutrientes e como consequência ocasionando eutrofização dos corpos d'água. Os agrotóxicos presentes nos corpos d' água podem penetrar nos organismos aquáticos e seu grau de acumulação irá depender principalmente das características físico-químicas, da persistência do xenobiótico e do tipo de cadeia alimentar.

## 2.2.1 Substâncias inibidoras da Acetilcolinesterase

### 2.2.1.1 Metais Pesados

Os metais são os elementos tóxicos mais conhecidos pelo homem. Há mais de 2000 a.C, as quantidades elevadas de chumbo eram obtidas como subproduto da prata. No entanto, os primeiros sintomas relatados e relacionados com metais pesados foram descritos por Hipócrates em 370 a.C, que observou a intoxicação por chumbo que provocava nos mineradores cólicas abdominais. Somente, em 1815, em minérios contendo carbonato de zinco, foi descoberto o cádmio. A toxicidade dos metais está relacionada com a quantidade de metal presente no meio intracelular ou no órgão intoxicado. Os metais estão distribuídos em todo organismo, e em grandes concentrações, afeta múltiplos órgãos, atingindo sítios alvos, que podem ser organelas, membranas ou até mesmo processos enzimáticos. Os metais pesados ocorrem na natureza em pequenas concentrações e alguns são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos. Quimicamente são substâncias reativas e bioacumuláveis, desse modo, os organismos não são capazes de eliminá-las (DORIA, 2010).

Os metais pesados são classificados como: essenciais, provavelmente essenciais e tóxicos. O cobre, zinco, alumínio, ferro e manganês são tidos como metais essenciais, e atuam como componentes funcionais, estruturais e regulatórios do metabolismo dos seres vivos; O níquel, vanádio e cobalto, por exemplo, encaixam-se nos elementos provavelmente essenciais; e o cádmio, mercúrio, chumbo e arsênio são classificados como tóxicos (OLIVEIRA, 2011).

O alumínio e seus sais são componentes essenciais, sendo, utilizados no tratamento da água. Na indústria, esse metal é utilizado como matéria prima para produção telhas, papel alumínio, embalagens de bebidas, latas, dentre outros. Na água potável, as concentrações de metal variam de acordo com a fonte e com o tratamento à base de alumínio que recebe, onde, esses valores podem variar entre 0,01 a 1,3 mg/L, e a concentração média deve ficar em torno de 0,16 mg/L. Para ser considerada apropriada para consumo o valor máximo de alumínio não pode ultrapassar 0,2 mg/L, altas concentrações podem causar constipação intestinal, cólica, osteoporose, raquitismo, mal de Alzheimer e doença de Parkinson (LINS, 2010).

O bário ocorre naturalmente em algumas fontes na forma de carbonatos. No entanto, não considerada elemento essencial aos seres vivos e em grandes concentrações pode ocasionar problemas no sistema nervoso central, danos ao coração e as artérias, podendo ainda levar a elevação da pressão arterial; a Ministério da Saúde na Portaria nº 518/2004, estabelece o limite máximo de 0,7 mg/L (CETESB, 2014).

O Cádmió é utilizado na indústria de plásticos e aço, além disso, esse metal é componente de baterias e está presente em alguns agroquímicos. Os níveis de cádmio para água potável devem ser inferiores a 0,005 mg/L. Concentrações superiores podem causar problemas estomacais, renais, no fígado e pâncreas, vômito, diarréia e fragilidade óssea (HELLER, PÁDUA, 2006).

O chumbo é utilizado para fabricação de baterias, inseticidas, vidros, ligas metálicas, e outros, sendo, um componente persistente no ambiente que contamina água a partir da lixiviação do solo. É uma substância altamente tóxica, podendo comprometer quase todos os órgão, e sistemas do corpo. A exposição aguda pode provocar danos gastrintestinais, vômitos e diarréias e quando se trata de exposições longas pode causar danos nos ossos, e nos músculos. O limite máximo estabelecido para água potável é de 0,1 mg/L (LINS, 2010).

O cromo é um elemento fundamental na sua forma trivalente, pois, participa ativamente no metabolismo dos seres humanos, no entanto, o cromo hexavalente é tóxico e pode comprometer o sistema renal e respiratório, podendo ocasionar dermatites alérgicas, além disso, é potencialmente carcinogênico. É utilizado na produção de fertilizantes, tintas, ligas metálicas. A portaria 2914 de 2011 emitida pelo Ministério da Saúde, estabelece valor superior em água potável de 0,05 mg/L de cromo trivalente (CETESB, 2014)

Os compostos de arsênio são muito utilizados na produção de eletroeletrônicos. A contaminação das águas com arsênio por intervenção humana está relacionada com a indústria de semicondutores, agrotóxicos e aditivos de suplementação animal. A presença dessa substância em água para consumo resulta em um problema grave, devido seu efeito tóxico; que pode levar a problemas graves de pele, no sistema circulatório, podendo ainda aumentar o risco de câncer de pele e pulmão (HELLER, PÁDUA, 2006).

O mercúrio é um metal altamente tóxico ao homem, sendo letal em doses superiores a 3 g. Mesmo em pequenas concentrações o mercúrio pode provocar danos irreversíveis no sistema nervoso central. Pode ainda ocasionar vômitos, náuseas, dores abdominais, diarréia e problema nos ossos. Para ser considerada potável o Ministério da saúde indica concentrações inferiores a 0,001 mg/L (CETESB, 2014; OLIVEIRA, 2011).

Os metais pesados são alvos de avaliações como potenciais inibidores enzimáticos através das ligações com grupamentos tióis protéicos (MARQUES; YAMANAKA, 2008). A atividade enzimática é inibida irreversivelmente, uma vez que os metais ligam-se covalentemente ao sitio ativo da enzima acetilcolinesterase impedindo a hidrólise do substrato (MOTTA, 2000). Oliveira (2011) avaliou o efeito de metais pesados ( $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $As^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em

*Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo); Oliveira (2003) avaliou a atividade da acetilcolinesterase em *Colossoma macropomum* (Tambaqui) expostos à cobre e chumbo, metais presentes na água de formação derivada da extração de petróleo em Manaus; Oliveira (2012) verificou o efeito do  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{CuCl}_2$  na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo); Bocquené e colaboradores (1990) relataram uma inibição de 100% em duas espécies marinhas (*Scomberscomber* e *Pleuronectesplatessa*) sob exposição de cobre a 1 mM.

#### 2.2.1.2 Agrotóxicos do grupo dos organofosforados

Os agrotóxicos consistem em um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas. A necessidade de aumentar a produção de alimentos o homem impulsionou o desenvolvimento dessas substâncias, pois, os campos cultivados tornaram-se fonte de alimento para insetos, roedores, fungos e bactérias. Devido a grande quantidade de alimento essas espécies se multiplicaram rapidamente, passando a deteriorar as lavouras, e prejudicar o bem-estar das pessoas, sendo consideradas pragas. A partir disso, buscaram-se maneiras de combatê-las, utilizando desde rituais religiosos ao longo da história até o desenvolvimento dos agrotóxicos (BRAIBANT, ZAPPE, 2012).

. No início do século XX foram desenvolvidos os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos foram desenvolvidos. Em 1828 o químico alemão Friedrich Wöhler conseguiu sintetizar a uréia, composto orgânico, a partir do cianato de amônio um composto inorgânico, fato esse que deu início a síntese orgânica. Durante a Segunda Guerra mundial, com a necessidade de proteger os soldados de doenças causadas por insetos e outras pragas, pesquisas foram desenvolvidas o que resultou no desenvolvimento de vários agrotóxicos, como o inseticida do 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil) etano (DDT), desenvolvido para o combate de piolhos (*Pediculus humanus*) vetores de uma doença bacteriana chamada de tifo exantemático, que infestaram tropas americanas (ZAPPE, 2011). Além do DDT outros inseticidas pertencentes ao grupo químico dos organoclorados foram desenvolvidos, entretanto, estudos mostraram que essas substâncias eram insolúveis em água; e solúveis em líquidos apolares como éter, clorofórmio, óleos e gorduras vegetais; alta estabilidade, tornando-se substâncias recalcitrantes no meio ambiente (JARDIM, ANDRADE, 2009).

Atualmente, uma grande preocupação da população, dos órgãos competentes e da comunidade científica são os efeitos adversos dos praguicidas sobre a saúde e o meio ambiente. Essa problemática tem levado ao desenvolvimento de moléculas com maior

seletividade a organismos não alvos e, com efeito, menos persistente o ambiente. Além disso, o uso indiscriminado de substâncias levou a um quadro de resistência de pragas o que tornou necessária a busca por novos sítios de ação dessas substâncias. Assim, além do sistema nervoso, outro alvo para ação inseticida vem sendo estudados como regulação do crescimento, inibição da respiração celular, inibição do transporte de elétrons, da síntese de ATP, entre outras vias (GALLO *et al.*, 2002).

Os compostos organofosforados são ésteres do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), ou ácidos derivados destes: tionofosfórico, ditiofosfórico, fosfômico, entre outros. Quando comparado aos organoclorados, a toxicidade aguda do organofosforado é maior, porém, sua persistência no ambiente é menor, requerendo um maior número de aplicações na lavoura (GALLO *et al.*, 2002). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) entre os três agrotóxicos mais utilizados no Brasil em 2010, dois fazem parte do grupo dos organofosforados, Parationa Metílica e Metaminfós, ambos da Classe I considerados como extremamente tóxicos (IBGE, 2010). No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária proibiu a venda e a utilização do Metaminfós, a partir de 2011, por possuir características neurotóxicas, imunotóxicas e causa toxicidade sobre os sistemas endócrino e reprodutor de mamíferos. O grupo dos organofosforados são compostos anti-colinesterásicos, ou seja, o principal mecanismo de ação em insetos e mamíferos consiste na diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que degrada o neurotransmissor acetilcolina e desempenha mecanismo importante na transmissão normal de impulsos nervosos. Além disso, provocam efeito nocivo aos seres vivos expostos a essas substâncias, seja por via oral, respiratória ou cutânea (ANVISA, 2010).

Estudos mostram o efeito nocivo dos organofosforado: Ecobichon e Jay (1991) *apud* Thomaz (2008) observaram salivação, sudorese, tremores e distúrbios cardio-respiratório em mamíferos intoxicados por organofosforados; Löser (1970) *apud* Anvisa (2010), analisou o efeito do Metaminfós em cães *beagles*, onde, observou redução da atividade da colinesterase no plasma e eritrócitos; Olle (2007) verificou em peixes expostos ao metil paration redução da frequência cardíaca; Phandrasekara e Pathiratine (2005) *apud* Thomaz (2008), detectou redução da taxa sanguínea de linfócitos (linfocitopenia) e de leucócito (leucopatia) em espécie de carpa expostas ao triclorfon; a Anvisa (2010) em análise genotóxica e carcinogênica *in vitro* e *in vivo* em humanos observou efeitos decorrentes de mutações gênicas, cromossômicas e de lesões na estrutura bioquímica do DNA, detectando assim o potencial mutagênico e/ou carcinogênico dos OPs; Linhares (2005) avaliou 60 agricultores expostos a agrotóxicos, onde,

100% deles apresentaram redução da atividade da acetilcolinesterase e diminuição da colinesterase.

Gallo e colaboradores (2002) classificam os inseticidas de acordo com o mecanismo de ação, que podem ser: físicos; protoplásmicos; inibidores metabólicos; neurotóxicos; agonistas de hormônios; e estomacais. No entanto, os agrotóxicos mais utilizados no Brasil são os do grupo dos organofosforados que atuam na transmissão sináptica e pode ser classificado como neurotóxicos. Os compostos organofosforados são potentes inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina um neurotransmissor, uma vez que ligam-se covalentemente formando um complexo enzima-substrato muito estável que resulta na inibição da enzima. Essas moléculas apresentam estrutura que permite o encaixe no sítio esteárico da enzima acetilcolinesterase, a partir do grupamento fosfato. Ao contrário da acetilcolina que sofre hidrólise rápida a partir da acetilação, a hidrólise da enzima fosforilada ocorre mais lentamente, levando assim, ao acúmulo de acetilcolina na sinapse, podendo, ocasionar uma síndrome colinérgica ou hiperexcitação do sistema nervoso (OLIVEIRA, 2011; THOMAS, 2008).

### 2.3 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A avaliação de toxicidade de substâncias no meio aquático, utilizando estudos de populações e comunidades é complexo devido aos longos períodos de exposição necessário para que os efeitos comecem a aparecer. Assim, os efeitos observados são distúrbios ecológicos graves e praticamente irreversíveis, como perda diversidade, declínio populacional, e distúrbios ecológicos (DORIA, 2010). Além disso, os programas de monitoramento da contaminação aquática buscam quantificar os níveis e tipos de poluentes presentes na água, no sedimento e em alguns organismos de interesse econômico. Esse tipo de informação do ponto de vista econômico e social é importante, no entanto, as análises químicas são onerosas e não fornecem informação da toxicidade provocada pelos xenobióticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; BENASSI, 2004).

Assim, surgem os biomarcadores que consistem em um meio efetivo para mensurar os efeitos tóxicos. Para isso, utilizam-se métodos físico-químicos e biológicos que possibilitam determinar a resposta ou o efeito do poluente sobre organismos expostos aos contaminantes, testes que avaliam a toxicidade aguda, e possibilitam a determinação da concentração de biomoléculas e atividade de enzimas e proteínas (BANASSI, 2004). Os biomarcadores são considerados ferramentas sensíveis, podendo ser quantificados através de procedimentos

simples e padronizados. Atualmente, os indicadores biológicos têm sido muito utilizados tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, a fim de avaliar os efeitos que os xenobióticos causam nos mais diversos organismos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; DORIA, 2010, RODRIGUES, 2011).

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes: de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição possibilitam a detecção e quantificação dos contaminantes, dos seus metabólitos ou das interações entre as moléculas alvo, medidas no organismo. Nos biomarcadores de efeito a análise é realizada a partir de alterações bioquímicas e fisiológicas, que podem ser mensuradas nos tecidos e/ou fluídos corporais e pode está associado a desequilíbrios. E os biomarcadores de suscetibilidade, que indicam a capacidade inata ou adquirida de um organismo ser suscetível a uma exposição, que pode envolver fatores genéticos (RODRIGUES, 2011; MELA, 2004; DORIA, 2010).

#### 2.4 BIOMARCADORES DE NEUROTOXIDADE- COLINESTERASES.

As enzimas usadas como biomarcadores de neurotoxicidade são as colinesterases. Essas enzimas em vertebrados ocorrem de duas formas: Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). A AChE também conhecida colinesterase verdadeira, específica ou eritrocitária, é encontrada no tecido nervoso, na junção neuromuscular, nos eritrócitos, no soro e plasma, e possui afinidade específica com acetilcolina. Pertence à classe das serinas hidrolases e catalisa a hidrólise da substância neurotransmissora acetilcolina nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares. A AChE possui dois sítios catalíticos um esteárico que situa-se dentro da cavidade estreita, é composto por três resíduos de aminoácidos serina, histidina, e glutamato; e um aniônico, situado as bordas da cavidade, que serve como pontos para ligação da acetilcolina. O mecanismo de hidrólise envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina. Esse mecanismo gera um intermediário tetraédrico estabilizado por pontes de hidrogênio, o qual por fim irá dar origem a uma serina acetilada, que recupera o sítio da enzima no fim da hidrólise e uma colina livre (THOMAS, 2008). A BChE também citada como pseudocolinesterase, esterase não específica, colinesterase inespecífica, sérica ou plasmática, que pode ser encontrada no fígado, intestino e principalmente no plasma sanguíneo. Essa enzima sintetiza vários ésteres entre eles a acetilcolina. (DORIA, 2010; MELA, 2004).

As colinesterases (ChEs) atualmente, têm sido utilizadas como potenciais biomarcadores para avaliação e monitoramento da contaminação do ambiente por vários compostos, principalmente pesticidas organofosforados (OP) (ARIAS, 2007;

GOLOMBIESKI *et al.*, 2008; GRIZA *et al.*, 2008; COPATTI, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; AZEVEDO, 2013; LIMA, 2013), metais pesados (ROCHA, 1985; CAVALCANTE, 2009; DORIA, 2010; OLIVEIRA, *et al.* 2011; SILVA *et al.*, 2011), efluentes de minas (CASTRO *et al.*, 2004) e águas de formação derivada de extração de petróleo (OLIVEIRA, 2003).

A AchE é fundamental na neurotransmissão colinérgica. Quando a acetilcolina é degradada pela acetilcolinesterase, gera colina, ácido acético e um próton. Com a diminuição da acetilcolina, ocorre simultaneamente a redução do potencial pós-sináptico, prevenindo a passagem contínua de impulsos nervosos. A ligação acetilcolina com receptor nicotínico da membrana pós-sináptica desencadeia a abertura dos canais de íons  $\text{Na}^+$ . Posteriormente ocorre a despolarização da membrana, gerando um potencial de ação, que permitirá a propagação de impulso. Quando a enzima é inibida, ocorre o bloqueio da transmissão de impulsos nervosos, devido à sobreposição de impulsos causados pela permanência dos canais de sódio abertos, gerando a interrupção dessa função indispensável para os organismos (DORIA, 2010; STEPHENSEN, 2000; ALVES, 2003). A inibição da colinesterase foi proposta como biomarcador específico para organofosforados, que são inibidores do sítio de ligação da acetilcolinesterase (WEISS, 1958). Em 1961, Ellman e colaboradores desenvolveram uma metodologia baseada em um método fotométrico para determinação da atividade da acetilcolinesterase em tecidos, que é utilizada até hoje, para determinação de amostras contaminadas por organofosforados e outros poluentes que inibem esta enzima, como os metais pesados. O método baseia-se na hidrólise da acetilcolina, pela enzima acetilcolinesterase, produzindo a tiocolina. Essa tiocolina em reação com DNTB origina o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro a 405 nm (MELA *et al.*, 2004; DORIA, 2010). Essa é uma metodologia simples e menos onerosa que vem sendo utilizada para detecção de diversos contaminantes (metais, agroquímicos, águas residuais de indústrias químicas, entre outras).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se as águas dos reservatórios do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) recebem contaminantes oriundas do vazadouro a céu aberto de resíduos urbanos do município de Sumé - PB, por meio de um método biológico, relacionando com o risco à saúde humana.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aplicar um método biológico para detecção de inibidores da acetilcolinesterase presente nas amostras de águas coletadas no CDSA;

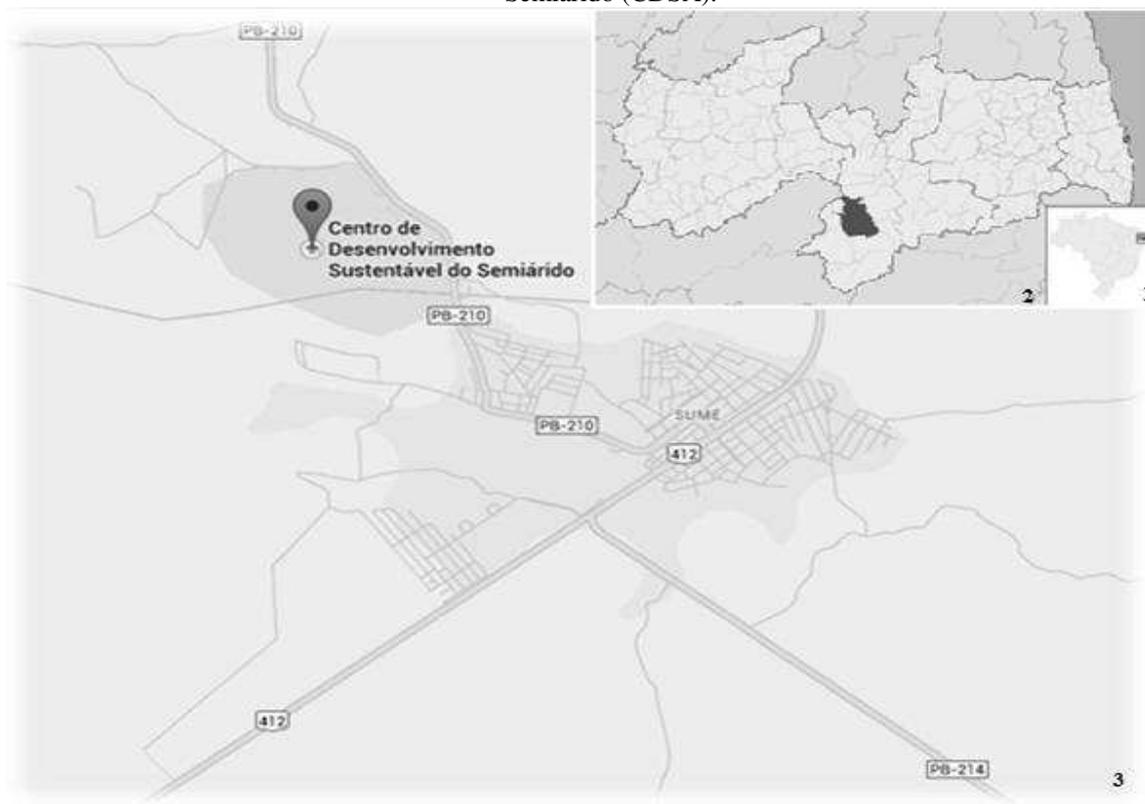
Avaliar quantitativamente o nível de inibição da acetilcolinesterase sérica humana *in vitro* quando exposto a água analisada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL E COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS

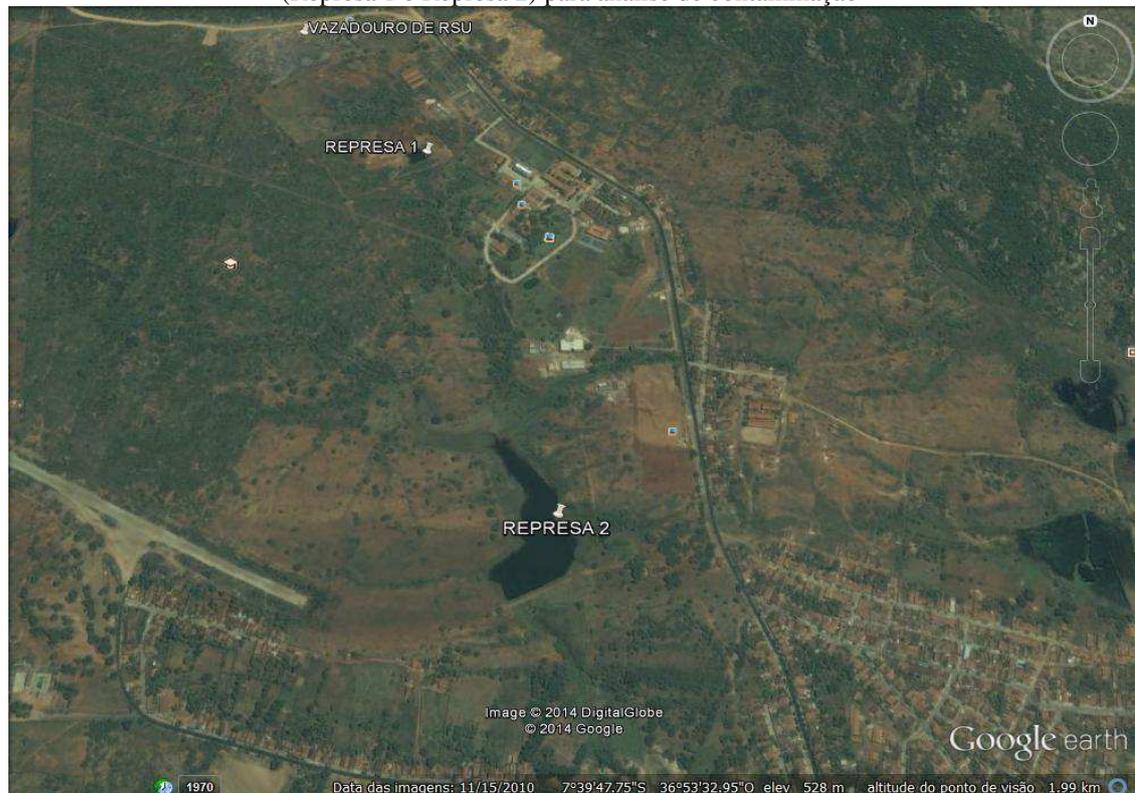
As amostras de água utilizadas para realização do experimento foram coletadas na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) Cidade de Sumé, Paraíba, Brasil (Figura 3). As águas foram recolhidas em dois pontos (Figura 4) Represa 1 localizada à 350 metros do vazadouro municipal ( $7^{\circ}39'32.78''S$ ,  $36^{\circ}53'41.31'' O$ ) e Represa 2 localizada à 1000 metros do vazadouro a céu aberto ( $7^{\circ}39'54.34''S$ ,  $36^{\circ}53'33.91'' O$ ). O material foi coletado com auxílio de pipeta *Pasteur*, filtrado para retirada de partículas suspensas e armazenando em tubos de polipropileno com fundo cônico de 50 ml, sob refrigeração. A Figura 5 demonstra o vazadouro e os locais de coleta das de água para análise.

**Figura 3-** Mapa do Brasil, Estado da Paraíba, Município de Sumé e Localização do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido. (1) Mapa do Brasil com destaque no Estado da Paraíba; (2) Mapa da Paraíba com foco no município de Sumé, (3) Mapa de Sumé com localização do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA).



Fonte: Google Maps.

**Figura 4-** Imagem de satélite mostrando Local do Vazadouro d resíduos sólidos e os pontos de coleta de água (Represa 1 e Represa 2) para análise de contaminação



Fonte: Google Earth.

**Figura 5-** Pontos de coleta de água para análise de contaminação. (1) Vazadouro a céu aberto do município de Sumé- PB; (2) Primeiro ponto de coleta (represa 1); (3) Segundo ponto de coleta (represa 2).



## 4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Dois padrões analíticos foram testados. O primeiro padrão utilizado para detecção do inibidor da acetilcolinesterase foi o Malathion UI produzido pela Cheminova Brasil Ltda. Nome químico: fosforoditioato de O,O-dimetil S-[1,2 bis- etoxicarbonil- etila] O,O-dimetil-ditiofosfato de dietil- mercaptosuccinato. Nome comum: Malathion. Fórmula molecular:  $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ . Preparou-se uma solução de defensivo na proporção de 1 ml de Malathion para 200 ml de água destilada como indicado no rótulo (Diluição Usual) e foi acondicionada em frasco âmbar a fim de evitar a fotodegradação. Posteriormente a diluição usual de Malathion (1: 200 ou 100%) foi utilizada para diluição em série: 100; 50; 25; 12,50; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78% de defensivo. O segundo padrão analítico utilizou os componentes internos da Pilha AA 777® importada por *Sihui Huachang Battery Ltda.* A pilha foi cuidadosamente aberta dentro da capela de exaustão utilizando procedimento padrão e os componentes internos foram retirados e depositados em um becker contendo 25 ml de Tris-HCl, pH 8, *overnight*. Após esse período a solução foi filtrada, armazenada em tubos de polipropileno com fundo cônico de 50 ml e uma alíquota de 500  $\mu$ L utilizada para uma diluição em série: 100; 50; 25; 12,50; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78% da solução de pilha.

O soro utilizado como fonte de acetilcolinesterase foi obtido a partir do sangue humano. A coleta do sangue foi realizada no Laboratório de Biotecnologia utilizando procedimento padrão. O sangue colhido foi armazenado em tubos de polipropileno com fundo cônico de 50 ml esterilizados, posteriormente, as amostras foram centrifugadas em Centrifuga SL-703 por 12 minutos à 1500 RPM. O êmbolo (coágulo) formado no processo de centrifugação foi deslocado das paredes do tubo com auxílio de pipeta e repetiu-se o processo. O sobrenadante (soro) foi retirado com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e armazenado em tubos de fundo cônico de 1,5 ml em *freezer* ( $-4^{\circ}\text{C}$ ).

## 4.3 DETERMINAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE DA ENZIMA

### ACETILCOLINESTERASE

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). O teste enzimático foi realizado transferindo-se para tubos de fundo cônico de 1,5 ml, 46  $\mu$ L de soro humano, 450  $\mu$ L de DNTB (0,1M) e 450  $\mu$ L das amostras de água previamente coletadas. Após a homogeneização, os tubos foram incubados por 40 minutos. Em seguida, foram acrescentados 46  $\mu$ L de cloreto de acetilcolina (*Sigma*

*Aldrich*), a 62 mM e aguardou-se três minutos. A leitura da absorbância foi feita em 405 nm, em um espectrofotômetro UV-1000 A.

Uma reação controle, utilizando água destilada ao invés da solução de Malathion, foi considerada como 100% da atividade enzimática de AChE. O ensaio foi realizado nas concentrações (100; 50; 25; 12,50; 6,25, 3,12; 1,56; 0,78%) de defensivo e em triplicata para cada uma das concentrações. Na incubação e leitura das amostras o fator temperatura foi controlado (23- 25° C), uma vez que o cromatogênico (DNTB) é instável em altas temperaturas. As porcentagens de inibição enzimática para diferentes concentrações de Malathion foram calculadas de acordo Santos (2009) e Marques; Yamanaka. (2008), utilizando a Equação (1).

$$\% I = 100 - \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

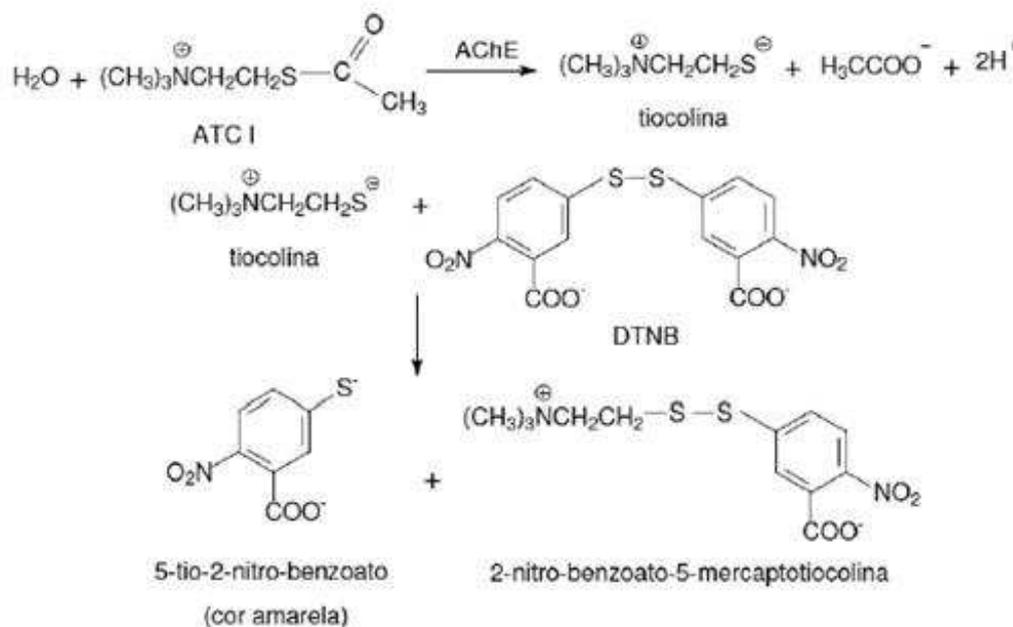
$\% I$  = Porcentagem de Inibição

$A_{amostra}$  = Absorbância média da amostra

$A_{controle}$  = Absorbância média do controle

A atividade colinesterásica é um importante biomarcador de exposição e foi utilizada neste trabalho para verificar o efeito dos resíduos de metais pesados e substâncias organofosforadas advindos do vazadouro a céu aberto municipal nas águas do CDSA. O método adotado para este estudo foi um teste enzimático *in vitro* desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961) que baseia-se na atividade na hidrólise da acetilcolina, pela enzima acetilcolinesterase, produzindo a tiocolina (Figura 6). O método foi escolhido devido a sua sensibilidade e rapidez de detecção de contaminantes anticolinesterásicos que são foco desse estudo (ELLMAN *et al.*,1961).

**Figura 6-** Reação descrita no Método de Ellman e Colaboradores (1961) para detecção da atividade colinesterásica.



Fonte: SILVA, 2012.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As concentrações foram analisadas em triplicata e os resultados foram apresentados em forma de média, com os respectivos erro, tendo sido utilizado o software *Origin Pro 8*. Adicionalmente foi analisada a correlação entre a absorbância e a atividade enzimática utilizando a correlação de Pearson. E os dados foram performados para melhor visualização.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A curva padrão utilizou o Malathion, inseticida do grupo dos organofosforados que possui ação anticolinesterásica já estudada e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, em forma de média acompanhada dos respectivos erros padrão. Uma curva padrão utilizando os componentes internos de pilha foi testada, entretanto, não foi obtida uma padronização do mesmo uma vez que não havia informação das concentrações de cada substância presente na pilha impossibilitando a utilização da mesma. Assim, utilizou uma diluição em série do Malathion inibidor irreversível da colinesterase para padronização dos níveis de inibição.

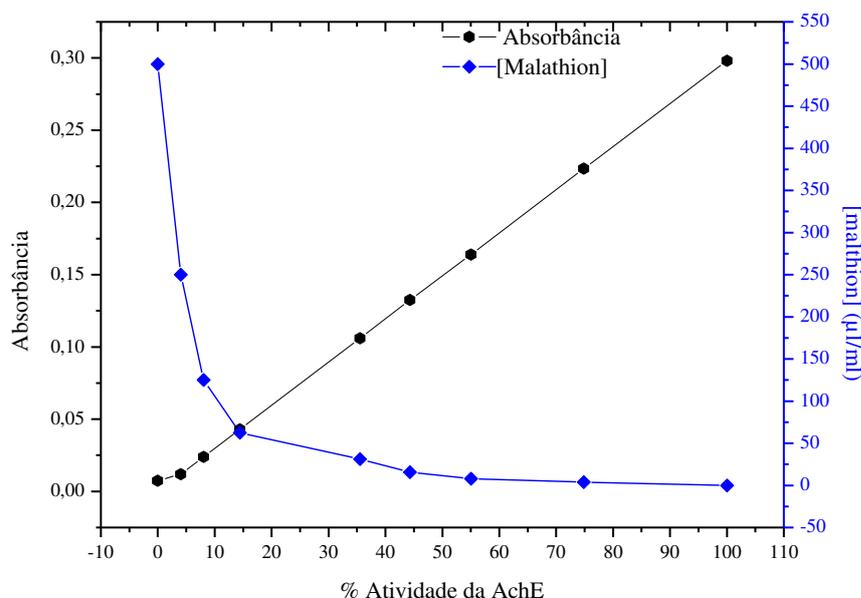
**Tabela 3-** Valores de absorbância, porcentagem de inibição e erro.

Concentração de Malathion ( $\mu\text{l/ml}$ )	Absorbância média	% Inibição AchE
0	0,298	0,0
3,90	0,223 $\pm$ 0,005	25,16 $\pm$ 2,26
7,81	0,164 $\pm$ 0,001	44,97 $\pm$ 2,85
15,60	0,132 $\pm$ 0,004	55,70 $\pm$ 1,14
31,25	0,106 $\pm$ 0,016	64,42 $\pm$ 6,02
62,5	0,043 $\pm$ 0,061	85,57 $\pm$ 24,53
125,00	0,024 $\pm$ 0,063	91,94 $\pm$ 24,92
250,00	0,012 $\pm$ 0,039	95,97 $\pm$ 13,06
500,00	0,007 $\pm$ 0,013	100

Como esperado, ocorreu uma relação diretamente proporcional entre a absorbância e a atividade enzimática (Gráfico 1) como consta na lei de Lambert-Beer. A relação entre a concentração do inibidor é inversamente proporcional à atividade enzimática da acetilcolinesterase do soro humano, desse modo, quanto maior for a concentração do inibidor menor será a atividade enzimática e como consequência, menor será a absorbância. O Coeficiente de Pearson foi calculado para obter o grau de relação linear entre concentração de inibidor enzimático e absorbância. O valor de -0,70 obtido demonstraram uma forte correlação linear inversa, entre a concentração de Malathion e a absorbância (FIGUEIREDO-FILHO;SILVA-JUNIOR, 2010). Pode-se dizer, que a relação entre a concentração do contaminante (inibidor) é inversamente proporcional à atividade enzimática da acetilcolinesterase do soro humano. Desse modo, quando foi utilizada a concentração máxima de inibidor (500  $\mu\text{l/ml}$  de Malathion) a atividade a enzima chegou a 0 %. E a absorbância máxima foi obtida quando a atividade enzimática é igual a 100%, uma vez, a absorbância lida

corresponde a um composto 5-tio-2-nitro-benzoato de coloração amarela, formado pela reação de hidrólise da tiocolina pela acetilcolinesterase que reage com o cromatogênico DNTB e absorve luz em 405 nm (SILVA; MÍDIO; GARCIA, 1994, CONCEIÇÃO FILHO, 2002).

**Gráfico 1-** Relação entre a absorbância e a atividade enzimática, e relação entre a concentração de inibidor e porcentagem de atividade da acetilcolinesterase.

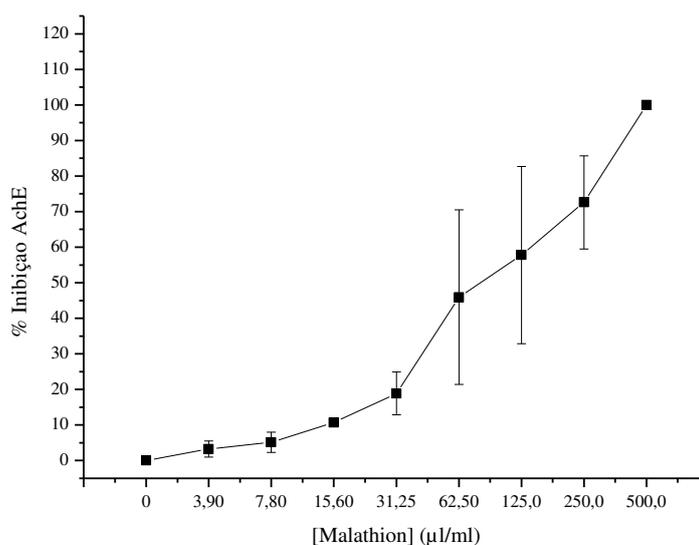


O Gráfico 2 relaciona a concentração de inibidor com a porcentagem de inibição. Assim, a inibição de 100% da atividade enzimática foi obtida *in vitro* quando o soro sanguíneo humano foi exposto à 500 µl/ml de Malathion. A inibição foi igual à zero no controle, quando o inibidor foi substituído por água destilada. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos no teste *in vitro* utilizando como inibidor a água coletada do CDSA, onde se observa a diminuição da atividade catalítica *in vitro* da enzima AchE em soro humano. Na Represa 1 o valor médio de inibição obtido foi de 32,73% e na Represa 2, de 19,45%. Como esperado, devido a proximidade da Represa 1 ao vazadouro municipal o nível de inibição enzimática foi maior do que obtido na Represa 2. O coeficiente de determinação linear ( $R^2$ ) foi de 98% demonstrando um elevado grau de ajuste do modelo estatístico com o experimental (Gráfico 3).

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram verificados por outros autores, dentre eles, Oliveira (2011), verificou a inibição *in vitro* da acetilcolinesterase em cérebro de tilápia do Nilo expostas à cádmio, cobre e chumbo de respectivamente 35%, 18% e 18%. Arias (2007) pôde verificar *in vivo* a inibição de 17,85% da atividade da AchE em tilápias e

60,4% em Aracás na Região de Barra Mansa- Rio de Janeiro, um pólo industrial que traz evidencias dos efeitos dos metais pesados e outros inibidores enzimáticos; verificou ainda inibição de 35,71% da atividade de AchE em tilápias e de 37,5% em Aracás expostos as águas de Paty de Alferes-Rio de Janeiro, região tipicamente agrícola evidenciando os efeitos de inibição por organosforados e carbonatos. Stroparo e Braguini (2011) analisou fumicultores expostos à agrotóxicos e verificou a inibição de 59,3% para homens e 32,2% para mulheres do grupo amostral e ainda afirmou que a inibição da AchE sérica pode não ser provavelmente o único mecanismo pelo qual os compostos organofosforados provocam a intoxicação, entretanto, esse mecanismo de ação pode está associado à quadros de intoxicação. Mela (2004) verificou diminuição da atividade catalítica da colinesterase *in vivo* da traíra exposta a baixas doses de metilmercúrio.

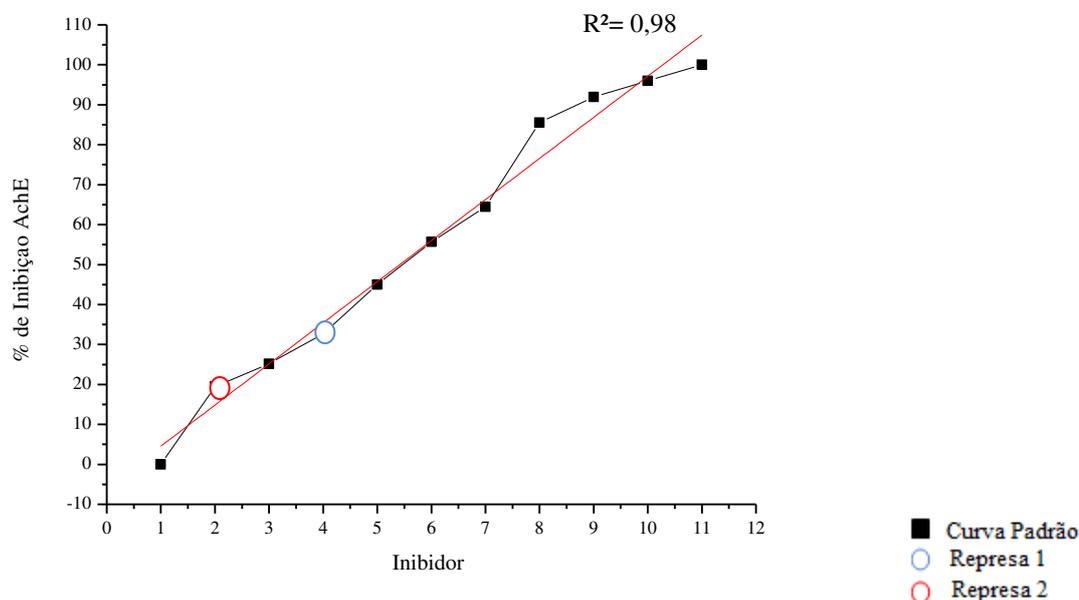
**Gráfico 2-**Relação entre a concentração do inibidor (Malathion) e a porcentagem de inibição enzimática da acetilcolinesterase do soro humano da curva padrão com respectivo erro.



**Tabela 4-** Valores de absorbância e porcentagem de inibição das amostras de água obtidas no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA).

Amostras	Absorbância Média	% de inibição Enzimática
Represa 1	0,042±0,02475	32,73± 6,08
Represa 2	0,071± 0,014	19,455± 2,30

**Gráfico 3-**Relação entre a concentração do inibidor e a porcentagem de inibição enzimática da AchE do soro humano.



De acordo com o IBGE (2002) entre as causas mais apontadas de contaminação dos recursos hídricos estão: a disposição inadequada de resíduos sólidos e a utilização e descarte inadequado de embalagens de agroquímicos. No Nordeste, 44% das causas de contaminação aquática estão relacionadas com a disposição inadequada dos resíduos e 38% das causas de contaminação dos recursos hídricos estão relacionados com o uso e descarte inadequado de embalagens de agrotóxicos e fertilizantes. Devido à proximidade entre as represas e o vazadouro a céu aberto pode-se dizer que a inibição pode está relacionada com contaminantes vindo do “lixão”, em especial os metais pesados por serem substâncias recalcitrantes.

A ligação dos metais à enzima AchE, ocorre geralmente de maneira irreversível e, na maioria das vezes, tende a reduzir a atividade enzimática (MARQUES; YAMANAKA, 2008) como observado nesse experimento. Costa (2005) relata a persistência dos metais (Al, Ba, Fe, Mn, Ni e Pb) e a potencialidade de contaminação de águas por metais presentes nos vazadouros à céu aberto, uma vez que, conseguiu observar após 30 anos de desativação do “lixão” em Belo Horizonte elevadas concentrações do contaminante nas águas subterrâneas.

Metais são contaminantes presentes nas mais diferentes atividades antrópicas. Alguns metais são capazes de apresentar espécies químicas estáveis em solução, o que pode resultar, em acúmulo na coluna d'água, atingindo concentrações relativamente elevadas e mesmo tóxico. Dentre esses metais destacam-se o mercúrio (Hg) componente indispensável para

fabricação de diferentes produtos utilizados no dia-a-dia e que em geral não recebem disposição final adequada como equipamentos e aparelhos elétricos de medidas; produtos farmacêuticos, lâmpadas de néon, fluorescentes e de arco de mercúrio, interruptores, baterias / pilhas; tintas inseticidas, herbicidas, fungicidas, termômetros entre outros. O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta maior toxicidade, além de ser o único metal capaz de sofrer biomagnificação em quase todas as cadeias alimentares, isto é, sua concentração aumenta conforme aumenta o nível trófico da espécie (LACERDA; MALM, 2008). Grimberg e Blauth (1998) afirmam que 88% do mercúrio encontrado nos RSU são oriundos das pilhas.

Os metais ligam-se a grupos específicos da enzima alterando seu sítio (SIMKISS *et al.*, 1993). A formação do complexo enzima-substrato (Acetilcolina- AchE) é o estabelecimento de uma ligação eletrostática entre a carga positiva da acetilcolina e o sítio aniônico da AchE. Assim, quando o sítio aniônico da enzima é substituído por um metal a acetilcolina não será capaz de ligar-se adequadamente a AchE e esta não poderá ser degradada. Diante disso, o potencial de inibição da AchE entre metais dependerá das propriedades dos mesmos como: tamanho iônico, capacidade de formação do composto, eletronegatividade e potencial de redução (GUILHERMINO *et al.*, 1998; GRIPPO; HEATH, 2003; MELA, 2004).

Outra fonte de inibição que pode ser levantada é a presença de resíduos de agroquímicos, principalmente substâncias do grupo dos organofosforados. Com a instalação da UFCG-CDSA e com os princípios de sustentabilidade adotado pelo campus esses insumos deixaram de ser utilizados a aproximadamente cinco anos no campus, onde as águas foram coletadas. Entretanto, a hipótese de contaminação dessas águas por organofosforados não pode ser descartada uma vez que segundo o IBGE (2002) Sumé não dispõe de pontos de coleta de embalagens de agroquímicos, assim, essas embalagens possivelmente são descartadas no vazadouro municipal à céu aberto podendo, devido a proximidade, alcançar as fontes de água do CDSA. Os compostos organofosforados são potentes inibidores da atividade catalítica da enzima AchE. Esses compostos ligam-se covalentemente formando um complexo enzima-substrato muito estável que resulta na inibição da enzima. Essas moléculas apresentam estrutura que permite o encaixe no sítio esteérico da enzima acetilcolinesterase, a partir do grupamento fosfato. Ao contrário da acetilcolina que sofre hidrólise rápida a partir da acetilação, a hidrólise da enzima fosforilada ocorre mais lentamente, levando assim, ao acúmulo de acetilcolina na sinapse (OLIVEIRA, 2011; THOMAS, 2008; SILVA, 2012).

A utilização do soro humano para determinação *in vitro* da atividade enzimática é importante uma vez que alerta para a não utilização da água do CDSA para qualquer fim de consumo humano, uma vez que o consumo dessa água causará efeitos nocivos ao mesmo. Os inibidores da colinesterase, promovem a elevação dos níveis de acetilcolina, levando a síndrome colinérgica aguda, como o surgimento de sinais e sintomas muscarínicos, nicotínicos e no sistema nervoso central, sendo esses sintomas dependentes do nível de inibição da AchE. A inibição da colinesterase em mamíferos é caracterizada principalmente por sintomas como: lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios, cefaléia e agitação, bem como depressão do sistema nervoso central. Em inibições mais severas, acima de 70% da redução da atividade catalítica, observa-se insuficiência respiratória, devido à disfunção do sistema nervoso autônomo (FENICHEL *et al.*, 1972; ARIENS *et al.*, 1972; GUPTA; PETTERSON; DETTBARN, 1986; OLIVEIRA; BURIOLA, 2009; CIT/RS, 2013). Cavaliere *et al.*, (1996), observou uma inibição da AchE plasmática de 67,8% em ratos albinos (*Wistar*) e avaliou que esse nível de inibição da AchE causa intoxicação intensa apresentando sintomas severos de salivação, lagrimejamento, exoftalmia, tremores, dispnéia, fasciculação muscular, ataxia, prostração e diarreia.

Os valores de inibição da atividade catalítica da enzima AchE obtidos neste trabalho, demonstra a contaminação das águas do CDSA por substâncias inibidoras da acetilcolinesterase e deixa evidente a necessidade de conscientização para não utilização da mesma, uma vez, que substâncias inibidoras da colinesterase, como os metais, são bioacumulativos, o que poderá gerar efeito de inibição da enzima gradativamente. Estes resultados, entretanto, apenas pressupõem uma situação que poderá ser melhor analisada a partir da caracterização e determinação das concentrações dessas substâncias anticolinesterásica, uma vez que tratam-se de componentes altamente nocivos a saúde do ambiente e todos os seres vivos. Além disso, deve-se realizar uma avaliação da geomorfologia e estudos dos compartimentos biogeoquímicos do local. A partir dessas avaliações será possível compreender melhor os processos em ocorrência da contaminação do local, e o nível da pluma de contaminação, uma vez que, o lençol freático e micro-bacia do Rio Sucurú poderá também estar recebendo contaminantes advindos do vazadouro.

O estudo dos níveis de contaminação das águas por substâncias provenientes do vazadouro a céu aberto e sua consequente ação sobre a saúde do ambiente e da população é apenas um dos enfoques a ser dado a uma questão que envolve problemas de ordem social, ambiental, sanitária, política e econômica. Assim, este estudo serve de alerta para que as questões relacionadas com os resíduos sólidos tenham maior atenção por parte do poder

público, autoridades responsáveis e da própria população, uma vez que os recursos hídricos são recursos essenciais para sobrevivência dos seres vivos e trata-se de um bem não renovável, devendo ser utilizado conscientemente e conservado.

## 6 CONCLUSÕES

- Os dois reservatórios de água (Represa 1 e Represa 2) do CDSA estão contaminados, oferecendo risco à saúde humana.
- A contaminação dos reservatórios são provenientes do vazadouro municipal.
- A utilização de um bioindicador humano permitiu fazer a inferência direta ao risco de saúde pública.

## 7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABINEE. Associação Brasileira da Indústria Elétrica e Eletrônica (2012). Disponível em <<http://www.abinee.org.br/abinee/decon/decon15.htm>>. Acesso em: 16 de Julho de 2014.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos sólidos: Classificação, **NBR 10004**. Rio de Janeiro: Brasil, 1987.

ALVES, S. R. C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC**. 2003. N° pg. 60. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. **Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Metamidofós**. Reavaliação prevista na RDC nº 10/2008 e detalhada na RDC nº 48/2008. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a12f9200474592189a97de3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+do+metamidof%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 13 de Janeiro de 2014.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUEQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in stream sandrivers. **Ciê. & Saúde coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARIENS, A. T.; MEETER, E.; WOLHIUS, O. L.; VAN BENTHEN, R. M. J. Reversible necrosis at the end-plate region in striated muscles of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. **Experientia**, v. 25, n. 4, p. 57-59, 1972.

AZEVEDO, D. S.; ARAÚJO, T. M. R., CANELA, M. Utilização do teste com a acetilcolinesterase para avaliar a toxicidade do meio durante a hidrólise do metamidofós. **In: 36° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013.

BANASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2003. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004

BERTI, P; DÜSMAN, E; SOARES, L. C. Effects of contamination of aquatic environment by oil and pesticides. **SaBios: Rev. Saúde & Biol.**, v. 4, n. 1, p. 45-51, 2009.

BOCQUNÉ, G; GALGANI, F., TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. **Mar Environ**, v. 30, n. 9, p. 75-89, 1990.

BRAIBANT, M. E. F; ZAPPE, J. A. Química dos Agrotóxicos. **Quím. Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

CARVALHO, I. S. Agrotóxicos: Usos e Implicações. **Mundo e Vida**, v. 2, n. 1, p. 42-51, 2010.

CASTRO, B. B; SOBRAL, O; GUILHERMINO, L; RIBEIRO, R. An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. **Ecotoxicology**. V. 13, n. 7, p. 667–681, 2004.

CAVALCANTE, A. L. M. **Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento Ambiental do Chumbo**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswald Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

CAVALIERE, M. J; CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; PUGA, R.F. Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 3, pg. 267-272, 1996.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Agentes neurotóxicos no ambiente**. Outubro de 2012.

CIT/RS. Centro de informação tecnológica do Rio Grande do Sul. (2013). **Dados Publicados: Relatório de atendimentos 2013**. Disponível em: <[http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/relatório\\_2013.pdf](http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/relatório_2013.pdf)>. Acesso: 20 de agosto de 2014.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Publicada no Diário Oficial da União em: 18 de março de 2005, n. 053, p. 58-63.

CONCEIÇÃO FILHO, J.N. **Avaliação da atividade de colinesterase sérica em pacientes intoxicados por Aldicarb atendidos pelo CIAVE-BA**. 130 f. Monografia (Curso de Especialização em Análises Clínicas) Universidade Católica do Salvador, 2002.

COPATTI, C. E, GARCIA, L.G; BALDISSEROTT, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotrop.**, v. 9, n. 4, p. 235-242, 2009.

COSTA, D. W. Contaminação da água subterrânea por resíduo sólido município de Belo Horizonte - MG. **In: XIII Congresso Brasileiro de águas Subterrâneas**, 2005.

COSTA, L. B; ALVES, A, M. Contaminação de água por resíduos sólidos: uma perspectiva geomorfológica nos municípios de dr. Severiano e Encanto-RN. **Geo Temas**, v. 1, n. 1, p. 79-90, 2011.

DORIA, H. B. **Uso de biomarcadores histológicos e bioquímicos na análise de toxicidade do cloreto de cobre em jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2010. 75 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

ELLMAN, G. L; COURTNEY, D; ANDRES, V. J; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 88-95, 1961.

FARIA, B. F., **A influência das áreas de disposição de resíduos sólidos da cidade de Campinas, SP na qualidade das águas: determinação de metais empregando a fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncrotron**. 2008. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil na área de Saneamento e Ambiente), Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, São Paulo, 2008.

FENICHEL, G. M.; KIBLER, W. B.; OLSON, M.D.; DETTBARN, W. D. Chronic inhibition of cholinesterase as a cause of myopathy. **Neurology**, v. 22, n. 5, p. 1026-1033, 1972.

FIGUEIREDO-FILHO, D. B; SILVA- JUNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (R). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, p. 23-31, 2010.

FONSECA, E. **Iniciação ao estudo dos resíduos sólidos e da limpeza urbana**. 122 p. João Pessoa, 1999.

FRANÇA, R, G.; RUARO; E. C. R. Diagnóstico da disposição final dos resíduos sólidos urbanos na região da Associação dos Municípios do Alto Irani (AMAI), Santa Catarina. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, pg. 2191-2197, 2009.

GALLO D., NAKANO O., NETO S., CARVALHO R., BAPTISTA G., FILHO E., PARRA J., ZUCCHI R., ALVES S., VENDRAMIN J., MARCHINI L., LOPES J., OMOTO C. 2002. Toxicologia de Inseticidas, pp. 361-396. *In.* Entomologia Agrícola, FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queirós, Piracicaba, SP. 2002.

GOLOMBIESKI, J. I; MARCHESAN, E; CAMARGO, E. R; SALBEGO, J; BAUMART, J. S; LORO, V. L; MACHADO, S. L. O; ZANELLA, R; BALDISSEROTTO, B. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.** v. 65, n. 4, p. 340-345, 2008.

GOMES, J. A.; OGURA, S.K. **Componentes potencialmente perigosos presentes no lixo doméstico**. São Paulo: IPT, 1993

GRIMBERG, E.; BLAUTH, P. **Coleta seletiva: reciclando materiais, reciclando valores**. n. 31. São Paulo, 1998.

GRIPPO, M. A.; HEATH, A. G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephal espromelas*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v.55, n. 6, p. 187-198, 2003.

GRIZA, F., ORTIZ, S. K; GEREMIAS, D. Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de rondinha - Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1631-1635, 2008.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C.; SOARES, A.M.V.M. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. **Biomarkers**, v. 3, n. 3, pg. 157-163, 1998.

GUPTA, R. C.; PETERSON, G.T.; DETTBARN, W. D. Mechanisms of toxicity and tolerance to diisopropyl fluoridate at the neuromuscular junction of the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 84, n. 3, p. 541-550, 1986.

GUYTON, A. C. M. D. **Fisiologia Humana e Mecanismos das doenças**. Guanabara Koogan. 5ª Ed. Rio de Janeiro, 1993.

HELLER, L; PÁDUA, V. L. **Abastecimento de água para o consumo humano**. Ed. UFMG. Belo Horizonte, 2006.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores do Desenvolvimento Sustentável**. p. 59. Rio de Janeiro, 2010.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002). **Pesquisa de Informação Básica dos municípios, Perfil dos municípios Brasileiros, Meio Ambiente**. Rio de Janeiro, 2005.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro, 2008.

JARDIM, I. C. S. F; ANDRADE, J. A. S; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Quím. Nova**, v.32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, N. Lixo municipal- manual de gerenciamento integrado. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo: Cempre, 1995.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LIMA, P. C. S. **Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: alterações bioquímicas e comportamentais**. **Rev. Saúde Pública**, v. 3, n. 6, p.103, Rio de Janeiro, 2013.

LINHARES, C. E. B; DAGIOS, G; CARATI, M. R; GASPARIN, M. P; SPADER, T; MARKUS,P. G; BOLZAN, R. C. Níveis basais de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em agricultores da região de Frederico Westphalen – RS. **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, v.31, n.1, p. 35-37, 2005

LINS, G. A. Impactos ambientais em Estações de tratamento de Esgotos. 2010. 286 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós-graduação em Engenharia ambiental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1791-1799, 2008.

MELA, M. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). 2004. 138 f. Dissertação (Mestre em ciências Biológicas), Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2004.

MOTTA, Valter T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Médica Missau**, v. 1, n. 3. p. 388, 2000.

NOGUEIRA, A; CARDOSO, M; DELGADILLO, I; ALMEIDA, A. Qualidade microbiológica e química das águas de consumo humano de Bragança. **Rev. Port. Da Saúde Publica**, v.27, n. 1, p. 26-31, 2009.

OLIVEIRA, C. P. F. **Efeito de cobre e chumbo presentes na água de formação derivada da Extração do Petróleo da província petrolífera do Urucu-AM, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum***. 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de água doce e Pesca interior), Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Manaus, 2003.

OLIVEIRA, M. L. F.; BURIOLA, A. A. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do Paraná, Brasil. **Rev. Gaúcha de Enfermagem**, v. 30, n. 4, p. 648-655, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, R. P.F.; BEZERRA, R. S.. Efeitos do  $FeCl_2$  e  $CuCl_2$  na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. **Natural Resources**, v.2, n.2, p.27-36, 2012.

OLIVEIRA, V. M; ASSIS, C. R. D; BEZERRA, R.S. Acetylcholinesterase activity *in vitro* of brain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sensitive heavy metals. **Biológico**, v. 73, n. 2, p. 255-259, 2011.

OLLE, C. D. **Efeito do inseticida organofosforados Metil parathion sobre o efeito respiratório em peixes teolósiomatrinxã, *Bryconcaphalus***. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Fisiologia), Departamento de Ciência Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ONU. Organizações das Nações Unidas. Assembléia Geral da Cooperação da água. Rio de Janeiro, 2013

PEIXOTO, M. J. B. B. M. **Qualidade Biológica da Água do Rio Cávado**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2008.

ROCHA, A. A; PEREIRA, D. N; PÁDUA, H.B. Produtos de pesca e contaminantes Bioquímicos na água da represa Billings, São Paulo, Brasil. **Rev. Saú. Pública**, v.19, n. 2, p. 401-410, 1985.

RODRIGUES, S. R. B. **Effects of anticholinesterase compounds on *Lepomis gibbosus***. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada), Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

SANTOS, S. I. P. Estudo de actividade inibidora da acetilcolinesterase e actividade antioxidante por derivados de colina de ácidos cefeico, cinâmico e rosmarínico- Metabolismo *in vitro* destes compostos. (2009). 115 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Médica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

SCHIO, R. **Caracterização toxicológica de produtos domésticos que geram resíduos sólidos perigosos e sua destinação no município de Campo Grande-MS**. 253 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Básico), Programa de Pós-graduação em Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.

SILVA, E. S.; MIDIO, A. F.; GARCIA, E.G. A field method for the determination of whole blood cholinesterase. **Med. Lav.**, v. 85, n. 3, pg. 249-254, 1994.

SILVA, K. C. C. **Caracterização de Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, *Cichla ocellaris*: Efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, R. P. F; OLIVEIRA, V. M; ASSIS, C. R. D; BEZERRA, R. S. Atividade *in vivo* e *in vitro* da butirilcolinesterase muscular de tilápia-do-nilo *oreochromis niloticus* expostas ao alumínio. **Biológico**, v. 73, n. 2, p. 250-254, 2011.

SIMKISS, K.; DANIELS, S.; SMITH, R.H. Effects of population density and cadmium toxicology on growth and survival of blowflies. **Environmental pollution**, v. 81, n. 5, p. 41-45, 1993.

STEPHENSON, E. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbour on the southwest coast of Iceland. **Aquat. Toxicol.**, v. 48, n. 4, p. 431- 442, 2000.

STROPARO, L. F, BRAGUINI, W. L. Avaliação da exposição a organofosforados entre produtores de tabaco de uma localidade do município de Irati-Paraná. **Ciê. Exatas Terra**; v. 17, n. 4, p. 39-50, 2011.

THOMAZ, J. M. Efeito do organofosforadotriclorfon sobre a função cardio- respiratória da Tilápia do Nilo. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 13, n. 21, p. 57-149, 2003.

WEISS, C. M. The determination of cholinesterase in the brain tissues of three species of fresh water fish and its inactivation *in vivo*. **Ecology**, v. 30, p. 194-99, 1958.

ZAPPE, J. A. **Agrotóxicos no Contexto Químico e Social**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de pós Graduação em Ciências: Química da vida e Saúde, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2011.