



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL –
BIONORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
DA REDE BIONORTE

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO
NA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE PARA DETECÇÃO DE
AGROTÓXICOS PIRETROIDES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

ELIANE BRAGA RIBEIRO

São Luís - MA
Dez/2021

ELIANE BRAGA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO
NA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE PARA DETECÇÃO DE
AGROTÓXICOS PIRETROIDES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes

São Luís - MA
Dez/2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro, Eliane Braga.

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO
NA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE PARA DETECÇÃO DE
AGROTÓXICOS PIRETROIDES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS / Eliane
Braga Ribeiro. - 2021.

143 f.

Orientador(a): Gilvanda Silva Nunes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2021.

1. Destino ambiental. 2. Detecção eletroquímica. 3.
Docagem molecular. 4. Inibição enzimática. 5.
Monitoramento ambiental. I. Nunes, Gilvanda Silva. II.
Titulo.

ELIANE BRAGA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO
NA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE PARA DETECÇÃO DE
AGROTÓXICOS PIRETROIDES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 10/12/2021

Banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Gilvanda Silva Nunes (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA - Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Marianna Basso Jorge
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Rosa de Oliveira
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Quintino da Rocha
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Paulo Cesar Mendes Villis
Universidade CEUMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois todas as conquistas e realizações dependem da sua permissão.

À minha família em especial minha mãe Raimunda e ao meu irmão George por todo amor, apoio e confiança a mim, dedicados.

À professora Gilvanda Silva Nunes por ter aceitado ser a minha orientadora, pelos conhecimentos ensinados e toda a contribuição e empenho para a realização desta pesquisa.

Aos professores Paulo Roberto B. O. Marques, Mihaela Badea e a Alexandra Martins dos Santos Soares.

À UFMA e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE por toda a estrutura disponibilizada e pela oportunidade de realizar este curso de Doutorado, bem como à sua coordenação e ao corpo docente por contribuírem para a minha formação.

Aos Laboratórios: NARP (Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas), Eletroquímica e Central Analítica.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) pela concessão do auxílio financeiro.

A todos integrantes e colaboradores do NARP, em especial: Danilo, Andressa, Djanira, Débora, Magda, Rute Sayuri, Fernanda, Rayssa e Gabriela.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desta abençoada pesquisa.

RESUMO

O uso de pesticidas tem gerado diversos transtornos e problemas ambientais. Considerando a necessidade de monitoramento dessas substâncias químicas na natureza, este trabalho tem como objetivo, o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção de inseticidas piretroides, em amostras ambientais. Nesse sentido, foram realizadas análises *in silico* sobre o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas e de docagem molecular da enzima glutatona S-transferase (GST) com nove compostos piretroides. Foram realizadas também análises *in vitro*, como a determinação da atividade enzimática por meio de análise espectrofotométrica e ensaios eletroquímicos de inibição da GST, frente aos inseticidas piretroides. Na ocasião foram preparados biossensores serigrafados à base de GST com eletrodo de trabalho modificados com os mediadores azul de Meldola com sal de Reinecke - MBRS e ftalocianina de cobalto - CoPC. Para análise e caracterização eletroquímica destes dispositivos, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica com faixa de potencial de - 0,8 V a 0,8 V e taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ e cronoamperometria com potencial fixo de 200 mV s⁻¹. Os resultados obtidos indicaram médio potencial de transporte dos inseticidas em associação ao sedimento e baixo potencial para o transporte destas substâncias dissolvidas em água, para a maioria dos inseticidas em estudo. Todos os compostos testados na docagem apresentaram energia negativa de ligação com valores em moldock score variando de -75 a -91, indicando afinidade com o sítio catalítico da enzima. Nas análises espectrofotométricas foram encontrados para a constante de inibição - K_i, valores de 0,12 μmol.L⁻¹ a 20 μmol.L⁻¹, para os compostos fenpropatrina e deltametrina, respectivamente. Para os limites de detecção-LDs foram encontrados valores de 0,03 mg.L⁻¹ a 0,36 mg.L⁻¹, para deltametrina e cipermetrina, respectivamente. As análises eletroquímicas, foram realizadas utilizando-se biossensor modificado com MBRS, o qual apresentou melhor desempenho eletroquímico em relação ao mediador CoPC. Com este dispositivo foram registrados valores de LDs de 3,72 μg.L⁻¹ a 83,54 μg.L⁻¹, respectivamente para lambda-cialotrina (faixa linear de 1 a 50 μg.L⁻¹, R² = 0,99) e cipermetrina (faixa linear de 8 a 200 μg.L⁻¹, R² = 0,98). Com os resultados obtidos considera-se que o biossensor elaborado se mostrou eficaz para aplicação em análise de amostras de produtos agrícolas e análise de água. Assim como apresentou características relevantes, tais como sensibilidade adequada, baixo custo para o seu desenvolvimento, simplificado processo de construção e manuseio, boa reprodutibilidade e estabilidade ao longo do tempo de análise. Salienta-se que a associação das metodologias *in silico* e *in vitro* aqui aplicadas, constituíram uma importante estratégia para a realização desta pesquisa, tendo em vista que o protótipo elaborado pode auxiliar no monitoramento e controle ambiental de agroquímicos piretroides. Ressalta-se também que o presente estudo gerou publicações de dados iniciais em revistas científicas e outros artigos foram submetidos para revistas nacionais e internacionais e aguardam parecer. Uma patente de inovação foi gerada como produto da presente Tese e depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, antes mesmo da data de defesa deste estudo.

Palavras-chave: inibição enzimática; docagem molecular; detecção eletroquímica; destino ambiental; monitoramento ambiental.

ABSTRACT

The use of pesticides has generated several disorders and environmental problems. Considering the need to monitor these chemicals in nature, this work aims to develop an amperometric biosensor for the detection of pyrethroid insecticides in environmental samples. In this sense, *in silico* analyzes were carried out on the potential for contamination of surface and groundwater and molecular docking of the enzyme glutathione S-transferase (GST) with nine pyrethroid compounds. *In vitro* analyzes were also performed, such as the determination of enzymatic activity through spectrophotometric analysis and electrochemical GST inhibition assays against pyrethroid insecticides. On that occasion, screen-printed biosensors based on GST were prepared with working electrode modified with the mediators Meldola blue with Reinecke's salt - MBRS and cobalt phthalocyanine - CoPC. For electrochemical analysis and characterization of these devices, cyclic voltammetry techniques with a potential range of -0.8 V to 0.8 V and a sweep rate of 50 mV s⁻¹ and chronoamperometry with a fixed potential of 200 mV s⁻¹ were used. The results obtained indicated medium potential for transport of insecticides in association with sediment and low potential for transport of these substances dissolved in water, for most of the insecticides under study. All compounds tested during docking showed negative binding energy with moldock scores ranging from -75 to -91, indicating affinity with the catalytic site of the enzyme. In the spectrophotometric analysis, values from 0.12 μmol.L⁻¹ to 20 μmol.L⁻¹ were found for the inhibition constant - K_i, for the compounds fenpropathrin and deltamethrin, respectively. For the detection limits-LDs, values from 0.03 mg.L⁻¹ to 0.36 mg.L⁻¹ were found for deltamethrin and cypermethrin, respectively. The electrochemical analyzes were performed using a biosensor modified with MBRS, which presented better electrochemical performance in relation to the CoPC mediator. With this device, LD values from 3.72 μg.L⁻¹ to 83.54 μg.L⁻¹ were recorded, respectively for lambda-cyhalothrin (linear range from 1 to 50 μg.L⁻¹, R² = 0.99) and cypermethrin (linear range from 8 to 200 μg.L⁻¹, R² = 0.98). With the results obtained, it is considered that the elaborated biosensor proved to be effective for application in the analysis of samples of agricultural products and water analysis. It also presented relevant characteristics, such as adequate sensitivity, low cost for its development, simplified construction and handling process, good reproducibility and stability over time of analysis. It should be noted that the association of *in silico* and *in vitro* methodologies applied here constituted an important strategy for carrying out this research, considering that the prototype developed can help in the monitoring and environmental control of pyrethroid agrochemicals. It is also noteworthy that the present study generated publications of initial data in scientific journals and other articles were submitted to national and international journals and are awaiting an opinion. An innovation patent was generated as a product of this Thesis and deposited at the National Institute of Industrial Property – INPI, even before the date of defense of this study.

Keywords: Enzyme inhibition; molecular docking; electrochemical detection; environmental destination; environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química das piretrinas.	23
Figura 2 - Representação da ação do inseticida piretroide no sistema nervoso do organismo alvo.	28
Figura 3 - Representação esquemática dos componentes de um biossensor.	32
Figura 4 - Tipos de transdutores empregados em biossensores.	33
Figura 5 - Reação da glutathione reduzida - GSH e o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - CDNB, catalisada por glutathione S-transferase – GST.	36
Figura 6 - Representação do processo de docagem molecular.	46
Figura 7 - Sequência proteica da cadeia A da GST.	47
Figura 8 - Estrutura co-cristalizada da GST complexada com o ligante natural (em destaque no recorte).	47
Figura 9 - Representação da deposição das camadas do sensor serigrafado com três eletrodos, por meio da máquina de serigrafia.	55
Figura 10 - Representação de um sensor serigrafado com três eletrodos.	56
Figura 11 - Estrutura química dos inseticidas piretroides analisados.	61
Figura 12 - Visualização da cadeia A da estrutura co-cristalizada da GST (1XWK.PDB) isolada no programa Pymol.	66
Figura 13 - Visualização do glutathionil-S-dinitrobenzeno co-cristalizado (azul) e a melhor pose de glutathionil-S-dinitrobenzeno (vermelho) ancorado contra a cadeia A da glutathione S-transferase - GST (superfície branca).	67
Figura 14 - Visualização da análise de docking de GST, cadeia A, ligando-se a deltametrina (superfície verde).	67
Figura 15 - Valores de energia (Moldock Score) para docking molecular de compostos piretroides contra a glutathione S-transferase (1XWK.pdb). Cada barra representa a pontuação MolDock média das cinco melhores poses de encaixe. Gluta = glutathionil, ale = aletrina, lambda = lambda-cialotrina, tetra = tetrametrina, ciper = cipermetrina, delta = deltametrina, perme = permetrina, esfen = esfenvalerato, bifen = bifentrina e fenpro = fenpropatrina.	68
Figura 16 - Gráfico de Pareto representando a influência das concentrações dos substratos 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH) e a carga da enzima glutathione S- transferase (GST), nos resultados cinéticos.	69

Figura 17 - Efeitos principais dos parâmetros no sistema cinético enzimático: concentrações dos substratos 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutathiona reduzida (GSH) e carga da enzima glutathiona S- transferase (GST).....	70
Figura 18 - Gráfico das interações no sistema cinético enzimático.	71
Figura 19 - Gráficos de superfície de resposta. (a) com o fator GSH fixo (0,5 mmol.L ⁻¹), relacionando os fatores concentração de CDNB e carga da enzima GST no sistema. (b) com o fator CDNB fixo (0,2 mmol.L ⁻¹) relacionando os fatores concentração de GSH e carga da enzima e (c) com o fator carga da enzima fixo (0,0125 U.mL ⁻¹), relacionando os fatores GSH e CDNB.....	72
Figura 20 - Plotagem do inverso da velocidade pelo inverso da concentração de (a) GSH e (b) CDNB conforme método Lineweaver-Burk.	74
Figura 21 - Curvas de inibição para os nove pesticidas em estudo, obtidas por ensaios espectrofotométricos, destacando-se a faixa linear.	77
Figura 22 - Representação de Lineweaver-Burk para a enzima GST na presença de inibidores piretroides: não competitivos (a) lambda-cialotrina, esfenvalerato (b) aletrina, deltametrina; competitivos (c) tetrametrina, bifentrina, permetrina e (d) cipermetrina, fenpropatrina.....	82
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono (grafite) sem mediador, com mediador CoPC e MBRS em solução tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 6,5 sem enzima (GST) (a) e com enzima imobilizada no eletrodo de trabalho (b). Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	86
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono (grafite) sem mediador, com mediadores (CoPC e MBRS) sem enzima (GST) (a) e com enzima (b) em substrato enzimático (GSH 7,0 mmol.L ⁻¹ e CDNB 0,2 mmol.L ⁻¹). Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	87
Figura 25 – Análise do potencial de trabalho cronoamperométrico.....	88
Figura 26 - Reação da enzima GST monitorada pelo biossensor eletroquímico.....	89
Figura 27 - Curvas de inibição para os nove pesticidas em estudo, obtidas por ensaios cronoamperométricos, destacando-se a faixa linear.	91
Figura 28 - Valores percentuais de Inibição Relativa – IR referente a detecção de pesticidas, utilizando biossensor baseado na GST, em amostras de água coletadas em diferentes pontos do Rio Bacanga, em São Luís, MA.....	96

Figura 29 - Mapa da área de coleta das amostras de água em diferentes pontos do Rio Bacanga, São Luís, MA.....	97
Figura 30 - Gráfico de controle estatístico para monitoramento da reprodutibilidade de 10 biossensores com mediador MBRS, à base de GST.....	99
Figura 31 - Gráfico de controle estatístico para monitoramento da estabilidade do mesmo biossensor com mediador MBRS, à base de GST.	100
Figura A1 – Foto do espectrofotômetro utilizado para os ensaios cinéticos.....	118
Figura B1 - Potenciostato utilizado para a realização dos ensaios eletroquímicos.....	119
Figura B2 – Fotos do conector feito sob encomenda para acoplamento do biossensor durante os ensaios eletroquímicos.....	117
Figura C1 – Estrutura dos ligantes piretroides usadas na docagem molecular.....	120
Figura D1- Máquina de serigrafia, no momento da produção de sensores eletroquímicos (eletrodos), a partir da deposição sucessiva de camadas de tinta e pastas de grafite e Ag/AgCl, sobre uma placa fina de PVC.....	121
Figura D2- Cartela de eletrodos serigrafados.....	121
Figura E1- Docking molecular do inseticida piretroide aletrina à cadeia A da enzima glutationa S-transferase (GST) por meio do software Molegro Virtual Docker - MVD 6.0.....	122
Figura G1 - Artigo publicado no periódico Geintec.....	135
Figura H1 - Artigo publicado no periódico Química Nova.....	142
Figura I1 - Artigo submetido ao periódico Sensors And Actuators Reports.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de alguns piretroides comumente comercializados no Brasil.....	24
Tabela 2 - Classes da enzima glutathione S-transferase.....	35
Tabela 3 - Potencial de transporte dos inseticidas piretroides de acordo com o Método de Goss	45
Tabela 4 - Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2^3 para determinação cinética da atividade da enzima GST	49
Tabela 5 - Esquema experimental dos ensaios cinéticos conforme o planejamento fatorial.....	49
Tabela 6 - Ensaios cinéticos catalisados pela enzima GST, em função da concentração do substrato CDNB.....	50
Tabela 7 - Ensaios cinéticos catalisados pela enzima GST, em função da concentração do substrato GSH.....	51
Tabela 8 - Dados do ensaio para a inibição relativa da enzima GST na presença do pesticida cipermetrina.....	53
Tabela 9 - Dados do ensaio com enzima GST na presença do pesticida cipermetrina para obtenção da constante de inibição- K_i	54
Tabela 10 - Características físico-químicas e sobre o comportamento ambiental dos inseticidas piretroides estudados	60
Tabela 11 - Potencial de transporte para os inseticidas piretroides de acordo com o Método de Goss	63
Tabela 12 - Potencial de lixiviação dos inseticidas piretroides de acordo com o Índice GUS	65
Tabela 13 - Características referente ao modelo estrutural da enzima selecionada	66
Tabela 14 - Parâmetros cinéticos de GST em relação ao CDNB e a GSH.....	75
Tabela 15 - Dados analíticos em termos de equação da reta, faixa de linearidade e limites de detecção, obtidos por espectrofotometria	78
Tabela 16 - Capacidade inibitória dos diferentes pesticidas piretroides sobre a GST ...	79
Tabela 17 - Parâmetros cinéticos da enzima GST na presença de inibidores piretroides e valores de K_i	83
Tabela 18 - Dados para a constante de inibição relatados na literatura.....	84

Tabela 19 - Dados analíticos referentes ao biossensor em termos de equação da reta, faixa de linearidade e limites de detecção, obtidos por cronoamperometria.....	92
Tabela 20 - Dados sobre o desempenho de biossensores relatados na literatura e do presente estudo	92
Tabela 21 - Limites máximos de resíduos (LMR) de piretroides e os parâmetros sobre a Ingestão diária aceitável (IDA).....	94
Tabela 22 - Condições operacionais do biossensor desenvolvido para detecção de inseticidas piretroides	94
Tabela F1– Resultados do ensaio cinético da GST sem inibidor, em função do CDNB.....	123
Tabela F2 – Resultados do ensaio cinético da GST sem inibidor, em função da GSH.....	123

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Pesticidas	22
2.2	Piretroides	22
2.2.1	Ação inseticida dos piretroides	26
2.2.2	Efeitos tóxicos dos piretroides nos organismos	29
2.2.3	Exposição humana a piretroides e a contaminação ambiental	30
2.3	Ferramentas Bioanalíticas para Monitoramento de Pesticidas	31
2.4	Glutathione S- Transferase e a Aplicação em Biossensores	34
3.	JUSTIFICATIVA	38
4.	OBJETIVOS	40
4.1	Geral	41
4.2	Específicos	41
5.	MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1	Reagentes e Soluções	43
5.2	Equipamentos e Acessórios	43
5.3	Estudo <i>In Silico</i> do Potencial de Contaminação Aquática por Pesticidas Piretroides	44
5.4	Estudo <i>In Silico</i> por Docagem Molecular	46
5.4.1	Obtenção da proteína de referência	46
5.4.2	Obtenção das estruturas dos ligantes inibidores	47
5.4.3	Docagem molecular	48
5.4.4	Re-docking	48
5.5	Determinação Espectrofotométrica da Atividade Enzimática	49
5.5.1	Ensaio enzimático da GST na ausência de inibidores piretroides	49
5.5.2	Ensaio de inibição da enzima GST por inseticidas piretroides	51
5.6	Elaboração de Biossensor à Base da Enzima GST para Detecção de Piretroides	55
5.6.1	Preparo do sensor serigrafado	55
5.6.2	Preparo do biossensor: imobilização da enzima GST	56
5.6.3	Medidas eletroquímicas dos sensores e biossensores	57
5.6.4	Medidas eletroquímicas de inibição da glutathione S-transferase	57

5.6.5	Investigação da presença de pesticidas piretroides em águas do Rio Bacanga.....	58
5.6.6	Estudo da estabilidade dos biossensores	58
5.7	Tratamento de dados.....	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	Análise do Potencial de Contaminação Aquática por Pesticidas Piretroides..	60
6.2	Análise do Estudo <i>In Silico</i> por Docagem Molecular.....	65
6.3	Análise Quimiométrica: Otimização do Ensaio Espectrofotométrico.....	69
6.4	Cinética Enzimática na Ausência dos Inseticidas Piretroides.....	73
6.5	Cinética de Inibição por Inseticidas Piretroides.....	76
6.5.1	Curvas de inibição relativa e IC ₅₀	76
6.5.2	Determinação da constante de inibição - K _i	80
6.6	Princípio Bioquímico do Biossensor Enzimático	84
6.7	Caracterização Eletroquímica dos Sensores e Biossensores.....	85
6.8	Princípio da Inibição Enzimática.....	89
6.9	Avaliação Eletroquímica do Efeito Inibitório de Pesticidas Piretroides	89
6.10	Aplicação de Biossensor a Base de GST para Detecção de Piretroides em Águas Superficiais	95
6.11	Análise da Estabilidade do Biossensor.....	98
7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICES	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O lançamento de poluentes no ambiente é um dos principais problemas geradores de degradação dos ecossistemas. Tais contaminantes são provenientes das atividades antrópicas, que tem avançado de forma preocupante sobre o ambiente natural, afetando a biota e contaminando os compartimentos ambientais, tais como: o ar, o solo, as águas superficiais e subterrâneas (CHRUSTEK *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2018).

Dentre as substâncias que provocam poluição ambiental estão os pesticidas. Conforme o aspecto a ser ressaltado, podem receber diferentes denominações, como defensivos agrícolas, evidenciando a sua ação protetiva ao plantio; ou agrotóxico, destacando o seu aspecto tóxico quando aplicado (ALVES e OLIVEIRA-SILVA, 2003; MENDES *et al.*, 2019).

Estes compostos químicos são comumente utilizados no ambiente doméstico e em atividades agropecuárias. Na agricultura moderna, os pesticidas têm uma relevante função no que se refere ao aumento da produção mundial de alimentos e redução de plantas daninhas e pragas, em meio às culturas (ABOUZIENA e HAGGAG, 2016; BITTENCOURT-JUNIOR e SOARES, 2013).

Assegurar a produção de alimentos em quantidade e qualidade adequada para uma população em crescente expansão, sem provocar impactos ambientais, constitui-se um grande desafio para as práticas agrícolas (NASCIMENTO e MELNYK, 2016). Sobretudo no Brasil, conforme Cassal *et al.* (2014) em 2002, foram disponibilizados para o agricultor brasileiro 2.011 produtos formulados com registro no Ministério da Agricultura, sendo 655 herbicidas, 556 inseticidas, 259 acaricidas e 58 nematicidas. De acordo com dados deste Ministério, em 2020 houve o registro de mais 493 formulações de agrotóxicos, sendo a maioria baseados em formulações já existentes. Esse quantitativo é 4% superior ao ano de 2019, quando foram liberados outros 474 pesticidas.

Estes produtos envolvem uma grande variedade de substâncias químicas com distintos grupos funcionais e modos de ação, biotransformação e eliminação. As classes químicas são compostas por organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretroides, derivados de uréia, bipiridílios e nitrocompostos, de forma que muitas dessas

substâncias podem ocasionar riscos à saúde e ao meio ambiente (GALLI *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2019).

Diversos estudos relatam que o crescente uso de pesticidas tem gerado uma série de transtornos e modificações para o meio ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela sua acumulação nos segmentos ecossistêmicos (CASSAL *et al.*, 2014; MARONI *et al.*, 2000; NASCIMENTO e MELNYK, 2016)

Com isso observa-se a necessidade de realizar estudo no sentido de identificar a presença de resíduos dos pesticidas no ambiente, sobretudo dos piretroides, que compõem o grupo de pesticidas bastante utilizado na atividade agrícola e são amplamente aplicados em propriedades residenciais e comerciais (EPA, 2020; MONTANHA e PIMPÃO, 2012; TANG *et al.*, 2018).

O monitoramento de pesticidas no ambiente é uma ferramenta importante para a caracterização e o gerenciamento dos riscos ambientais decorrentes do uso desses produtos em condições reais e pode fazer parte da avaliação no processo de registro de novos produtos ou da reavaliação de produtos em uso (RIBEIRO *et al.*, 2007; RUBIO e GONÇALVEZ, 2017).

Neste contexto, os biossensores surgem como equipamentos valiosos para a determinação de poluentes ambientais. Oliveira *et al.* (2015) esclarecem que os biossensores são dispositivos que combinam a atividade seletiva de elementos de reconhecimento biológico (enzimas, DNA, antígenos, anticorpos, células, organelas, tecido animal ou vegetal, entre outros) sensíveis a uma substância de interesse, a um transdutor que converte a reação de reconhecimento em um sinal mensurável, que pode ser elétrico, térmico ou acústico.

Dessa forma, a presente proposta de pesquisa visa contribuir com o conhecimento científico sobre a detecção de pesticidas piretroides, através do desenvolvimento de um biossensor utilizando, como elemento de bioreconhecimento, a enzima glutathione S-transferase. Este dispositivo poderá ser empregado em trabalhos de monitoramento *in situ*, de forma a contribuir com o controle ambiental.

Revisão de Literatura¹

¹ Parte desta seção foi publicada no artigo “Biossensores Enzimáticos para Determinação de Pesticidas” no periódico GEINTEC - Gestão Inovação e Tecnologias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pesticidas

Pesticidas são agentes químicos usados desde o início da história da humanidade para erradicar, combater ou controlar organismos nocivos ou indesejáveis denominados de “pragas”. No entanto, o seu uso se tornou muito mais comum nos tempos modernos e uma variedade muito maior de substâncias tem sido usada (COLOSIO *et al.*, 2017).

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo, sendo a agricultura a que mais utiliza essas substâncias químicas tóxicas (PARANÁ, 2018). De acordo com a finalidade ou organismo alvo, podem ser classificadas como: inseticidas, herbicidas, fungicidas, desfolhantes, preservantes de madeira e dessecantes (MENDES *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2008).

De acordo com EPA (2020) os inseticidas mais comumente usados são os organofosforados, piretroides e carbamatos. Os piretroides constituem uma classe de inseticidas utilizados mundialmente, respondendo por mais de 17% do mercado global de agroquímicos (MORGAN *et al.*, 2018). Os piretroides se tornaram populares na década de 1990 como substitutos de pesticidas mais antigos, que foram descontinuados por razões ambientais e de saúde humana, devido à alta toxicidade (FIGUEIREDO, 2014; XAVIER *et al.*, 2007). O nome dessa classe de pesticida está relacionado a sua origem.

2.2 Piretroides

O termo piretro refere-se às oleorresinas, que são extraídas das flores secas, de espécies popularmente denominadas de crisântemos (gênero *Chrysanthemum*), que contêm os princípios ativos conhecidos coletivamente como piretrinas e que se dividem em piretrinas I e II, jasmolinas I e II e cinerinas I e II (MOURA e SCHLICHTING, 2007; SILVA *et al.*, 2019) como mostra a Figura 1. As piretrinas são substâncias químicas ativas que foram identificadas e isoladas no século XX como ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico (RODRIGUES, 2010). Os ésteres ceto-alcoólicos desses ácidos são responsáveis por suas propriedades praguicidas (REHMAN *et al.*, 2014).

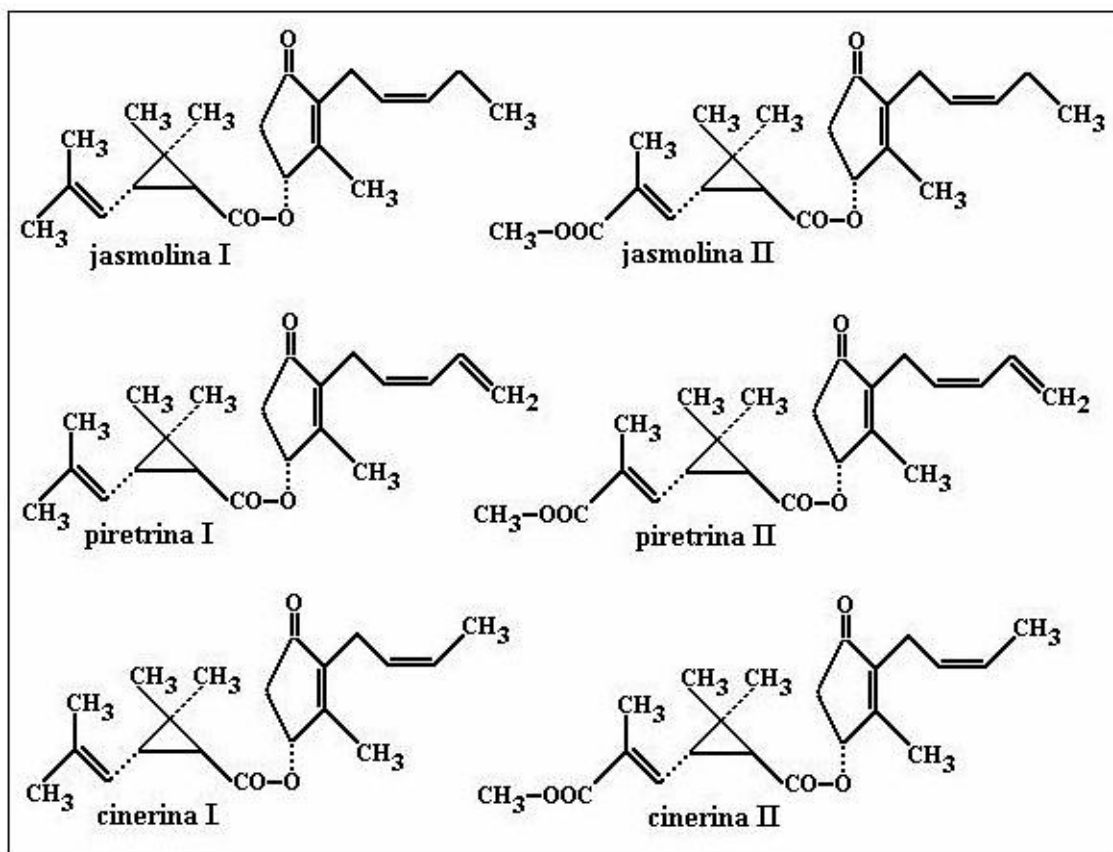


Figura 1- Estrutura química das piretrinas.

Fonte: RODRIGUES, 2010.

A literatura relata que o piretro, há mais de 2 séculos têm sido utilizado como praguicida, a exemplo da região do Cáucaso e do Norte do Irã, no século XVII, onde piretro foi muito utilizado nos cultivos dessa época (MOURA e SCHLICHTING, 2007), também no início do século XIX, para o combate de piolhos por tribos persas e caucasianas e em meados desse mesmo século, onde foi muito empregado contra insetos no ambiente doméstico, em instalações como celeiros e estábulos, assim como em locais de armazenagem dos estoques de produtos agrícolas (RODRIGUES, 2010).

Contudo, as piretrinas naturais são substâncias bastante instáveis quando expostas no ambiente (ao calor, à luz, ao ar) o que diminui a sua capacidade no controle de pragas da agricultura e de outros insetos, além disso, são pouco solúveis em água e se hidrolisam rapidamente na presença de substâncias alcalinas (SANTOS *et al.*, 2007; PARANÁ, 2018).

Visando a obtenção de maior estabilidade ambiental e potencial praguicida, os compostos orgânicos, conhecidos como piretroides, foram sintetizados a partir das piretrinas naturais (GAJENDIRAN e ABRAHAM, 2018). Os piretroides sintéticos, são

semelhantes às substâncias naturais, porém sofreram mudanças em sua estrutura para se tornarem menos voláteis e mais eficientes no campo (PARANÁ, 2018).

De forma que, foi desenvolvida uma ampla gama de estruturas piretroides, as quais são direcionadas a múltiplos usos desde a veterinária, medicina, controle de pragas domésticas e agrícolas (SODERLUND *et al.*, 2002). A síntese desses compostos foi um passo importante na química sintética de produtos naturais e a partir deles foram produzidos diversos outros produtos que alcançaram sucesso comercial (MOURA e SCHLICHTING, 2007), conforme exemplos destacados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplo de alguns piretroides comumente comercializados no Brasil

Ingrediente ativo	Indicação de uso	Nomes comerciais ou comuns
Aletrina, tetrametrina, cifenotrina	Doméstico	D'Fim multiuso
Transflutrina, imiprotrina e cipermetrina	Doméstico	SBP
Cipermetrina e imiprotrina	Doméstico	Mortein
Ciflutrina, transflutrina, carbamatos propoxures e clorpirifós	Doméstico	Baygon
Aletrina	Doméstico	Raid
Esbiotrina	Doméstico	Fort repelente elétrico
Cipermetrina	Doméstico, agropecuário	Cyperex, Butox, Arrivo, Nortrin, Polytrin
Permetrina	Doméstico, agropecuário	Kwell, Keltrina, Nedax, Gemini, Pounce
Alfacipermetrina	Doméstico, agropecuário	Fersol, Potent, Imunit
Lambda - cialotrina	Doméstico, agropecuário	Lambda, Karate, Engeo Pleno
Fenpropatrina	Agropecuário, saúde pública	Danimen, Sumirody
Deltametrina	Doméstico, agropecuário	K-O-thrine, Decis, Escabin, Deltacid
Deltametrina	Agropecuário	Decis 25 EC
Permetrina	Agropecuário	Ambush-Pounce
Cipermetrina	Agropecuário	Cymbush
.D-Aletrina, D-Tetrametrina e Cifenotrina-S	Doméstico	Multi inseticida multipik Citromax

Fonte: O autor (adaptado de PARANÁ, 2018).

Os nove piretroides selecionadas para esta pesquisa (aletrina, bifentrina, deltametrina, cipermetrina, esfenvalerato, fenpropratrina, lambda-cialotrina, permetrina e tetrametrina) são exemplos de inseticidas comumente utilizados no Brasil (EPA, 2020; MONTANHA e PIMPÃO, 2012; Tang *et al.*, 2018).

Aletrina [2-metil-4-oxo-3-(2-propanil)-2-ciclopenten-1-il-2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil ciclopropano)-carboxilato], surgiu em 1949, foi o primeiro praguicida piretroide comercial desenvolvido (BRADBERRY *et al.*, 2005; MOURA e SCHLICHTING, 2007; REBELO e CALDAS, 2014). É um inseticida usado quase exclusivamente em situação doméstica para o controle de pragas de insetos voadores principalmente mosquitos, moscas domésticas, vespas e formigas (BRADBERRY *et al.*, 2005). Bifentrina [2-metilbifenil-3-ilmetil (Z)-(IRS)-cis-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato], surgiu por volta de 1984, é uma substância insolúvel em água e tem uma meia-vida relativamente longa (8 a 17 meses) (ROGERS *et al.*, 2016). Possui amplo espectro para uso em uma gama de culturas para controlar pragas foliares sugadoras e picadoras (PPDB, 2022).

Deltametrina [(S)-a-ciano-3-fenoxibenzil(1R,3R)-3-(2,2-dibromvinil)-2,2-dimetilciclo-propanocarboxilato] é um potente inseticida de amplo espectro usado em uma variedade de aplicações agrícolas, de saúde pública e domésticas (CUNHA *et al.*, 2018). Foi descrito pela primeira vez em 1974 e comercializado em 1978 (PRUSTY *et al.*, 2015). Cipermetrina [(RS)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato] é um composto altamente ativo relatado pela primeira vez em 1975, é utilizado para controlar pragas como pulgões, gorgulhos, lagartas, mosca amarela de cereais e besouros.

Esfenvalerato (S)-a-ciano-3-fenoxibenzi (S)-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato, foi relatado 1979 pela primeira vez, é frequentemente fornecido como um concentrado emulsionável que é misturado com água e aplicado como spray e possui eficácia no combate a: carrapatos, pulgas, besouros de pepino, formigas carpinteiras e baratas (PPDB, 2022). Fenpropratrina (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxilato é um composto com aplicação foliar em diversas culturas como algodão, aveia, berinjela, café, cebola, centeio, cevada, feijão, jiló, maçã, mamão entre outras frutas e legumes (ANVISA, 2021). Seu primeiro relato foi em 1981 e é utilizado para o controle de ácaros, moscas brancas, lagartas, pulgões; mariposas, vermes e brocas do caule (PPDB, 2022).

Lambda-cialotrina (R)-a-ciano-3-fenoxibenzil (1S)-cis-3-[(Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil]-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato, é um inseticida com ação rápida usado para controlar um amplo espectro de culturas agrícolas e pragas de saúde pública (mosquitos, carrapatos e moscas). Foi identificado em 1984 é a forma mais biologicamente ativa de cialotrina (PPDB, 2022). Permetrina (3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato, é uma substância usada para erradicar parasitas como piolhos, carrapatos e sarna de humanos e animais, além de ser utilizado no combate de baratas, cupins, carrapatos, mosquitos, pulgões, pulgas e formigas. Seu surgimento ocorreu por volta de 1973 e seu uso agrícola é feito com aplicação foliar em culturas de arroz, café, citros, couve-flor, feijão, fumo, milho, milho, repolho, soja, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2021; PPDB, 2022).

Tetrametrina (1,3-dioxo-4,5,6,7-tetra-hidroisoindol-2-il) metil 2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropano-1-carboxilato, foi identificada em 1964, é um inseticida multiuso frequentemente usado para controlar insetos residenciais e que apresentam riscos à saúde pública (PPDB, 2022). Os piretroides sintéticos são praguicidas bastante utilizados, devido a diversas vantagens, como baixa toxicidade em mamíferos, baixo persistência no ambiente, são eficazes no combate de um amplo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para desempenharem sua ação (SANTOS *et al.*, 2007).

2.2.1 Ação inseticida dos piretroides

Os piretroides são classificados em duas categorias, tipo I (possui o grupo alfa-ciano em sua molécula) e o tipo II (que não possui o grupo alfa-ciano). Os piretroides do tipo I, possuem uma estrutura básica de ciclopropano carboxílico éster. Nesta categoria são incluídos os compostos: aletrina, bifentrina, permetrina, fenotrina, resetrina, teflutrina e tetrametrina. Os do tipo II: incluem ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, flumetrina, fluvalinato e tralometetrina (GAJENDIRAN e ABRAHAM, 2018).

Essa diferença implica nos sintomas e sinais que serão desencadeados no sistema nervoso do organismo (ação neurotóxica) com a sua aplicação (PARANÁ, 2018). O sistema nervoso é uma região estratégica para atuação tóxica de vários praguicidas, pois tem como papel a condução de informações ao corpo do organismo através de impulsos

elétricos. No caso de compostos piretroides, a sua ação ocorre por meio da modulação dos canais de sódio das células nervosas.

O sistema nervoso é formado por células especializadas, os neurônios (células nervosas), os quais possuem uma parte chamada de corpo celular, que possui terminações nervosas ramificadas, os dendritos, onde é recebido o estímulo nervoso, e uma região alongada chamada axônio, que possui ramificações terminais por onde acontece a transmissão dos estímulos (impulsos) nervosos (SANT'ANNA, 2009).

Quando as moléculas de piretroides entram em contato com o sistema nervoso central do organismo, podem atuar especificamente nos canais de sódio que estão ao longo do axônio do neurônio, retardando ou impedindo o fechamento normal desses canais, após a transmissão do impulso nervoso (PARANÁ, 2018). Com isso há um aumento excessivo do fluxo de sódio para dentro da célula nervosa, o que mantém despolarizadas as suas membranas causando descargas contínuas e repetidas, resultando em um efeito de choque, seguido de perda da capacidade locomotora, causando paralisia e morte do organismo (SANTOS *et al.*, 2007; PARANÁ, 2018; SILVA *et al.*, 2019) (Figura 2).

Alguns piretroides também modificam a permeabilidade das membranas ao cloro, atuando sobre os receptores tipo A do ácido gama amino butírico (GABA). Em doses altas, os piretroides do tipo II ligam-se aos receptores do GABA bloqueando os canais de cloro e a sua ativação (MONTANHA e PIMPÃO, 2012; PARANÁ, 2018). O GABA é um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e a ausência de inibição sináptica leva a uma hiperexcitabilidade do sistema nervoso central (MONTANHA e PIMPÃO, 2012).

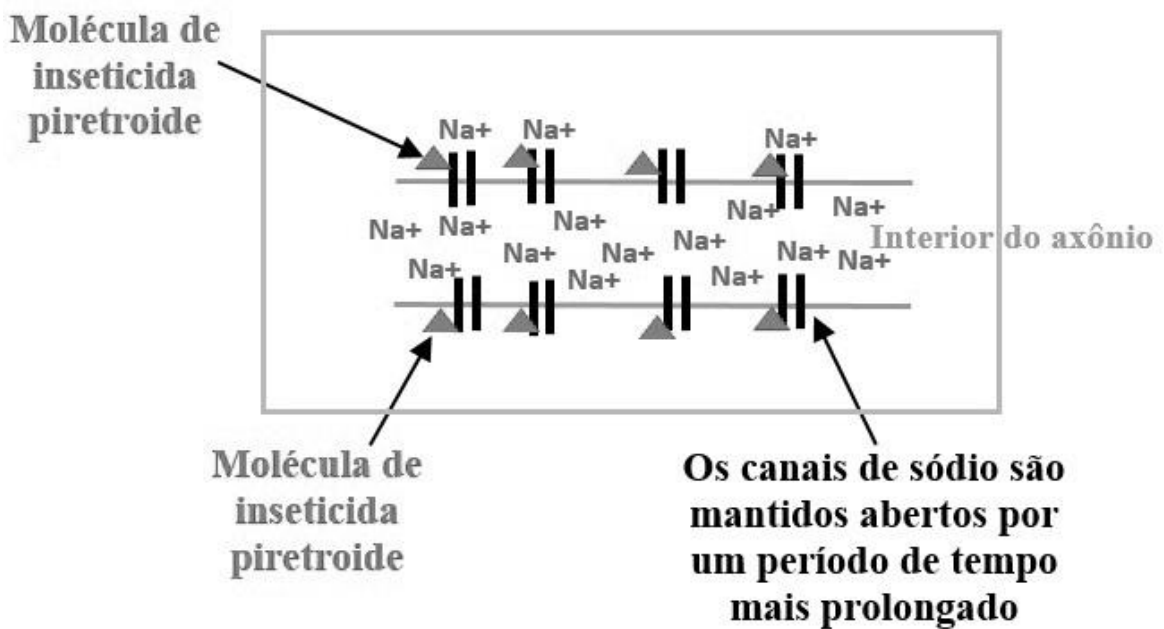
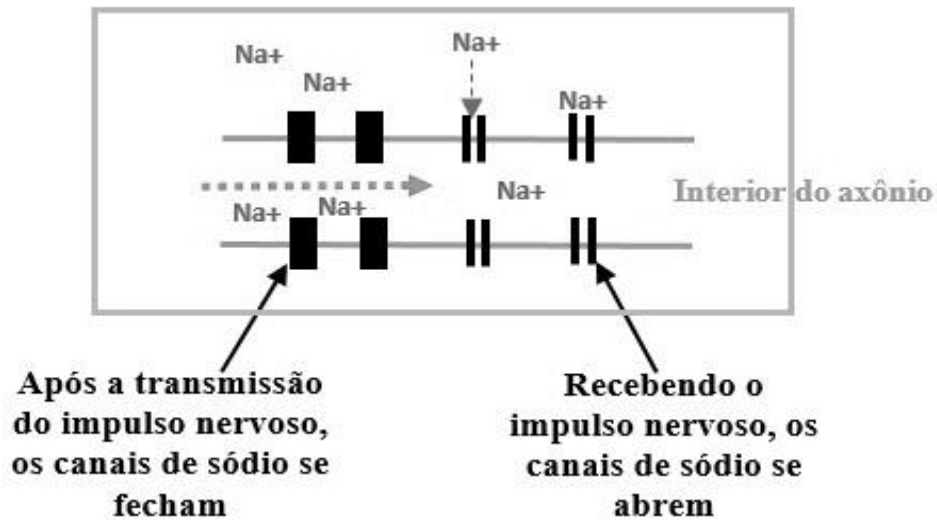
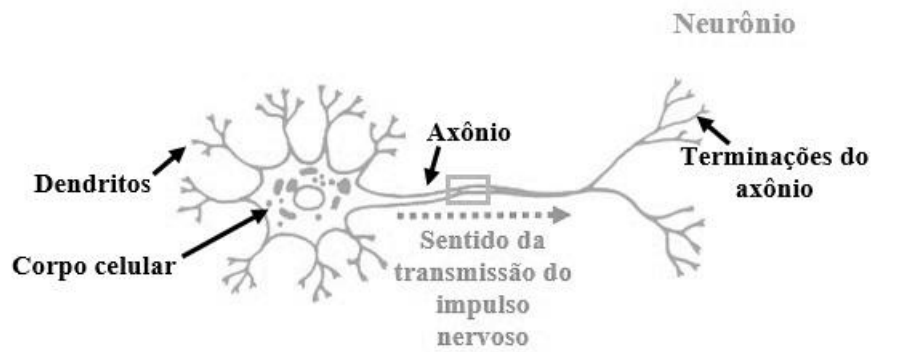


Figura 2 - Representação da ação do inseticida piretroide no sistema nervoso do organismo alvo.

Fonte: O autor.

2.2.2 Efeitos tóxicos dos piretroides nos organismos

Os pesticidas piretroides são utilizados no combate de uma variedade de insetos como os pertencentes à ordem Coleoptera (besouro e joaninha), Hemiptera (percevejos, cigarras e pulgões), Diptera (moscas, mosquitos, varejeiras, pernilongos, borrachudos e mutucas), Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas), Lepidoptera (borboletas e mariposas) Orthoptera (grilos e gafanhotos) entre outros artrópodes (GAJENDIRAN e ABRAHAM, 2018).

A atividade residual e alta toxicidade desses compostos piretroides não é seletiva para insetos, podendo agir também sobre organismos não-alvo (PALMQUIST *et al.*, 2012). Estudos em ratos, demonstraram que piretroides do tipo I podem causar agressividade, tremores, espasmos convulsivos, falta de coordenação e prostração. Esse conjunto é chamado de "Síndrome T", se referindo a prevalência dos espasmos convulsivos e tremores. Os do tipo II, geram efeitos de salivação excessiva, movimentos involuntários dos membros, convulsões e sensibilidade aumentada aos estímulos externos. Esse conjunto é chamado de "Síndrome CS" se referindo a coreoatetose e a salivação (BRADBERRY *et al.*, 2005; CHRUSTEK *et al.*, 2018)

Porém, estes pesticidas são mais tóxicos em insetos do que em mamíferos e isso se deve a alguns fatores como o aumento da sensibilidade aos canais de sódio, menor temperatura corporal e a menor dimensão corpórea (BRADBERRY *et al.*, 2005).

Além de que, uma vez absorvidos, a transformação metabólica em mamíferos, ocorre rapidamente por meio das enzimas esterases hepáticas e oxidases microsossomais através de mecanismos de conjugação e hidroxilação, gerando metabólitos inativos, que são excretados em grande parte na urina (JAVED *et al.*, 2015).

Estudos toxicológicos indicam que os piretroides estão entre os pesticidas mais tóxicos para animais aquáticos, como peixes e crustáceos (CUNHA, 2014; MEDINA, 2019; VIEIRA *et al.*, 2007) e para outros organismos benéficos, como abelhas que são agentes polinizadores (PALMQUIST *et al.*, 2012).

Hintzen *et al.* (2009) evidenciaram toxicidade dos sedimentos provenientes de leito de riachos de sete áreas nos Estados Unidos sobre o crustáceo de água doce *Hyalella azteca*. Em aproximadamente 50% de tais amostras de sedimento foram detectados diversos inseticidas piretroides (bifentrina, cialotrina, cipermetrina,

permetrina e resmetrina), onde o primeiro composto foi encontrado em maior frequência.

No solo, as aplicações de piretroides podem causar redução significativa nas populações de minhocas (REHMAN *et al.*, 2014). Em outro estudo, o piretroide lambda-cialotrina foi associado à toxicidade crônica nestes organismos (GARCIA *et al.*, 2011).

De acordo com Braga e Valle (2007) a temperatura interfere na atividade inseticida de alguns piretroides, como no caso dos compostos do tipo I, cuja essa capacidade se eleva à proporção que a temperatura diminui (coeficiente negativo de temperatura). Enquanto, os do tipo II, apresentam aumento da mortalidade com a elevação da temperatura (coeficiente de temperatura positivo).

2.2.3 Exposição humana a piretroides e a contaminação ambiental

Em geral, os piretroides são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e pelo trato respiratório através da inalação de pó ou spray, porém a absorção cutânea ocorre de uma forma menor (SODERLUND *et al.*, 2002). A exposição humana aos piretroides pode acontecer diretamente por meio da sua manipulação em atividades ocupacionais acidentalmente, e de forma indireta por meio da contaminação do meio ambiente, dos alimentos e da água (VILLALOBOS e FAZOLLI, 2017).

Os agentes sanitaristas são os trabalhadores mais expostos aos efeitos dos inseticidas nas campanhas para controle de vetores, desde o preparo da substância até a aplicação nas áreas internas ou externas dos domicílios. Fatores como falta de equipamentos de proteção individual ou desconhecimento da forma correta de manipulação de cada produto aumentam os riscos de intoxicação (LIMA *et al.*, 2009). Trabalhadores rurais e populações residentes próximos a áreas de uso intensivo de agrotóxicos, também estão expostos a riscos de intoxicação (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018).

Em estudo realizado por Caldeira *et al.* (2014), para verificar o conhecimento dos usuários sobre os inseticidas piretroides domésticos, foi apurado que 62% das pessoas utilizam esses produtos; 90% não tinha conhecimento que as substâncias inseticidas são da classe piretroide; reconheceram a ocorrência frequente de sintomas

como dores de cabeça, irritação na garganta, irritações na pele, embora não os associem como sendo em decorrência do uso desses produtos.

No ambiente, o escoamento pela superfície do solo pode facilitar o transporte de piretroides para águas superficiais, através do movimento de sedimentos, como foi encontrado um aumento na concentração dos pesticidas bifentrina e permetrina durante o fluxo, contribuindo para níveis mais elevados nos sedimentos a jusante da fonte (GAN *et al.*, 2005).

Em alimentos, como no caso de produtos de origem animal, a contaminação pode ocorrer quando é feita a aplicação direta do pesticida nos animais de produção, quando ocorre a adição de ingredientes vegetais já contaminados ou quando são aplicados inadequadamente para controle de pragas no ambiente industrial (MELLO e SILVEIRA, 2012). Foi verificado também a concentração de resíduos de deltametrina em grãos de trigo, sob condições de armazenamento, no farelo de trigo e em menor quantidade na farinha (TREVIZAN e BAPTISTA, 2000).

A exposição aos pesticidas e a contaminação de diversos compartimentos naturais representa um risco para a saúde humana e ambiental, o que demanda a necessidade de monitoramento dos resíduos desses compostos químicos.

2.3 Ferramentas Bioanalíticas para Monitoramento de Pesticidas

O monitoramento de contaminantes ambientais, exige ferramentas analíticas cada vez mais específicas, de simples manuseio, baixo custo, dentre outros requisitos. Muitos métodos bioanalíticos, baseados em respostas de enzimas, têm sido desenvolvidos para detecção de pesticidas no ambiente (ARRUDA, 2016; SILVA, 2011; TOSCANO *et al.*, 2000). Nesse sentido, tem se os métodos imunoquímicos, como o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou ensaio de imunoabsorção enzimática e o método usando biossensores (AHN *et al.*, 2010; NUNES, 2005).

O método ELISA se baseia na resposta imune, a partir da interação antígeno anticorpo (ZHAO *et al.*, 2019). Alguns estudos utilizando esse método detectaram diversos contaminantes: compostos organofosforados em amostras de leite (IVANOV e GODJEVARGOVA, 2019); carbaril em amostras de água superficial (TOSCANO *et al.*, 2000) e resíduos dos pesticidas acetamiprida, azoxistrobina, clorotalonil, fenitrotion e imidacloprida em vegetais e frutas (YAMASAKI *et al.*, 2015).

Apesar de representar uma forma barata e sofisticada para análise de amostras ambientais e de alimentos, o fator limitante desta técnica imunológica, é o aparecimento de reações cruzadas, nas quais os compostos com estruturas semelhantes podem reagir com um mesmo anticorpo, não sendo assim possível determinar com precisão o agrotóxico presente (STOPPELLI e MAGALHÃES, 2005).

Já os biossensores, fazem o reconhecimento quanto à presença de substâncias específicas, baseados em um reconhecimento, também específico, por meio de uma molécula biológica. E nesse aspecto, diversos trabalhos empregando biossensores já foram desenvolvidos: investigação de carbamatos (carbaril e carbofuran) em água de abastecimento utilizando enzimas colinesterases (MARQUES *et al.*, 2006); detecção de fungicidas ditiocarbamatos utilizando a enzima aldeído desidrogenase (LIMA *et al.*, 2007); detecção de paration metílico utilizando biossensores amperométricos à base de acetilcolinesterase contendo macroalga de ambiente estuarino (MENDONÇA *et al.*, 2012) construção de um biossensor baseado em pasta de carbono inserido em minicavidade (SANTOS *et al.*, 2014).

Algumas características analíticas, tais como especificidade, sensibilidade, simplicidade e rapidez nas análises, tornam os métodos com biossensores bastante interessantes para trabalhos de monitoramento. Tais dispositivos, tornaram-se, ainda, uma opção altamente promissora, devido ao seu baixo custo de construção, operação e manutenção (BARROCAS *et al.*, 2008).

O biossensor é um dispositivo analítico que consiste em uma biomolécula, um transdutor e um sistema de saída, conforme mostrado na Figura 3 (ASAL *et al.*, 2018). Pode ser definido também, como um sensor modificado com material biológico incorporado a superfície de um transdutor (NOGUEIRA *et al.*, 2014). As biomoléculas podem ser enzimas, anticorpos, DNA, organelas, células etc. Conforme o tipo de material biológico empregado para fazer o biorechecimento do analito investigado em uma amostra, pode ser denominado de biossensor enzimático, imunossensor e biossensor baseado em DNA (ASAL *et al.*, 2018).



Figura 3 - Representação esquemática dos componentes de um biossensor.

Fonte: O autor.

O transdutor é o componente que capta as reações geradas pela interação entre o material biológico e o analito de interesse, e as converte em um sinal analítico mensurável (como corrente, potencial, mudança de temperatura ou absorção de luz através de meios eletroquímicos, térmicos ou ópticos) de acordo com o tipo de transdutor empregado: eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico) piezoelétrico, óptico e calorimétrico, conforme representado na Figura 4 (VERMA e BHARDWAJ, 2015).

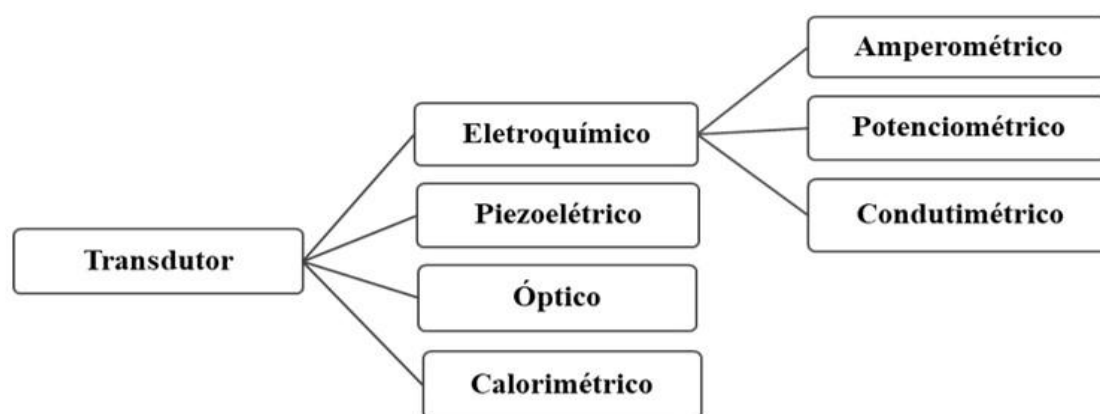


Figura 4 - Tipos de transdutores empregados em biossensores.
Fonte: O autor.

Sobre o material biológico, as enzimas são muito eficientes para a elaboração de biossensores eletroquímicos para detecção de pesticidas, devido possuírem característica de alta especificidade química e propriedade biocatalítica, com isso reagem seletivamente com esse analito-alvo (pesticida) e geram um sinal proporcional à sua concentração (OLIVEIRA *et al.*, 2013a; VERMA e BHARDWAJ, 2015). Esta reação ocorre devido a habilidade do pesticida em inibir a atividade da enzima utilizada no biossensor. Marques e Yamanaka (2008) esclarecem que o termo inibição enzimática se refere a capacidade que uma substância tem de interferir especificamente, em uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo esse processo, ou na especificidade biológica da reação.

Dentre os biossensores enzimáticos eletroquímicos mais difundidos, estão os que são baseados na inibição das enzimas acetilcolinesterase - AChE, por meio principalmente da ação dos pesticidas organofosforados e carbamatos (ASAL *et al.*, 2018; GONG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; PEDROSA *et al.*, 2008). A literatura científica apresenta o registro dessa técnica a partir de 1962, quando os pesquisadores

buscavam procedimentos para determinar resíduos de inseticidas organofosforados anticolinesterásicos, em amostras de água e alimentos (GUILBAULT *et al.*, 1962).

Seguem exemplos de alguns estudos com enzimas usadas em biossensores para detecção de pesticidas: tirosinase para compostos fenólicos (GUTÉS *et al.*, 2005), aldeído desidrogenase para os ditiocarbamatos maneb e zineb (LIMA *et al.*, 2007), lacase para o carbamato metomil (ZAPP *et al.*, 2011), enzimas do citocromo P450 para organoclorados aldrin e heptacloro (WU, 2011), hidrolase de organofosfato para organofosforados (LEE *et al.*, 2010), butirilcolinesterase, fosfatase alcalina e tirosinase, respectivamente, para determinação de paraoxon, ácido 2,4-diclorofenoxiacético e atrazina (ARDUINI *et al.*, 2019).

Além dessas enzimas, tem-se a glutatona S-transferase, muito importante, devido à sua ação detoxificante para o organismo (CHIKEZIE, 2015; HUBER *et al.*, 2008), e que pode ser empregada no bioreconhecimento de agentes tóxicos que tenham a capacidade de inibi-la, princípio comumente adotado no desenvolvimento de biossensores enzimáticos.

2.4 Glutaciona S- Transferase e a Aplicação em Biossensores

Glutaciona S- transferase – GST (EC 2.5.1.18) é um termo genérico que descreve uma classe de enzimas envolvidas na desintoxicação de compostos endógenos e compostos químicos estranhos (CHIKEZIE, 2015). Dentre as suas diversas funções, participa no processo de desintoxicação celular e na correção dos efeitos prejudiciais de contaminantes como drogas, herbicidas, pesticidas, compostos químicos carcinogênicos e outros poluentes ambientais (HAYES e PULFORD, 1995).

Na desintoxicação enzimática ocorre a biotransformação dos xenobióticos deletérios ao organismo, em uma substância que apresenta maior solubilidade em água, além de uma menor toxicidade. Estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então são excretados (HUBER *et al.*, 2008).

A enzima glutaciona S-transferase constitui uma superfamília de isoenzimas multifuncionais, que com base na similaridade da sequência de aminoácidos e nas especificidades do substrato, são subdivididas em pelo menos dez subfamílias: alfa, delta, epsilon, kappa, mu, pi, sigma, teta, zeta e ômega (KIM *et al.*, 2017).

Essas isoenzimas são encontradas em diversos organismos, tais como: microorganismos, insetos, plantas, peixes, pássaros e mamíferos, como pode-se observar na Tabela 2 (DZOYEM *et al.*, 2014). Estão localizadas no citosol e membranas celulares, se apresentam como homodímeros (as duas subunidades são idênticas) ou heterodímeros (as subunidades são diferentes), com dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, uma específica para a glutathione reduzido-GSH, e outro sítio de ligação com menor especificidade para eletrófilos diversos (HUBER *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Classes da enzima glutathione S-transferase

Classe de isoenzimas GST	Organismos onde estão presentes
Kappa	Humanos
Alfa, Mu, Pi e Teta	Mamíferos
Fi	Plantas
Sigma	Cefalópodes e artrópodes
Delta	Específica de insetos

Fonte: (BOARD *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2008; PEMBLE *et al.*, 1996; WIDERSTEN e MANNERVIK, 1995).

Cada isoenzima de GST pode ser analisada com um tipo de substrato específico, todavia, normalmente utilizado é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno – CDNB, que foi descrito como um substrato que pode ser empregado com todas as isoenzimas de GST (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2015; MATERON *et al.*, 2014; ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

A GST catalisa a conjugação da glutathione reduzida – GSH com compostos que contêm um centro eletrofílico, através da formação de uma ligação tioéter entre o átomo de enxofre da GSH e o substrato (DZOYEM *et al.*, 2014). O substrato normalmente usado é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, que se associa com GSH liberando em solução íons H^+ e Cl^- , que podem ser monitorados indiretamente, como mostra a Figura 5 (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Na presença do pesticida, a enzima terá sua ação catalítica afetada, o que desencadeará uma reação gerando sinal bioquímico (BORAH *et al.*, 2017).

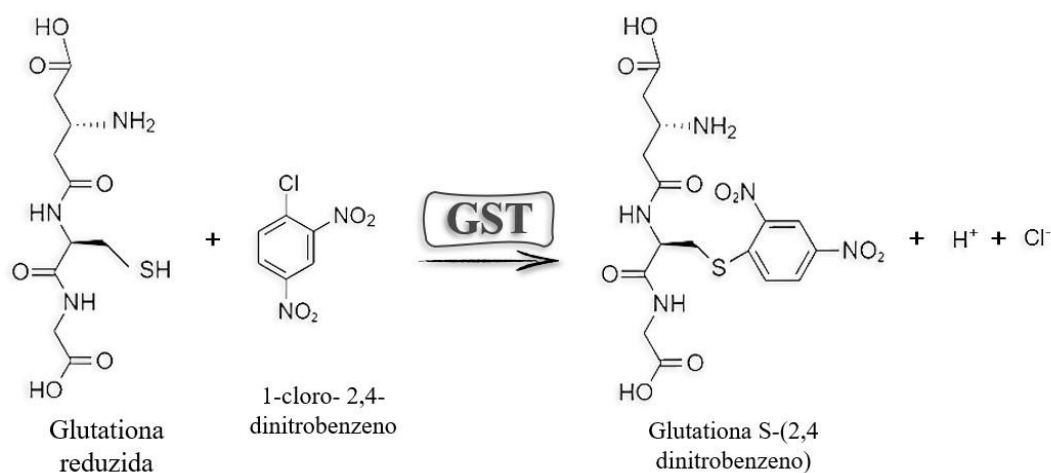


Figura 5 - Reação da glutatona reduzida - GSH e o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - CDNB, catalisada por glutatona S-transferase – GST.

Fonte: O autor.

Alguns pesticidas foram detectados eletroquimicamente por meio de biossensores com base na inibição da glutatona S-transferase, tais como: captan (pesticida de uso geral que pertence à classe dos fungicidas ftalimida) em amostras de água (SINGH *et al.*, 2009); molinato (herbicida ditiocarbamato) em água utilizada na irrigação de arroz (OLIVEIRA *et al.*, 2013b); temefós e dimetoato (organofosforados) e fenobucarb (carbamato) (BORAH *et al.*, 2017); carbendazim (fungicida) e clorpirifós (organofosforado) (BORAH *et al.*, 2018).

Assim, observa-se a relevância de mais investigação sobre esta técnica baseada na inibição da glutatona S-transferase, frente a outras classes de pesticidas, a exemplo dos piretroides sintéticos, que abrangem uma variedade de produtos químicos disponíveis no mercado e que são comumente utilizados.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

A utilização de pesticidas tem sido apontada como uns dos principais problemas para a saúde humana e ambiental, devido à comprovação da presença de resíduos tóxicos em alimentos e no ambiente (MOTA, 2009).

As águas superficiais podem ser contaminadas pela lavagem do solo, devido a ação de enxurradas e pela ação do vento que dispersa o pesticida, ao passo que os lençóis freáticos podem ser contaminados com a infiltração desses compostos (SANCHES *et al.*, 2003).

Apesar de seu curto poder residual, de serem biodegradáveis, e não cumulativos, não são livres de toxicidade para alguns animais aquáticos, além de causarem hipersensibilização e irritação das mucosas de aves e mamíferos (BRAGA e VALLE, 2007). Podem atuar também, sobre o funcionamento do sistema nervoso central de algumas espécies de vertebrados como peixes, anfíbios, mamíferos e pássaros (ÇALISKAN *et al.*, 2003).

Sobre a saúde humana, os efeitos podem ser agudos, os quais decorrem da exposição à concentração de um ou mais agentes tóxicos, capazes de causar dano efetivo aparente em um período de 24 horas. Os efeitos crônicos, derivam de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (NASCIMENTO e MELNYK, 2016).

Para Arias *et al.* (2007) quanto maior a concentração de pesticidas e mais longo o tempo de exposição, mais elevadas são as chances dos impactos negativos atingirem níveis superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistema.

Diante disso, diversos estudos indicam que, a determinação de resíduos de piretroides tem sido exigida por consumidores, produtores e autoridades de vigilância sanitária e ambiental (SANTOS *et al.*, 2007).

Esta demanda, deve ser tratada com prioridade nas cidades brasileiras, sobretudo no Estado do Maranhão. De acordo com o Relatório de Vigilância em Saúde Ambiental de 2014, o Estado maranhense é o segundo maior consumidor de agrotóxicos da região Nordeste e o nono no ranking nacional. Ainda segundo esse relatório entre os anos de 2011 e 2012, a taxa de consumo quase triplicou, passando de 7,24 kg/ha para 20,71 kg/ha.

Em estudo realizado por Santos *et al.* (2012), os piretroides foram verificados como um dos principais grupos químicos de agrotóxicos utilizados por agricultores da zona rural da Ilha de São Luís (MA), sendo aplicados sobretudo no combate de insetos e ácaros.

Assim, observa-se a necessidade de estudo para avaliação da presença de contaminantes piretroides em diferentes matrizes ambientais (como solo, água) e de alimentos (frutas e legumes), tendo em vista o seu uso crescente e as consequências dos impactos sobre o meio ambiente e a saúde pública. A presença desses compostos químicos pode ser avaliada por meio instrumentos analíticos como os biossensores ou sensores biológicos.

Os biossensores consistem em uma importante tecnologia para o diagnóstico de compostos químicos utilizada em diversas áreas de estudo. Os biossensores enzimáticos amperométricos, são assim denominados quando utilizam a atividade de uma enzima, como por exemplo a glutatona S-transferase, como um sinal elétrico a ser monitorado. O monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima provocado pela presença do contaminante em estudo, na qual a atividade é medida antes e após a inibição (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

A glutatona S-transferase (GST) é uma importante enzima que atua no metabolismo antioxidante e está entre os principais marcadores bioquímicos utilizados para avaliar a exposição e os efeitos provocados por contaminantes ambientais (CARVALHO NETA e ABREU-SILVA, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2016). Dessa forma, tendo em vista não só a necessidade de maximizar o conhecimento sobre biossensores eletroquímicos para a determinação de pesticidas, como também desenvolver um método que resultasse em uma maior rapidez e menor custo analítico, com confiabilidade e sensibilidade, o presente trabalho objetivou desenvolver um biossensor amperométrico baseado na enzima GST para o monitoramento de inseticidas piretroides.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Desenvolver um biossensor amperométrico para detecção de inseticidas piretroides, baseado na inibição da enzima glutathione S-transferase.

4.2 Específicos

- Avaliar por meio *in silico* o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas piretroides;
- Aplicar método *in silico* de docagem molecular de ligantes piretroides com a enzima glutathione S-transferase;
- Avaliar, espectrofotometricamente, a atividade da enzima glutathione S-transferase comercial na ausência e em presença de inseticidas piretroides;
- Preparar biossensores serigrafados a base da enzima GST;
- Determinar as melhores condições operacionais dos biossensores amperométricos para detecção de inseticidas piretroides;
- Avaliar eletroquimicamente a ação inibitória de inseticidas piretroides sobre a GST;
- Caracterizar a eficiência analítica do biossensor desenvolvido por meio de figuras de mérito;
- Aplicar o biossensor em amostras naturais de água, provenientes do Rio Bacanga.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Reagentes e Soluções

Foram adquiridos da Sigma-Aldrich os seguintes produtos: a enzima glutationa S-transferase (GST) de fígado equíno; substratos 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutationa reduzida (GSH); reagentes fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), acetonitrila (CH_3CN) e grafite ultrapuro. Os produtos glutaraldeído e hidroxietilcelulose - HEC foram adquiridos da Fluka e soroalbumina bovina da Biochemical BDH Lim. Os padrões analíticos dos inseticidas foram adquiridos da Fluka (tetrametrina em pó, as soluções de permetrina e cipermetrina) e da Accu Standard (fenpropratrina, deltametrina, aletrina, bifentrina, esfevalerato e lambda-cialotrina em pó).

No preparo das soluções foi utilizada água deionizada. As soluções comerciais padrões de cipermetrina e permetrina estavam diluídas em acetonitrila. Os padrões sólidos foram pesados em balança analítica de precisão e dissolvidos em acetonitrila. As soluções de trabalho, foram preparadas em tampão, a partir da diluição da solução-estoque.

A solução estoque de GST foi preparada solubilizando-se em 1 mL de tampão fosfato (pH 6,5), 10 mg dessa enzima em pó contida no frasco, sendo 25 unidades de enzima por miligrama, conforme as instruções do fabricante. Esta solução de GST foi fracionada em 10 microtubos estéreis, contendo cada um 100 μL , e foi armazenada a -4 graus.

Para o preparo da solução tampão (pH 6,5) foram utilizados: fosfato de potássio monobásico e ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA. A dissolução de GSH foi realizada com tampão fosfato, a dissolução do CDNB, com etanol absoluto (70% do volume) e água deionizada, ambas soluções de trabalho foram preparadas diariamente a cada ensaio experimental.

5.2 Equipamentos e Acessórios

Para determinação da atividade enzimática foi utilizado espectrofotômetro UV/Vis (Thermoscientific, Orion AquaMate 8000) (Figura A1 do Apêndice A)

empregando-se cubeta de quartzo com volume de 1 mL, 1 cm de caminho óptico e micropipetas de volume variável Eppendorf Research® com ponteiras descartáveis.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato (Micro-AUTOLAB Tipo III, Methrom) (Figura B1 do Apêndice B) utilizando sensores serigrafados, e célula de vidro de 5 mL, contendo o eletrólito de suporte (Figura B2 do Apêndice B).

Foram utilizados também balança de precisão e agitador vortex.

5.3 Estudo *In Silico* do Potencial de Contaminação Aquática por Pesticidas Piretroides

Essa etapa foi baseada na aplicação de duas metodologias: a aplicação dos critérios do método de GOSS (1992) para avaliação do risco de contaminação de águas superficiais e os critérios do índice de GUS - *Groundwater Ubiquity Score* (GUSTAFSON, 1989), para o risco de contaminação de águas subterrâneas.

No método de GOSS, são propostos critérios físico-químicos para cada contaminante, cujos valores são apresentados em intervalos matemáticos, o que resulta na classificação dos ingredientes ativos dos pesticidas conforme o potencial de contaminação associado ao sedimento ou dissolvido em água (Tabela 3).

Tabela 3 - Potencial de transporte dos inseticidas piretroides de acordo com o Método de Goss

Potencial	Transporte associado ao sedimento		
	DT ₅₀ solo	K _{oc} (mL.g ⁻¹)	S (mg.L ⁻¹)
Alto	≥ 40	≥ 1000	-
	≥ 40	≥ 500	≤ 0,5
Baixo	< 1	-	-
	≤ 2	≤ 500	-
	≤ 4	≤ 900	≥ 0,5
	≤ 40	≤ 500	≥ 0,5
	≤ 40	≤ 900	≥ 2

Potencial	Transporte dissolvido em água		
	DT ₅₀ solo	K _{oc} (mL.g ⁻¹)	S (mg.L ⁻¹)
Alto	> 35	< 100000	≥ 1
	< 35	≤ 700	≥ 10 e ≤ 100
Baixo	-	≥ 100000	-
	≤ 1	≥ 1000	-
	< 35	-	< 0,5

DT₅₀ = tempo de meia vida do pesticida; K_{oc} = constante de adsorção à matéria orgânica; S= solubilidade em água. Fonte: O autor (adaptado de GOSS, 1992)

No índice de GUS, utiliza-se, para o cálculo, os valores correspondentes as propriedades físico-químicas empregadas (meia-vida (DT₅₀) e o coeficiente de adsorção ao solo (K_{oc})), de acordo com a Equação 1. Este índice estabelece três faixas de classificação à tendência de lixiviação do pesticida: GUS < 1,8 = não sofre lixiviação; 1,8 < GUS < 2,8= faixa de transição; GUS > 2,8= provável lixiviação.

$$GUS = \log(DT_{50\text{ soil}}) \cdot (4 - \log K_{oc}) \quad 1$$

As informações sobre as propriedades físico-químicas dos compostos analisados foram adquiridas a partir de levantamento feito em artigos científicos relacionados e em banco de dados de acesso livre: *Pesticide Properties Data (PPDB)* e *Pubchem* (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

5.4 Estudo *In Silico* por Docagem Molecular

A docagem molecular (do inglês, *molecular docking*) é uma ferramenta computacional para estudar as interações proteína-ligante e para prever a estrutura do complexo formado entre as moléculas. Nesta técnica *in silico*, ou seja, onde a experimentação é feita através de simulação computacional (Figura 6), a molécula ligante é encaixada no local de ligação de seu alvo macromolecular (receptor) e poderá ser estimada a sua afinidade de ligação (SELVAM *et al.*, 2017)

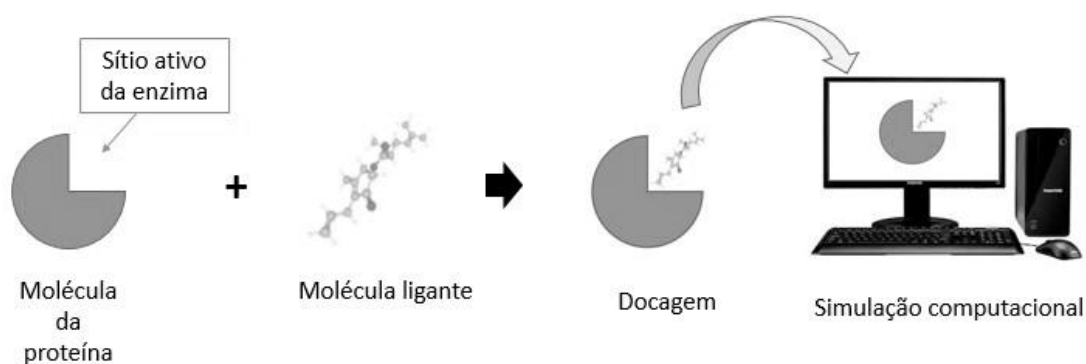


Figura 6 - Representação do processo de docagem molecular.

Fonte: O autor.

5.4.1 Obtenção da proteína de referência

Inicialmente foi realizada uma busca pela estrutura molecular da enzima glutationa S-transferase no repositório mundial de informações sobre estruturas 3D de grandes moléculas biológicas, *Protein Data Bank-PDB* (Banco de Dados de Proteínas) acessando o site <http://www.rcsb.org>, cujas informações são de domínio público. Neste banco de dados, foi escolhido o modelo estrutural cristalizado da enzima GST a ser utilizado nas docagens, empregando-se os seguintes critérios de refinamento: o organismo de origem da enzima; a resolução do modelo estrutural cristalográfico - onde valores menores, abaixo de 3,2 Å (ângström) indicam resoluções mais altas, o suficiente para determinar as posições atômicas (SOUZA, 2015; WIGGERS, 2011) e quais os ligantes presentes.

A estrutura cristalográfica da glutationa S-transferase selecionada, está complexada com um ligante em seu sítio ativo, o glutationil-S-dinitrobenzeno, que é

formado pela reação entre a glutathiona reduzida e 1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno (PATSKOVSKY *et al.*, 2006).

Após essa definição, foram baixados os arquivos da sequência de aminoácidos da GST no formato FASTA, em forma de texto (Figura 7) e o arquivo da estrutura no formato PDB (Figura 8), para serem utilizados nos programas computacionais escolhidos.

```
>pdb|1XWK|A Chain A, Glutathione S-transferase Mu 1  
MPMILGYWDIRGLAHAIIRLLLEYTDSSYEKKYTMGDAPDYDRSQWLNEKFKLGLDFPNLPYLIDGAHKI  
TQSNAILCYIARKHNLCGETEEEEKIRVDILENQTMDNMQGLMICYNPEFEKLLPKYLEELPEKLLKLYSE  
FLGKRPFWFAGNKITFVDFLVYDVLDDLHRIFEPKCLDAFPNLKDFISRFEGLEKISAYMKSSRFLPRPVFS  
KMAVWGNK
```

Figura 7 - Sequência proteica da cadeia A da GST.

Fonte: *Protein Data Bank-PDB*.

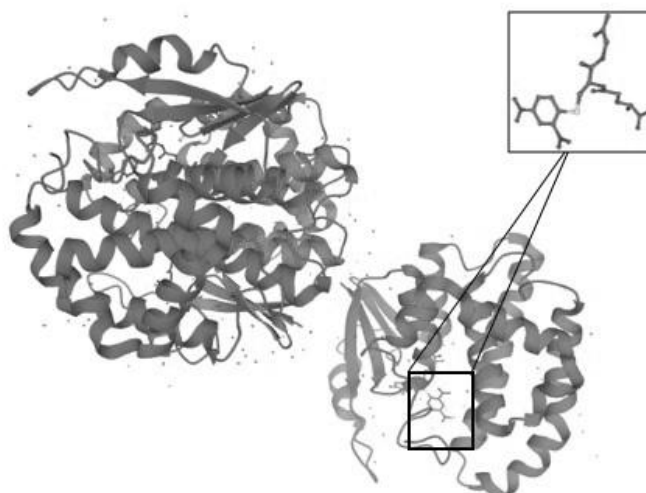


Figura 8 - Estrutura co-cristalizada da GST complexada com o ligante natural (em destaque no recorte).

Fonte: *Protein Data Bank-PDB*.

5.4.2 Obtenção das estruturas dos ligantes inibidores

Os códigos de identificação-CID dos inseticidas piretroides, listados a seguir: aletrina (CID 11442), bifentrina (CID 5281872), cipermetrina (CID 2912), deltametrina (CID 40585), esfenvalerato (CID 10342051), fenpropatrina (CID 47326), lambda-cialotrina (CID 6440557), permetrina (CID 40326) e tetrametrina (CID 83975), e suas respectivas estruturas 3D demonstradas na Figura C1 do Apêndice C, foram obtidas através do banco de dados de moléculas *Pubchem*.

5.4.3 Docagem molecular

Foram utilizados os programas PyMol Molecular Graphics System v.1.3 (Schrodinger, LLC) como visualizador de moléculas e o Molegro Virtual Docker- MVD 6.0 (BITENCOURT-FERREIRA e AZEVEDO-JUNIOR, 2019) para simulações do protocolo de docagem molecular e para calcular as energias de interação entre as estruturas dos ligantes piretroides e o sítio da proteína alvo.

Na preparação da estrutura da GST, todos os átomos de hidrogênio polares foram adicionados, todas as moléculas de água foram removidas, assim como a escolha de uma das cadeias para o processo de docagem, e a retirada das cadeias repetidas.

A cadeia A dessa estrutura foi selecionada para o protocolo de docking molecular, o qual foi realizado dentro de uma esfera de docking virtual com raio igual a 12 Å, cujas coordenadas do centro da esfera de encaixe foram detectadas automaticamente: X: 37.80; Y: -6.09; Z: 19.64 Å.

A função de pontuação e o algoritmo de busca do programa MVD utilizados foram respectivamente, Moldock Score Grid e o otimizador MolDock. Todos os outros parâmetros foram mantidos em suas configurações padrão. A melhor posição (pose) de encaixe dos ligantes obtida computacionalmente e com menor energia de ligação foi selecionada. A precisão do protocolo de docagem utilizado com os nove ligantes piretroides, foi previamente validada, por meio de re-docking.

5.4.4 Re-docking

Este procedimento consistiu na reprodução do acoplamento do ligante natural (glutathionil-S-dinitrobenzeno co-cristalizado), no mesmo local do sítio ativo da GST.

O *re-docking* é a simulação de *docking* molecular onde é utilizada uma estrutura cristalográfica de um complexo enzima - inibidor, e verifica-se se o protocolo usado no programa de *docking* molecular é capaz de reproduzir a mesma posição cristalográfica (AZEVEDO-JUNIOR, 2015). A avaliação desse protocolo, se dá por meio do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD – root mean square deviation), onde é considerado adequado resultado com valores de RMSD menores que 2,0 Å (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

5.5 Determinação Espectrofotométrica da Atividade Enzimática

5.5.1 Ensaio enzimático da GST na ausência de inibidores piretroides

Para encontrar as melhores condições dos parâmetros a serem empregados nos ensaios de cinética enzimática, foi realizado um planejamento fatorial por meio do programa Minitab Statistical® versão 13.0. Os fatores empregados correspondem aos reagentes, e os níveis à concentração mínima e máxima desses reagentes (Tabela 4), as quais foram escolhidas tendo como base a realização de testes preliminares *in vitro*. O planejamento foi constituído com três fatores e dois níveis (2^3), perfazendo oito ensaios, conforme demonstrado na Tabela 5, realizados em triplicata. Os resultados foram representados por meio de gráficos.

Tabela 4 - Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2^3 para determinação cinética da atividade da enzima GST

Fatores	Níveis	
	Mínimo	Máximo
Glutaciona reduzida - GSH	0,5 mmol.L ⁻¹	7,0 mmol.L ⁻¹
1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - CDNB	0,2 mmol.L ⁻¹	2,0 mmol.L ⁻¹
Glutaciona S- transferase – GST	0,0125 U.mL ⁻¹	0,25 U.mL ⁻¹

Fatores= reagentes; Níveis = concentração dos reagentes; Concentração: GSH, CDNB, GST; U = atividade específica.

Tabela 5 - Esquema experimental dos ensaios cinéticos conforme o planejamento fatorial

Experimento	GSH mmol.L ⁻¹	CDNB mmol.L ⁻¹	Carga Enzimática (GST) U.mL ⁻¹
1	0,5	0,2	0,25
2	7,0	2,0	0,25
3	7,0	0,2	0,25
4	7,0	2,0	0,0125
5	7,0	0,2	0,0125
6	0,5	2,0	0,0125
7	0,5	0,2	0,0125
8	0,5	2,0	0,25

GSH = glutaciona reduzida; CDNB = 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno; GST = glutaciona S- transferase; U = Atividade específica. N = 3.

Em seguida, após definir os parâmetros operacionais, a atividade da GST foi avaliada empregando-se o método já descrito na literatura (HABIG *et al.*, 1974) adicionando-se quantidades variadas dos reagentes GSH e CDNB, em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5, em presença ou ausência da enzima GST, perfazendo um volume total de 450 µL em cubeta de quartzo. A reação enzimática foi monitorada espectrofotometricamente, em um comprimento de onda de 340 nm, por um tempo de 3 minutos. Na reação, uma unidade de GST representa a quantidade de enzima necessária para conjugar 1 µmol de CDNB com GSH por minuto, formando o conjugado GS-DNB.

Em um ensaio enquanto a concentração de GSH permaneceu fixa, variou-se a concentração de CDNB (Tabela 6), no outro, fez-se o contrário, fixou-se a concentração de CDNB e variou-se a concentração de GSH (Tabela 7). Serviu como controle, o experimento realizado sem adição dos reagentes CDNB e GSH, conforme o ensaio.

Tabela 6 - Ensaio cinéticos catalisados pela enzima GST, em função da concentração do substrato CDNB

Pontos	Vol. PBS pH 6,5 (µL)	Vol. Sol. GSH (µL)	Conc. final GSH (mmol.L ⁻¹)	Vol. Sol. CDNB (µL)	Conc. final CDNB (mmol.L ⁻¹)	Vol. Sol. enzima GST (µL)
0	385	42	7	0	0	23
1	376	42	7	9	0,1	23
2	371	42	7	14	0,15	23
3	367	42	7	18	0,2	23
4	362	42	7	23	0,25	23
5	358	42	7	27	0,3	23
6	353	42	7	32	0,35	23
7	349	42	7	36	0,4	23
8	344	42	7	41	0,45	23
9	340	42	7	45	0,5	23

Concentrações iniciais: GSH = Glutathiona reduzida (concentração 75 mmol.L⁻¹); GST = Glutathiona S-transferase (0,1125 U.mL⁻¹); CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (concentração 5 mmol.L⁻¹). Atividade específica da enzima, após mistura = 0,0125 U.mL⁻¹. Tempo total de cada ensaio = 3min.

Tabela 7 - Ensaios cinéticos catalisados pela enzima GST, em função da concentração do substrato GSH

Pontos	Vol. PBS pH 6,5 (µL)	Vol. Sol. GSH (µL)	Conc. final GSH (mmol.L ⁻¹)	Vol. Sol. CDNB (µL)	Conc. final CDNB (mmol.L ⁻¹)	Vol. Sol. enzima GST (µL)
0	350	0	0	50	0,2	50
1	347	3	0,5	50	0,2	50
2	344	6	1	50	0,2	50
3	338	12	2	50	0,2	50
4	332	18	3	50	0,2	50
5	326	24	4	50	0,2	50
6	320	30	5	50	0,2	50
7	308	42	7	50	0,2	50
8	302	48	8	50	0,2	50
9	290	60	10	50	0,2	50

Concentrações iniciais: GSH = Glutaciona reduzida (concentração 75 mmol.L⁻¹); GST = Glutaciona S-transferase (0,1125 U.mL⁻¹); CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (concentração 1,8 mmol.L⁻¹). Atividade específica da enzima, após mistura = 0,0125 U.mL⁻¹. Tempo total de cada ensaio = 3min.

Através desses ensaios, os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculados a partir da equação de Lineweaver-Burk (Equação 2). Onde: V_o = velocidade inicial da reação; V_{max} = velocidade máxima de reação; $[S]$ = concentração do substrato; e K_M = constante de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right) \cdot \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \quad 2$$

5.5.2 Ensaios de inibição da enzima GST por inseticidas piretroides

Para a obtenção do percentual de inibição relativa - IR e da concentração que inibe 50 % da atividade da enzima - IC_{50} , utilizou-se tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5, concentração fixa dos substratos CDNB e GSH, carga enzimática fixa e concentrações crescentes (0,0625 a 5 mg.L⁻¹) de cada pesticida piretroide a partir de soluções de trabalho de 25 mg.L⁻¹. Na Tabela 8, consta como exemplo deste ensaio de inibição, o esquema experimental realizado com o pesticida cipermetrina. Para o cálculo de IC_{50} foi utilizada a equação da reta dos gráficos de inibição relativa. O percentual de IR foi

calculado, utilizando-se a Equação 3. Onde: IR = inibição relativa, dada em porcentagem; S_0 = valor de absorvância gerado pela reação enzima - substrato antes da inibição com o pesticida; S_1 = valor de absorvância gerado pela reação enzima - substrato após a inibição com o pesticida.

$$IR (\%) = \frac{(S_0 - S_1)}{S_0} \times 100 \quad 3$$

Nos ensaios para obtenção do tipo de inibição e das constantes de inibição- K_i foram empregadas concentrações fixas de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de cada pesticida em estudo, concentrações fixas de GSH, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 e concentrações crescentes de CDNB. Como exemplo, tem-se na Tabela 9 o esquema experimental deste ensaio de inibição com o inibidor cipermetrina. Os resultados foram representados conforme método Lineweaver-Burk (representação de duplo recíproco), plotando-se gráficos $1/V_0$ versus $1/[S]$.

Tabela 8 - Dados do ensaio para a inibição relativa da enzima GST na presença do pesticida cipermetrina

	Vol. PBS, pH 6,5 (μL)	Vol. sol. GSH (μL)	Vol. sol. enzima GST (μL)	Vol. sol. Ciper (μL)	Vol. sol. CDNB (μL)	Conc. final GSH (mmol.L ⁻¹)	Carga final GST (U)	Conc. final Ciper (mol.L ⁻¹)	Conc. final CDNB (mmol.L ⁻¹)	Tempo do ensaio (min)
0	355	42	50	0	0	7	0,0125	0	0	3
1	353,9	42	50	1,125	3	7	0,0125	$1,5 \times 10^{-7}$	0,2	3
2	352,8	42	50	2,25	3	7	0,0125	3×10^{-7}	0,2	3
3	350	42	50	5	3	7	0,0125	$6,01 \times 10^{-7}$	0,2	3
4	346	42	50	9	3	7	0,0125	$1,2 \times 10^{-6}$	0,2	3
5	337	42	50	18	3	7	0,0125	$2,4 \times 10^{-6}$	0,2	3
6	310	42	50	45	3	7	0,0125	$6,01 \times 10^{-6}$	0,2	3
7	265	42	50	90	3	7	0,0125	$1,2 \times 10^{-5}$	0,2	3

Concentrações iniciais: GSH = Glutaciona reduzida (concentração 75 mmol.L⁻¹); GST = Glutaciona S- transferase (0,1125 U.mL⁻¹); U = Atividade específica; Ciper = Cipermetrina (concentração $6,01 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ = 25 mg.L⁻¹); CDBN = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (concentração 30 mmol.L⁻¹).

Tabela 9 - Dados do ensaio com enzima GST na presença do pesticida cipermetrina para obtenção da constante de inibição-Ki

	Vol. PBS, pH 6,5 (µL)	Vol. Sol. GSH (µL)	Vol. Sol. Enzima GST (µL)	Vol. Sol. Ciper (µL)	Vol. Sol. CDNB (µL)	Conc. Final GSH (mmol.L ⁻¹)	Carga Final GST (U)	Conc. Final Ciper (mol.L ⁻¹)	Conc. Final CDNB (mmol.L ⁻¹)	Tempo do ensaio (min)
0	358	42	50	0	0	7	0,0125	0	0	3
1	300,5	42	50	45	12,5	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,05	3
2	288	42	50	45	25	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,1	3
3	275,5	42	50	45	37,5	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,15	3
4	263	42	50	45	50	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,2	3
5	213	42	50	45	100	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,4	3
6	163	42	50	45	150	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,6	3
7	113	42	50	45	200	7	0,0125	6,01x10 ⁻⁷	0,8	3

Concentrações iniciais: GSH = Glutathiona reduzida (concentração 75 mmol.L⁻¹); GST = Glutathiona S- Transferase (0,1125 U.mL⁻¹); U = Atividade específica
Ciper = Cipermetrina (concentração 6,01x10⁻⁶ mol.L⁻¹ = 2,5 mg.L⁻¹); CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (concentração 1,8 mmol.L⁻¹).

5.6 Elaboração de Biossensor à Base da Enzima GST para Detecção de Piretroides

A seguir são descritas as etapas para elaboração de biossensor para detecção de pesticidas piretroides utilizando a enzima glutatona S-transferase como elemento de bioreconhecimento.

5.6.1 Preparo do sensor serigrafado

O dispositivo, caracterizado aqui como sensor eletroquímico, consistiu de um sistema convencional formado por 3 eletrodos impressos em uma plataforma transparente de policloreto de vinila (PVC): o eletrodo de referência, formado por uma mistura (pasta) de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl); o eletrodo auxiliar, contendo somente pasta de grafite comercial, e o eletrodo de trabalho, constituído de um disco com 4 mm de diâmetro, formado por uma pasta de grafite comercial contendo o mediador eletroquímico (BECKER *et al.*, 2019; HAYAT e MARTY, 2014). E por último, possui uma camada isolante de tinta epóxi para a isolar os condutores elétricos da solução a ser investigada, na qual o sensor será imerso. As Figuras D1 e D2 do Apêndice D mostram a produção dos sensores, empregando-se a máquina de serigrafia semi-automática DEK 248. A Figura 9 representa o plano de deposição de camadas de um sensor serigrafado no processo de produção.

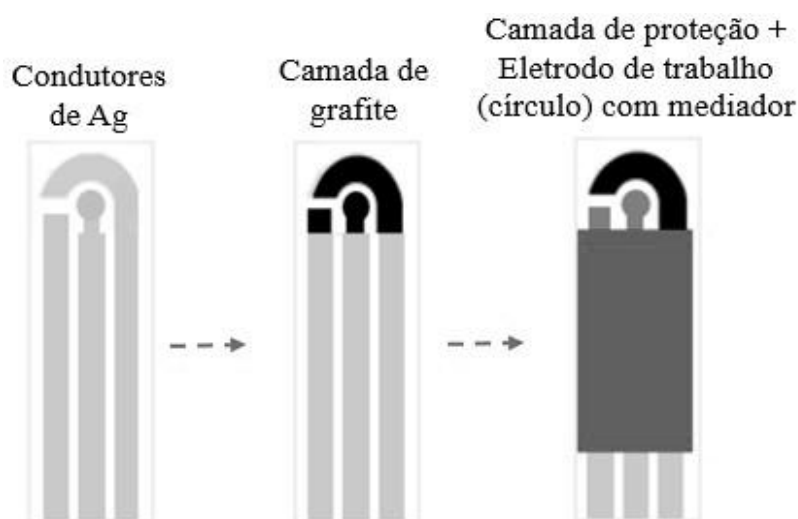


Figura 9 - Representação da deposição das camadas do sensor serigrafado com três eletrodos, por meio da máquina de serigrafia.

Fonte: O autor (Adaptado de BECKER *et al.*, 2019).

A Figura 10 mostra o esquema dos elementos que formam um sensor serigrafado utilizado no presente trabalho.

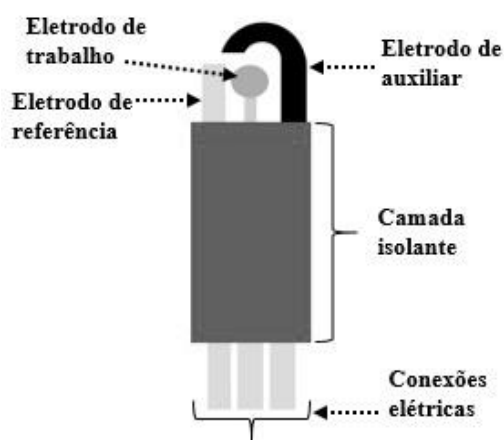


Figura 10 - Representação de um sensor serigrafado com três eletrodos.
Fonte: O autor (Adaptado de LIMA *et al.*, 2007)

Os mediadores eletroquímicos testados no presente estudo foram: ftalocianina de cobalto (CoPC) e azul de Meldola com sal de Reinecke (MBRS).

5.6.2 Preparo do biossensor: imobilização da enzima GST

Conforme Souto (2016), foi preparada em microtubo *ependorf*, uma pasta enzimática composta por 0,5 mg de grafite, 2,5 μL de hidroxietilcelulose a 3% (m/v), 0,5 μL da solução de soroalbumina bovina (BSA) a 3,2% (m/v), 12,5 μL da solução da enzima glutationa S-transferase contendo 0,95 mU preparada em tampão fosfato (pH 6,5) e 5 μL de glutaraldeído a 25% (m/v). Esta mistura enzimática foi homogeneizada em agitador vortex por 15 segundos.

Uma alíquota de 4 μL (contendo 0,18 mU de GST) dessa pasta enzimática foi depositada, de forma manual, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho dos sensores, com e sem mediadores eletroquímicos. Uma vez contendo a enzima como elemento de biorreconhecimento dos piretroides, os sensores passaram a se constituir, então, em biossensores. Em seguida, os biossensores foram levados à refrigeração a 4°C durante 24h, para fixação da enzima na superfície do eletrodo (MENDONÇA *et al.*, 2012).

5.6.3 Medidas eletroquímicas dos sensores e biossensores

O contato elétrico dos sensores e biossensores com o potenciostato foi feito através de um conector específico. As medidas eletroquímicas foram realizadas por meio de voltametria cíclica (VC) na faixa de potencial de - 0,8 V a 0,8 V e taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ e cronoamperometria em potencial de trabalho fixo de 200 mV s⁻¹, durante um tempo de análise de 30s e 60s, em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 e em substrato enzimático. Cada experimento eletroquímico foi realizado em um volume final de 5 mL de solução na célula de vidro, onde foram imersos individualmente cada dispositivo (Figura B2 do Apêndice B). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, após agitação magnética da solução, seguido de repouso, até a estabilidade do sinal.

5.6.4 Medidas eletroquímicas de inibição da glutatona S-transferase

Inicialmente, o biossensor foi mergulhado em uma solução tamponada (pH 6,5), por 10 minutos para entumescimento do composto enzimático imobilizado. Em seguida houve a adição dos substratos, sob agitação constante. A intensidade da corrente inicial gerada foi registrada após estabilização e, em seguida, o biossensor foi lavado com tampão fosfato (pH 6,5). Procedeu-se, então, com a incubação do biossensor em solução do pesticida, durante um período de 10 minutos (LIMA *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2006; SILVA, 2016). Foram utilizadas concentrações de 1 a 500 µg.L⁻¹ de cada pesticida. Após cada período de inibição, o biossensor e a célula de vidro foram lavados com solução tampão fosfato, e uma nova medida de corrente foi registrada, em meio com substrato. A percentagem de inibição foi calculada utilizando-se a equação 1, onde: IR = Inibição Relativa, dada em percentagem; I₀ = Intensidade de corrente antes da inibição da enzima; I₁ = Intensidade de corrente após a inibição da enzima.

$$IR (\%) = \frac{(I_0 - I_1)}{I_0} \times 100 \quad 4$$

5.6.5 Investigação da presença de pesticidas piretroides em águas do Rio Bacanga

Foram coletadas 12 amostras de água no Rio Bacanga, no dia 15 de janeiro de 2021, no horário de 9 a 10 horas da manhã. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, previamente lavados, e mantidos em refrigeração até o momento das análises. As coletas foram realizadas em região adjacente a barragem do Rio Bacanga, abrangendo áreas mais próximas ao centro do leito do rio e áreas próximas a uma das margens.

Os ensaios para verificar a ocorrência de inibição utilizando as amostras foram realizados em laboratório e consistiu na incubação do biossensor por 10 minutos na amostra de água coletada. Os valores de intensidade de corrente foram registrados, antes e após de cada período de incubação, conforme procedimento de análise e cálculo dos resultados descritos na seção 5.6.4.

5.6.6 Estudo da estabilidade dos biossensores

Para avaliar a estabilidade dos biossensores, em termos de reprodutibilidade e estabilidade, fez-se monitoramento através de medidas cronoamperométricas utilizando-se, respectivamente, 10 biossensores diferentes em iguais condições experimentais e o mesmo biossensor durante 22 semanas. Os resultados foram representados por meio de carta de controle estatístico, constituída de limites de advertência e ação (superiores e inferiores). Os limites de advertência são obtidos pelo cálculo, $\bar{X} \pm 2\sigma$ e o limite de ação, $\bar{X} \pm 3\sigma$, onde \bar{X} = média das medidas cronoamperométricas e σ = desvio padrão (BECKER *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021).

5.7 Tratamento de dados

Quando pertinentes, testes baseados na Análise de Variância (ANOVA), como o teste t de Student não pareado, foram aplicados ao longo dos experimentos, a fim de se comparar resultados médios obtidos.

Foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel*, versão 2010 e *Origin* versão 8.6 na geração dos gráficos deste estudo.

Resultados e Discussão^{2, 3, 4, 5}

² Parte desta seção foi publicada no artigo “Atividade inibitória de pesticidas piretroides sobre a glutathione s-transferase” no periódico Química Nova.

³ Parte desta seção foi submetida no artigo “*In silico* and *in vitro* evaluation of glutathione s-transferase inhibition prior to development of a novel biosensor for pyrethroid insecticides” para o periódico Sensors and Actuators Reports.

⁴ Parte desta seção foi submetida no artigo “Estudo *in silico* do potencial de contaminação ambiental por pesticidas piretroides” para o periódico Revista Técnica Ciências Ambientais.

⁵ Patente Depositada: RIBEIRO, E. B.; NUNES, G. S.; MARQUES, P. R. B. O.; RIBEIRO, D. B.; COSTA, A. R. C. Biossensor amperométrico para detecção de inseticidas piretroides, preparo e modo de uso, 2021. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020210231513. Data de depósito: 18/11/2021. Depositante/Titular: Universidade Federal do Maranhão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise do Potencial de Contaminação Aquática por Pesticidas Piretroides

Saber o comportamento dos pesticidas no ambiente é imprescindível para prever o risco de contaminação ambiental. Assim, dependendo de suas características os pesticidas podem permanecer em diferentes compartimentos do ambiente, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea (CABRERA *et al.*, 2008). Tendo em vista esta avaliação, encontram-se demonstradas na Tabela 10, características físico-químicas e referentes ao comportamento ambiental dos nove inseticidas piretroides em estudo e suas respectivas estruturas químicas na Figura 11.

Tabela 10 - Características físico-químicas e sobre o comportamento ambiental dos inseticidas piretroides estudados

Composto piretroide	Solubilidade em água	Massa molecular	DT ₅₀ solo (dias)	DT ₅₀ água (dias)	K _{oc} mL g ⁻¹	Log K _{ow}
Aletrina	0,0001 (B)	302,41	60 (Mod. P)	—	1400 (LM)	4,96 (A)
Bifentrina	0,001 (B)	422,88	86,8 (Mod. P)	8 (Mod. R)	236610 (NM)	6,6 (A)
Cipermetrina	0,009 (B)	416,3	21,9 (NP)	3 (Mod. R)	307558 (NM)	5,55 (A)
Deltametrina	0,0002 (B)	505,2	21 (NP)	17 (L)	10240000 (NM)	4,6 (A)
Esfenvalerato	0,001 (B)	419,91	19,2 (NP)	30 (E)	251717 (NM)	6,24 (A)
Fenpropatrina	0,33 (B)	349,42	28 (NP)	1 (Mod. R)	5000 (NM)	6,04 (A)
Lambda-cialotrina	0,005 (B)	449,85	26,9 (NP)	0,24 (R)	283707 (NM)	5,55 (A)
Permetrina	0,2 (B)	391,3	42 (Mod. P)	23 (L)	100000 (NM)	6,1 (A)
Tetrametrina	1,83 (B)	331,4	—	—	1423 (LM)	4,6 (A)

NP= não persistente; P=persistente; Mod. P= moderadamente persistente; MP= muito persistente; L= lento; LM = ligeiramente móvel; R= rápido; Mod. R= moderadamente rápido; A=alto. E = estável; NM = não móvel; B = baixa. Fonte: O autor (elaborado a partir de *Pesticide Properties Data Base (PPDB)*).

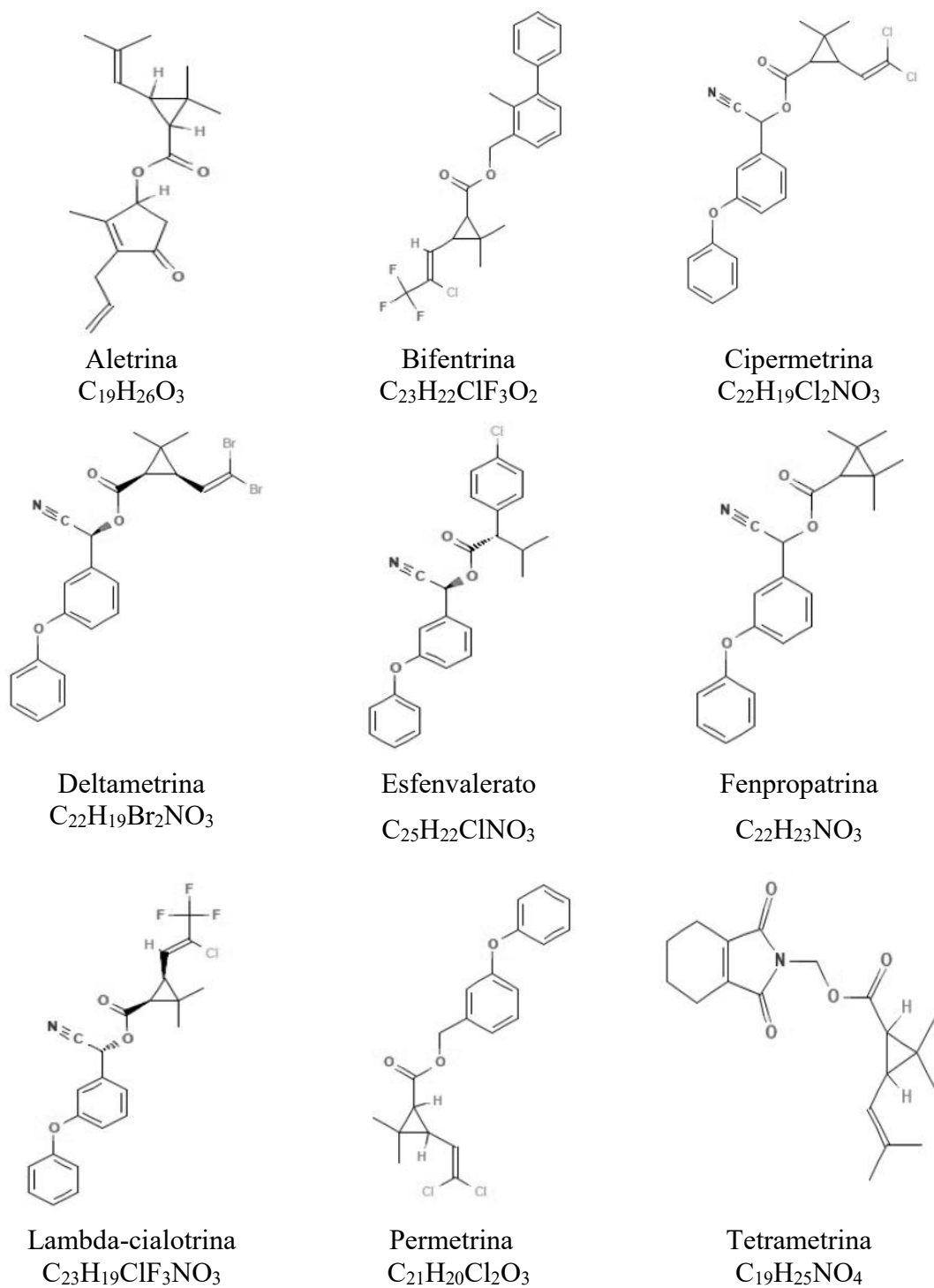


Figura 11 - Estrutura química dos inseticidas piretroides analisados.
Fonte: O autor (elaborado a partir de *Pubchem*).

Pode-se observar que os compostos analisados apresentam baixa solubilidade em água, indicando que podem sofrer lenta remoção através de águas pluviais e pouca capacidade de migrarem no ambiente. Esse atributo físico-químico se refere a

probabilidade dos contaminantes serem carregados superficialmente no solo e atingirem as águas superficiais (CABRERA *et al.*, 2008).

Os altos valores para os coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}) registrados, sinalizam a tendência bioacumulativa dos nove compostos piretroides, nos tecidos dos seres vivos. Esse parâmetro determina o caráter lipofílico da molécula do contaminante, ou seja, a afinidade por fases orgânicas, como as membranas biológicas (MILHOME *et al.*, 2009).

Quanto ao tempo de meia vida (DT_{50}), que se refere a persistência necessária para que metade da concentração total do composto químico seja degradada (FELIX *et al.*, 2007), apenas 33 % dos ingredientes ativos (aletrina, bifentrina e permetrina) mostrou-se moderadamente persistente no solo. Os demais inseticidas piretroides não indicaram essa persistência. O tempo de degradação na água apresentou-se como moderadamente rápido para 33 % dos compostos (bifentrina, cipermetrina e fenpropatrina), lento para 22 % deles (deltametrina e permetrina) e apenas 10 % se mostrou estável ou rápido.

Os valores do coeficiente de adsorção a matéria orgânica (K_{oc}) mostram que os pesticidas analisados não apresentam mobilidade ou são apenas ligeiramente móveis no solo. Medidas altas para o K_{oc} indicam que os contaminantes se fixam com firmeza à matéria orgânica do solo, podendo ser transportados através de partículas de sedimento, e não pela água (GUARDA *et al.*, 2020).

Assim, conforme os critérios analisados, os resultados para o método de GOSS (Tabela 11) mostraram a possibilidade de contaminação de águas superficiais (rios, lagos e lagoas) por compostos piretroides. Os valores indicaram médio potencial de transporte dos pesticidas em associação ao sedimento em suspensão e baixo para o transporte destas substâncias dissolvidas em água, para a maioria dos inseticidas. Apenas para três compostos, foi observado alta potencialidade de chegar as águas de superfície através do transporte associado ao sedimento, e para dois média potencialidade, dissolvidos em água.

Os resultados encontrados neste estudo foram corroborados por Cabrera *et al.* (2008) que realizou pesquisa no município de Santa Vitória do Palmar, no extremo sul do Rio Grande do Sul, com os piretroides lambda-cialotrina e permetrina, que apresentaram alto e médio potencial de transporte, respectivamente, quando associado ao sedimento em suspensão. Sobre o potencial de transporte dissolvido em água,

lambda - cialotrina também apresentou resultado semelhante, ou seja, baixo potencial de transporte dissolvido em água, porém a permetrina apresentou potencialidade diferente para esse critério (médio). Vale (2014), em estudo realizado na região do entorno do Reservatório São Gonçalo, na Paraíba, também observou baixo risco de contaminação pelo transporte dissolvido em água, para os inseticidas cipermetrina e deltametrina, porém verificou maior risco de transporte dessas substâncias por meio da associação ao sedimento.

Em ambas as formas, em maior ou menor grau, estes pesticidas podem atingir as espécies aquáticas, e provocar impactos negativos sobre elas, seja estando retidos no sedimento ou suspensos na coluna de água. Os peixes, por exemplo, podem sofrer alta toxicidade, devido as propriedades lipofílicas, que fazem com que tais contaminantes sejam absorvidos pelas brânquias (REHMAN *et al.*, 2014) e assim, pode favorecer o processo de bioacumulação.

Tabela 11 - Potencial de transporte para os inseticidas piretroides de acordo com o Método de Goss

Potencial	Potencial de transporte associado ao sedimento	Potencial de transporte dissolvido em água
Aletrina	Alto	Médio
Bifentrina	Médio	Baixo
Cipermetrina	Médio	Baixo
Deltametrina	Médio	Baixo
Esfenvalerato	Alto	Baixo
Fenpropatrina	Médio	Baixo
Lambda-cialotrina	Alto	Baixo
Permetrina	Médio	Baixo
Tetrametrina	Médio	Médio

Fonte: O autor (elaborado a partir de *Pesticide Properties Data Base (PPDB)*).

Estudo realizado com tambaquis (*Colossoma macropomum*) demonstraram que os piretroides deltametrina e esfenvalerato, foram extremamente tóxicos para estes organismos, os quais apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos além de alterações histológicas no fígado e nas brânquias (CUNHA, 2014). Medina (2019) verificaram que larvas de peixes zebra (*Danio rerio*) expostas a permetrina, apresentaram alterações

comportamentais, tanto na fase embrionária como em estágios subsequentes de desenvolvimento.

Em levantamento realizado por Li *et al.* (2017) verificaram que os piretroides bifentrina e cipermetrina foram frequentemente detectados em sedimentos agrícolas e urbanos, e foram identificados como os principais contribuintes para a toxicidade em invertebrados bentônicos. Duaví *et al.* (2015) também detectaram cipermetrina em sedimentos coletados em três pontos em áreas estuarinas e fluviais dos Rios Coco e Ceará (Fortaleza).

Outros grupos de animais aquáticos também podem ser afetados. Estudo pioneiro realizado por Alonso *et al.* (2012) constataram a bioacumulação de piretroides em mamíferos marinhos. Na análise em questão, doze piretroides foram encontrados em amostras de fígado de 23 golfinhos (*Pontoporia blainvillei*), adultos e filhotes, provenientes do Litoral Sul e Sudeste brasileiro. Foi encontrado também a presença de piretroides em amostra de leite materno e placenta destes mamíferos. Os autores cogitaram que houve transferência materna para os filhotes de alguns piretroides, como a permetrina, bifentrina, tetrametrina, deltametrina / tralometrina por via gestacional, mas principalmente pela lactação.

Uma vez que estejam presentes na água, os principais efeitos sobre os organismos incluem alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (OLIVEIRA e SILVA, 2017).

A presença de agrotóxicos em mananciais, também pode ser prejudicial para os seres humanos, quando a água é utilizada para abastecimento público, tendo em vista que existe a necessidade de tecnologias mais complexas e seguras de tratamento em relação as que normalmente são usadas para a obter a potabilidade (FERNANDES *et al.*, 2009). Nascimento (2016) detectou a presença de agrotóxicos dos grupos carbamatos (aldicarbe sulfona, carbaril e metiocarbe) e piretroide (ciflutrina e flumetrina) em águas brutas e tratadas dos reservatórios da região hidrográfica do médio curso do rio Paraíba, por meio de metodologia analítica, cromatografia líquida de alta eficiência. Esse resultado, sinalizou que o tratamento convencional para potabilização de água empregado na referida área de estudo, não se mostrou eficiente para a remoção de pesticidas.

Os resultados para os índices de GUS (Tabela 12) evidenciaram que os pesticidas piretroides, não apresentam potencial de contaminação para águas subterrâneas, uma vez que não sofrem lixiviação (GUS < 1,8).

Tabela 12 - Potencial de lixiviação dos inseticidas piretroides de acordo com o Índice GUS

Pesticida	Ale	Bif	Ciper	Delta	Esfen	Fenpro	Lambda	Perm	Tetra
Índice GUS	1,52	-2,66	-1,99	-3,98	-1,80	-0,80	-2,09	-1,62	-0,42
Análise de GUS	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL

NL = não sofre lixiviação. Fonte: O autor (elaborado a partir de *Pesticide Properties Data Base (PPDB)*).

Em estudo realizado na região do baixo rio Jaguaribe, aplicando-se o método de Goss, foi verificado para os compostos piretroides esfenvalerato e fenpropatrina, alto e médio potencial de contaminação associado ao sedimento, respectivamente, resultado semelhante ao do presente estudo. Assim como, em relação ao índice de GUS, onde os compostos: cipermetrina, esfenvalerato, fenpropatrina e lambda-cialotrina apresentaram potencial de lixiviação nulo (MILHOME *et al.*, 2009).

A lixiviação ocorre quando a água se infiltra no solo e avança em profundidade, atingindo o lençol freático (REBELO e CALDAS, 2014). Quanto menor o valor de meia-vida, menos lixiviável o composto se apresenta. Quanto maior o valor de DT₅₀ maior será o potencial de contaminação das águas, dado o maior tempo necessário para a degradação do pesticida no solo e sua consequente permanência no ambiente (FERRACINI *et al.*, 2001). Além da adsorção ao solo, DT₅₀ e a solubilidade em água, a tendência de um pesticida ser lixiviado depende de outras condições como, o tipo de solo, presença e preservação da cobertura vegetal, declividade do relevo, e incidência de chuvas (DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2014). Também podem sofrer degradação pela influência de outros fatores físicos, químicos e biológicos (VRYZAS, 2018).

6.2 Análise do Estudo *In Silico* por Docagem Molecular

Inicialmente destaca-se na Figura 12 o segmento da estrutura co-cristalizada da GST utilizada para o protocolo de docking molecular.

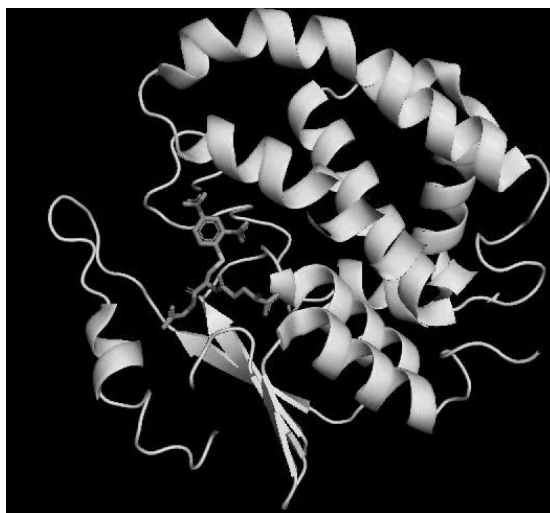


Figura 12 - Visualização da cadeia A da estrutura co-cristalizada da GST (1XWK.PDB) isolada no programa Pymol.

As características da estrutura da GST selecionada no banco de dados de proteínas estão demonstradas na Tabela 13.

Tabela 13 - Características referente ao modelo estrutural da enzima selecionada

Código da estrutura no PDB	Molécula	Organismo de origem da enzima	Resolução da estrutura
1XWK	Glutathione S-transferase	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å
Método experimental	Mutações	Cadeias	1 ligante
Difração de raios X	Não	A, B, C	Glutathionil- S-dinitrobenzeno

Fonte: O autor (elaborado a partir de *Protein Data Bank (PDB)*).

Os parâmetros empregados para a realização do procedimento de re-docking utilizando o glutathionil-S-dinitrobenzeno como ligante foram os melhores obtidos. Essa afirmação se apoia no fato de que as estruturas utilizadas nesse procedimento ficaram bem sobrepostas, onde a melhor pose encaixada mostrou baixo desvio, obtendo um RMSD de 1,72 Å (Figura 13). Esse baixo valor, sugere que há estabilidade conformacional do ligante em relação à proteína e sua cavidade de ligação (PATHAK *et al.*, 2021). Com isso, esse protocolo de re-docking foi adotado na docagem com todos

os pesticidas piretroides em estudo, contra a cadeia A da glutathione S-transferase (PDB 1XWK) (PATSKOVSKY *et al.*, 2006).

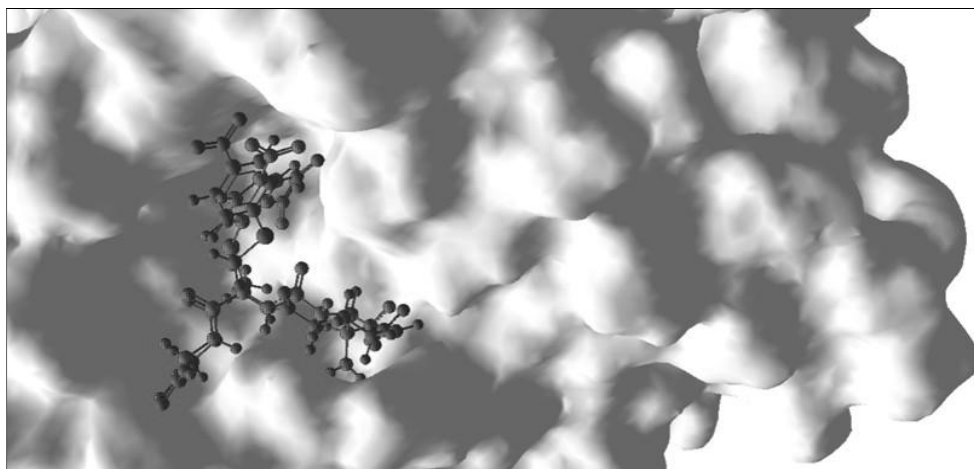


Figura 13 - Visualização do glutathione-S-dinitrobenzeno co-cristalizado (azul) e a melhor pose de glutathione-S-dinitrobenzeno (vermelho) ancorado contra a cadeia A da glutathione S-transferase - GST (superfície branca).

A Figura 14 mostra a visualização do composto deltametrina acoplado a cadeia A da GST, como exemplo dos resultados obtidos nos ensaios virtuais com os demais pesticidas, os quais interagiram bem com o sítio catalítico da GST, demonstrando afinidade de ligação. Outro exemplo de docagem realizada, foi com o composto aletrina, que se encontra na Figura E1 do Apêndice E.

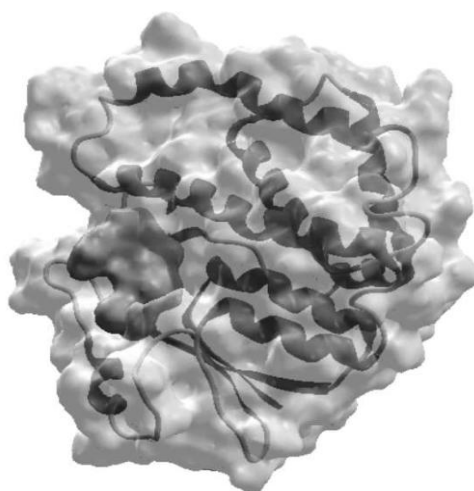


Figura 14 - Visualização da análise de docking de GST, cadeia A, ligando-se a deltametrina (superfície verde).

A Figura 15 mostra os valores de energia em moldock score, os quais representam o resultado das cinco melhores possibilidades de encaixe obtidas com as docagens, onde os resultados variaram de -95 a -68. Cada ligante se conectou de forma diferente na cavidade enzimática, com isso apresentaram valores de energia de ligação também diferentes. Estes resultados foram considerados relativamente próximos para os nove ligantes inibidores. Salienta-se que quanto menor a energia de ligação, mais favorável é a interação dos ligantes com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima alvo. Essa variação apresentada nos valores pode ser devido a semelhança estrutural dos compostos, os quais pertencem a mesma classe química. A maioria dos pesticidas piretroides sintéticos tiveram o seu desenvolvimento através da mudança de elementos na estrutura das piretrinas, contudo, importantes características foram mantidas, tais como a forma molecular, as propriedades físicas da estrutura química original e parte dessa molécula (MONTANHA e PIMPÃO, 2012). Os estudos destacam que o nível de toxicidade (atividade biológica) desses compostos está ligada a estrutura química e a configuração estérica (MONTANHA e PIMPÃO, 2012; SANTOS *et al.*, 2007).

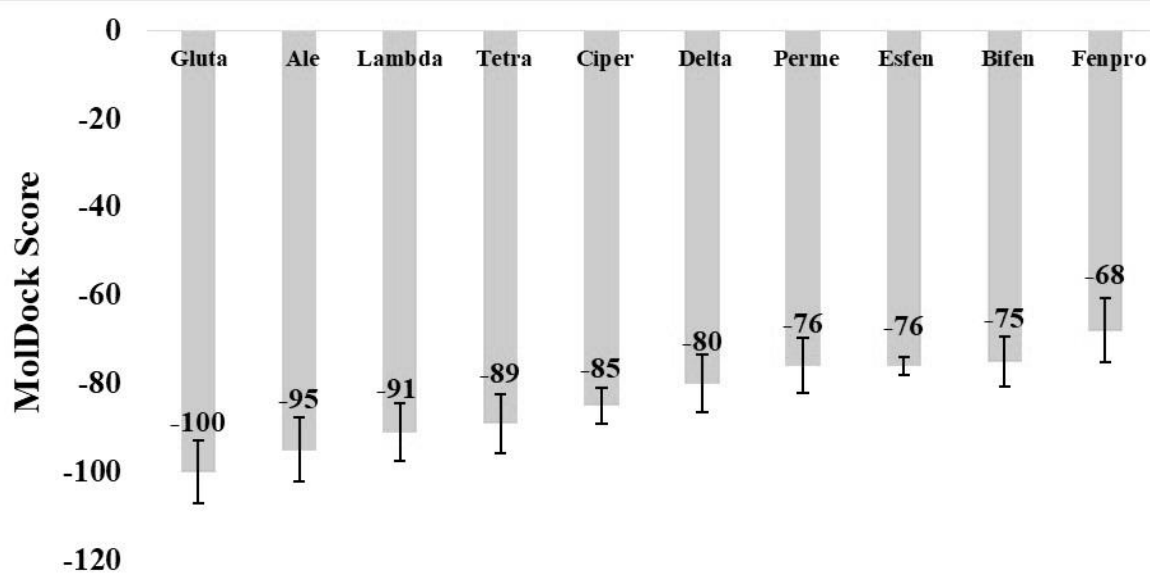


Figura 15 - Valores de energia (Moldock Score) para docking molecular de compostos piretroides contra a glutathione S-transferase (1XWK.pdb). Cada barra representa a pontuação MolDock média das cinco melhores poses de encaixe. Gluta = glutathionil, ale = aletrina, lambda = lambda-cialotrina, tetra = tetrametrina, ciper = cipermetrina, delta = deltametrina, perme = permetrina, esfen = esfenvalerato, bifen = bifentrina e fenpro = fenpropatrina.

Assim, os resultados para a energia de ligação encontrados com Molegro Virtual Docker apontaram capacidade inibitória dos pesticidas analisados, sobre a GST, o que conduziu para investigação por meio de experimentos *in vitro*.

6.3 Análise Quimiométrica: Otimização do Ensaio Espectrofotométrico

Os dados obtidos na realização dos experimentos estabelecidos por quimiometria geraram diversos gráficos, apresentados a seguir. O gráfico de Pareto indicou que os parâmetros C (carga da enzima) e B (concentração de CDNB) foram os mais significativos para a resposta do sistema enzimático, podendo provocar variações mais expressivas, mesmo com pequenas diferenças em seus níveis. O parâmetro A (concentração de GSH) não apresentou muita influência no resultado final (Figura 16).

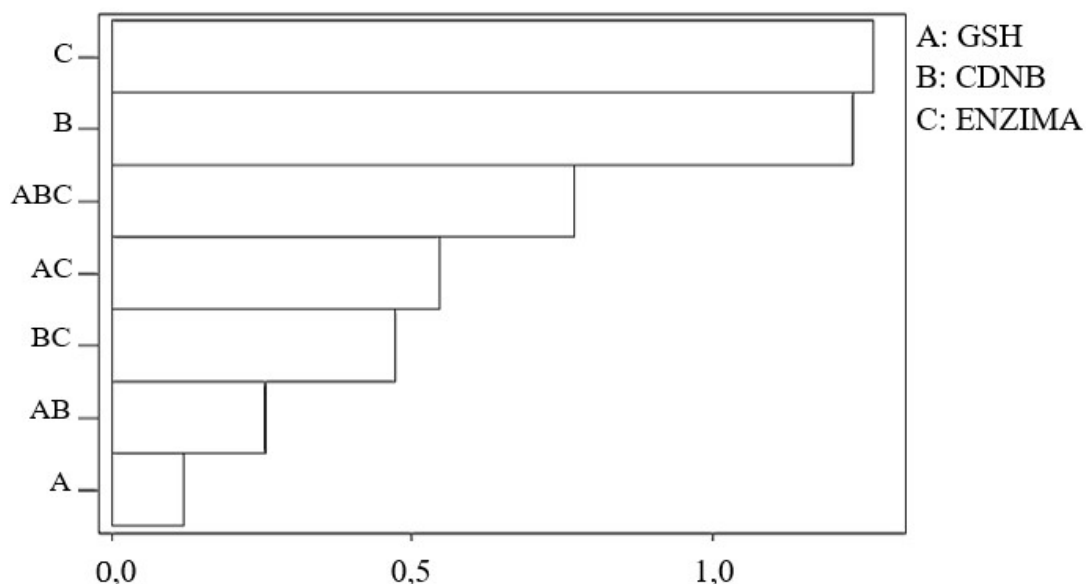


Figura 16 - Gráfico de Pareto representando a influência das concentrações dos substratos 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutatona reduzida (GSH) e a carga da enzima glutatona S-transferase (GST), nos resultados cinéticos.

O gráfico dos efeitos principais evidenciou que os parâmetros concentração CDNB e carga da enzima foram os mais significativos para a variação do sistema, isso pode ser observado claramente pela maior variação na inclinação das retas. O parâmetro concentração de GSH não apresentou variação significativa, permanecendo praticamente na horizontal (Figura 17). Isso vem ratificar o que foi demonstrado no gráfico de Pareto.

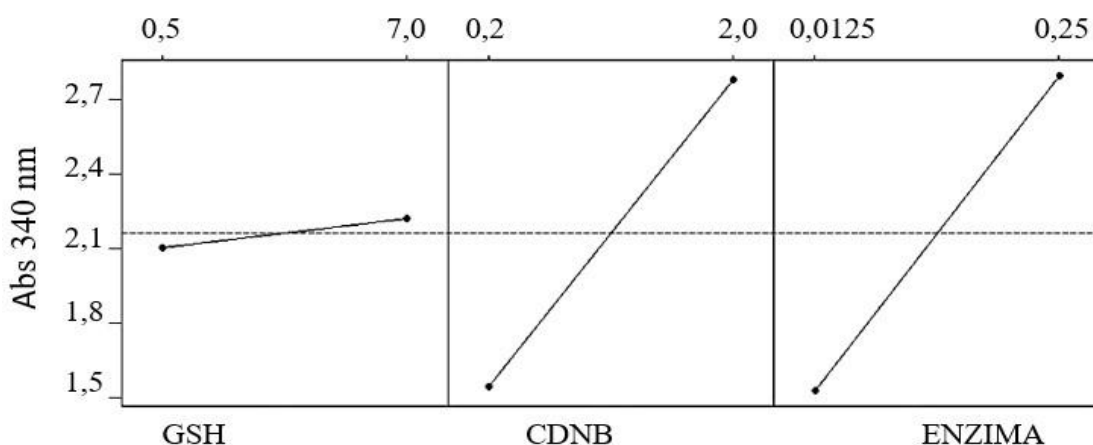


Figura 17 - Efeitos principais dos parâmetros no sistema cinético enzimático: concentrações dos substratos 1 cloro 2-4 dinitrobenzeno (CDNB) e glutathiona reduzida (GSH) e carga da enzima glutathiona S- transferase (GST).

A partir dessa análise, pode-se afirmar que a concentração do substrato GSH não representou um parâmetro determinante, sugerindo que se forem utilizados níveis de concentração mais elevados (7 mmol.L^{-1}) ou menos elevados ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), não implicaria em diferença significativa na resposta cinética.

Pelo gráfico das interações (Figura 18), pode-se observar que o parâmetro concentração de GSH sofreu ligeira influência decorrente da variação do parâmetro concentração de CDNB, visto que as retas se cruzam. Porém, tal interação mostrou-se pouco significativa, considerando que os dois valores aumentaram o sinal de absorbância com o aumento do nível de cada fator. Para a interação entre os parâmetros concentração de GSH e carga da enzima, observa-se uma interação mais forte, pois as retas se cruzam mais próximas dos valores medianos de cada um deles. Entre os parâmetros concentração de CDNB e carga da enzima, a interação parece não existir, no ponto em que os resultados são paralelos e crescentes, ou seja, apresentam certa independência entre si, indicando que um não tem influência sobre o outro.

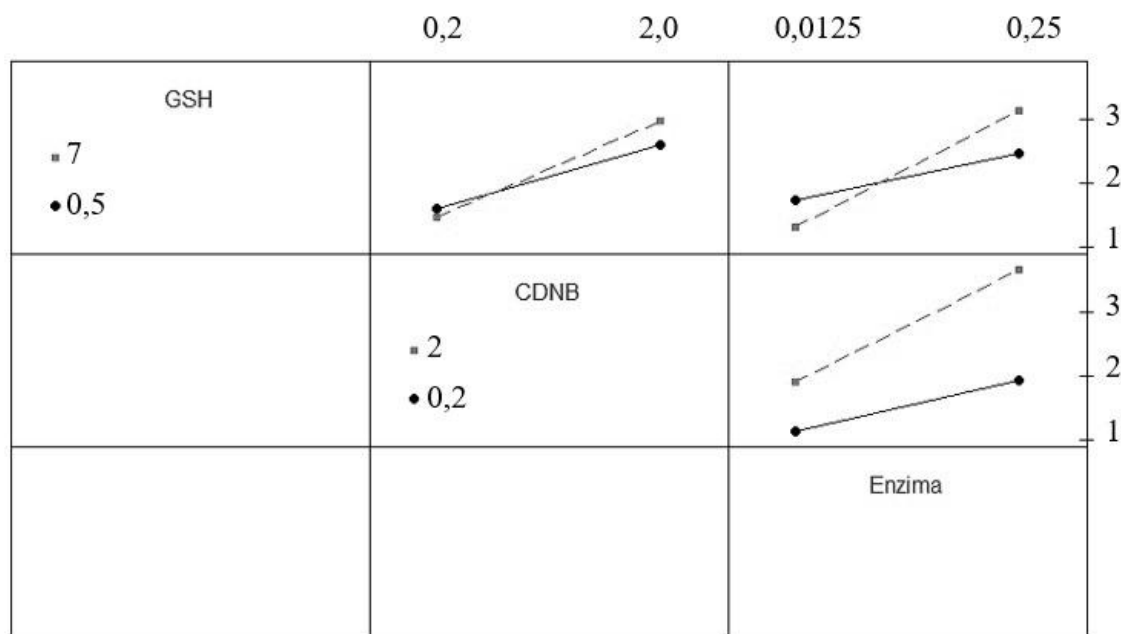


Figura 18 - Gráfico das interações no sistema cinético enzimático.

A Figura 19a apresenta o gráfico de superfície e evidencia a influência dos parâmetros concentração do CNDB e carga da enzima, com a concentração de GSH fixa no menor nível ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$). O resultado indicou que, para se alcançar os valores de absorvância entre 0,3 e 0,4 (ideal para início dos trabalhos envolvendo inibição da enzima), deve-se trabalhar com o parâmetro carga de enzima em um nível mais baixo. A variação dos níveis de carga enzimática modifica bastante o sinal analítico. Já para o parâmetro concentração do CDNB, pode ser tanto o nível alto como baixo de carga enzimática, pois a variação deste não afetou o sistema quando a concentração de GSH foi fixada no menor nível ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$).

A Figura 19b indicou claramente que, quando a concentração de CDNB for fixada em $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, é melhor trabalhar com cargas enzimáticas mais baixas e concentrações mais elevadas de GSH, para se ter valores de absorvância mais próximos de 0,3 e 0,4. Na Figura 19c, pode-se verificar que, fixando-se a carga da enzima em $0,0125 \text{ U.mL}^{-1}$, a melhor condição ocorreu com a concentração de GSH em nível mais elevado e de CDNB em nível mais baixo.

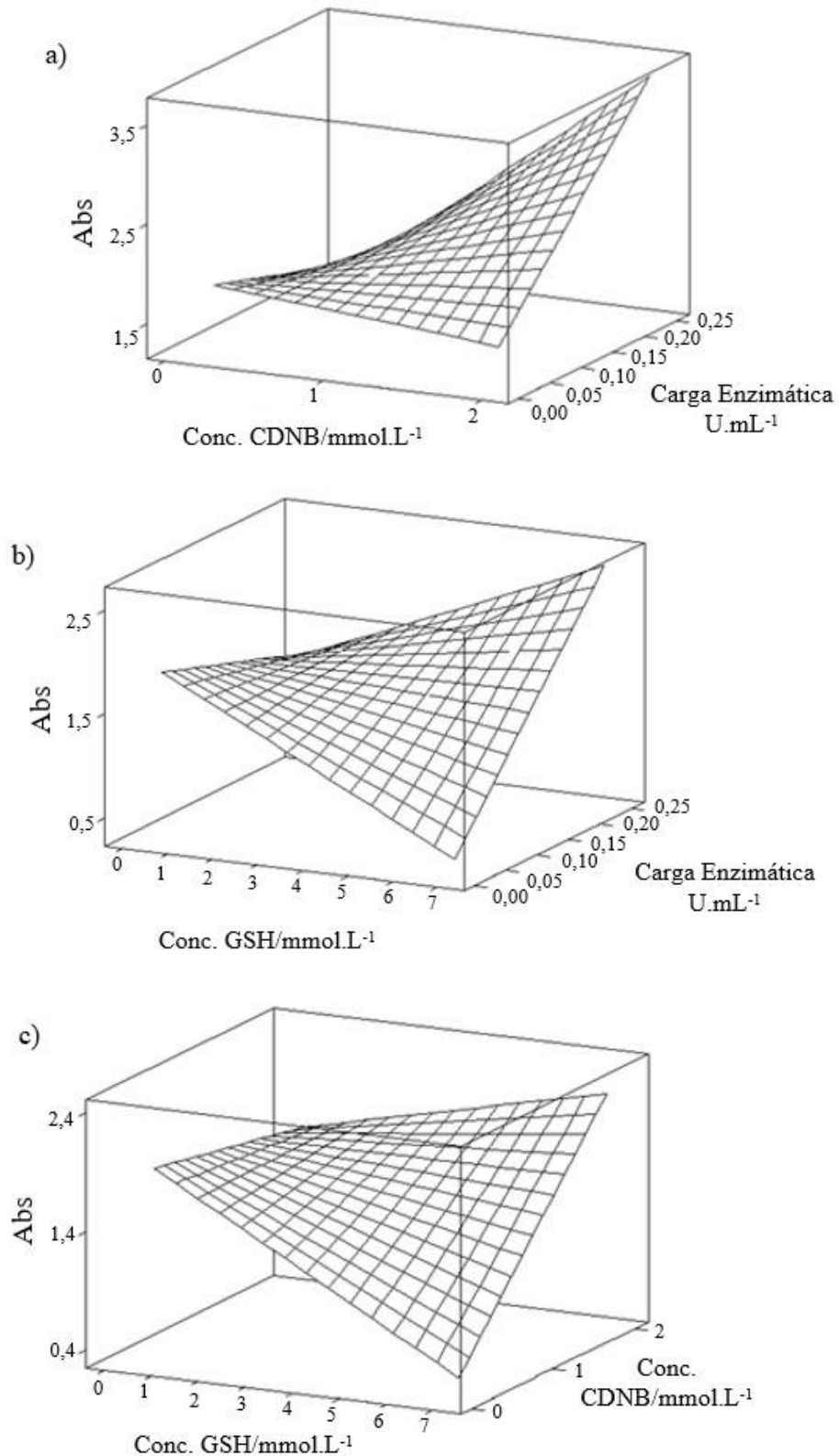


Figura 19 - Gráficos de superfície de resposta. (a) com o fator GSH fixo ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), relacionando os fatores concentração de CDNB e carga da enzima GST no sistema. (b) com o fator CDNB fixo ($0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$) relacionando os fatores concentração de GSH e carga da enzima e (c) com o fator carga da enzima fixo ($0,0125 \text{ U.mL}^{-1}$), relacionando os fatores GSH e CDNB

A partir dos dados obtidos com o planejamento fatorial, e considerando-se o alto custo da enzima optou-se pela configuração: GSH 7,0 mmol.L⁻¹; CDNB 0,2 mmol.L⁻¹ e enzima GST 0,0125 U.mL⁻¹, como melhor condição experimental a ser adotada para os ensaios cinéticos seguintes, uma vez que será utilizada a menor carga enzimática.

6.4 Cinética Enzimática na Ausência dos Inseticidas Piretroides

Após definidas as condições experimentais, foram realizados ensaios espectrofotométricos sem inibidor para obtenção dos parâmetros cinéticos relativos a constante de Michaelis - K_M e a velocidade máxima - V_{max} . Estas duas medidas são de grande importância na análise das reações enzimáticas (SIQUEIRA *et al.*, 2011), onde quanto menor o valor de K_M , maior é a afinidade da enzima pelo substrato, pois uma menor concentração de substrato é requerida para que se alcance a metade da velocidade máxima da reação (NELSON e COX, 2014). A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão do substrato em produto pela ação da enzima, o que pode ser obtido convencionalmente variando-se a concentração de substrato (OLIVEIRA e SILVA, 2017).

O método mais adequado para a determinação dos parâmetros cinéticos citados, é através do gráfico de Lineweaver-Burk ou gráfico dos duplos recíprocos, que relaciona o inverso da velocidade ($1/V$), pelo inverso da concentração do substrato ($1/[S]$) (VOET e VOET, 2013). Assim, encontra-se demonstrado na Figura 20, o comportamento cinético da enzima GST frente a variação da concentração dos substratos glutathiona reduzida-GSH e 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno-CDNB e nas Tabelas F1 e F2 do Apêndice F, os registros referentes aos ensaios espectrofotométricos para a obtenção dos dados da reação enzimática.

A glutathiona, é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos: ácido glutâmico, glicina e cisteína que existe no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que o local ativo responsável por suas propriedades bioquímicas, é o grupo tiol da cisteína (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). O princípio da atividade da glutathiona S-transferase (GST) é de que a enzima catalisa a conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com o substrato sintético CDNB, após essa conjugação, há um aumento na absorbância a 340 nm (HABIG *et al.*, 1974).

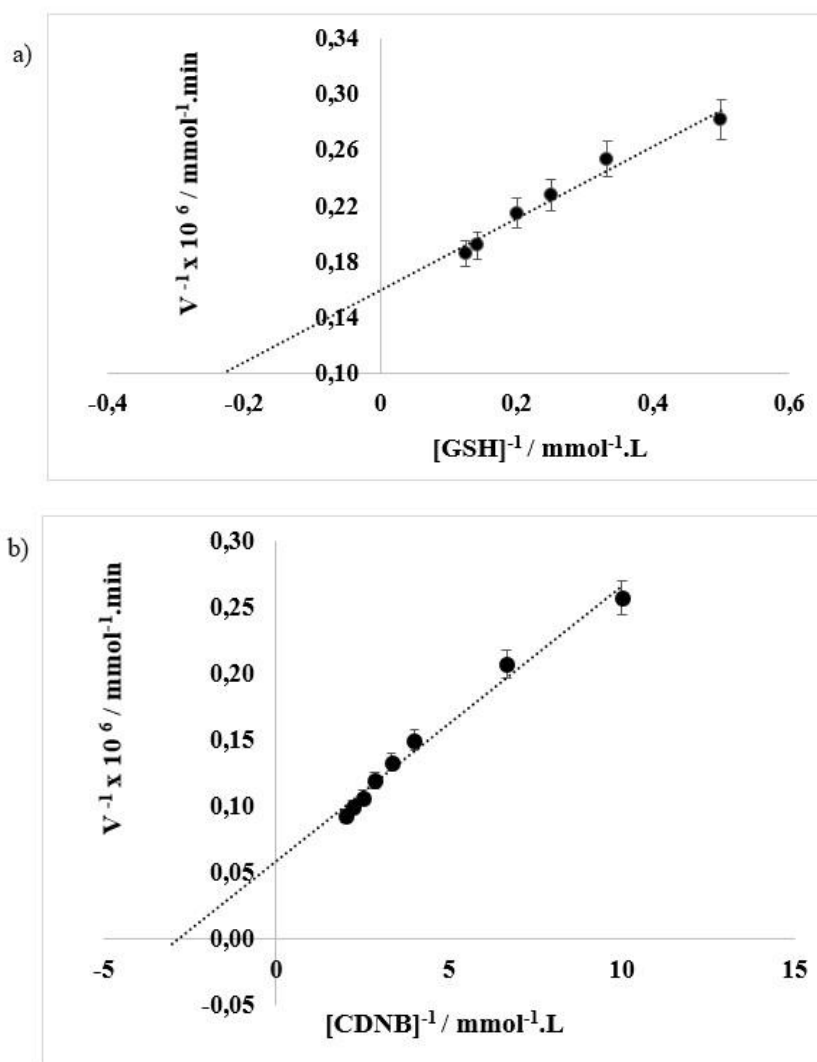


Figura 20 - Plotagem do inverso da velocidade pelo inverso da concentração de (a) GSH e (b) CDNB conforme método Lineweaver-Burk.

A partir das equações provenientes dos gráficos de regressão linear da Figura 20: a) $y = 258355x + 158901$ com $R^2 = 0,97$ e b) $y = 20665x + 58694$ com $R^2 = 0,98$, os parâmetros de V_{\max} e K_M , foram calculados e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros cinéticos de GST em relação ao CDNB e a GSH

Parâmetros	Resultados	
	CDNB	GSH
V_{\max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,017	0,0063
K_M ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	350	1620

Os resultados demonstraram que a V_{\max} mais elevada foi obtida pela reação com concentrações crescentes de CDNB, a qual apresentou um menor valor de K_M , indicando a maior afinidade enzimática.

Enache e Oliveira-Brett (2015) estudaram eletroquimicamente os parâmetros cinéticos da GST, para diferentes concentrações de GSH e CDNB incubado por dois períodos de tempo (15 e 30 min) e verificaram que essa enzima demonstrou aproximada afinidade para ambos os substratos (GSH e CDNB) visto que encontraram o valor de K_M entre 100 e 111 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ para o CDNB e para GSH entre a 104 e 100 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Em estudo realizado por Borah *et al.* (2018) com a enzima glutathione S-transferase comercial de fígado equino, encontraram menor valor de K_M para a GSH (0,083 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) em relação ao CDNB (0,15 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). Destaca-se que os dados do presente estudo, foram registrados por meio de medidas espectrofotométricas e os estudos comparativos foram realizados medindo-se a resposta eletroquímica.

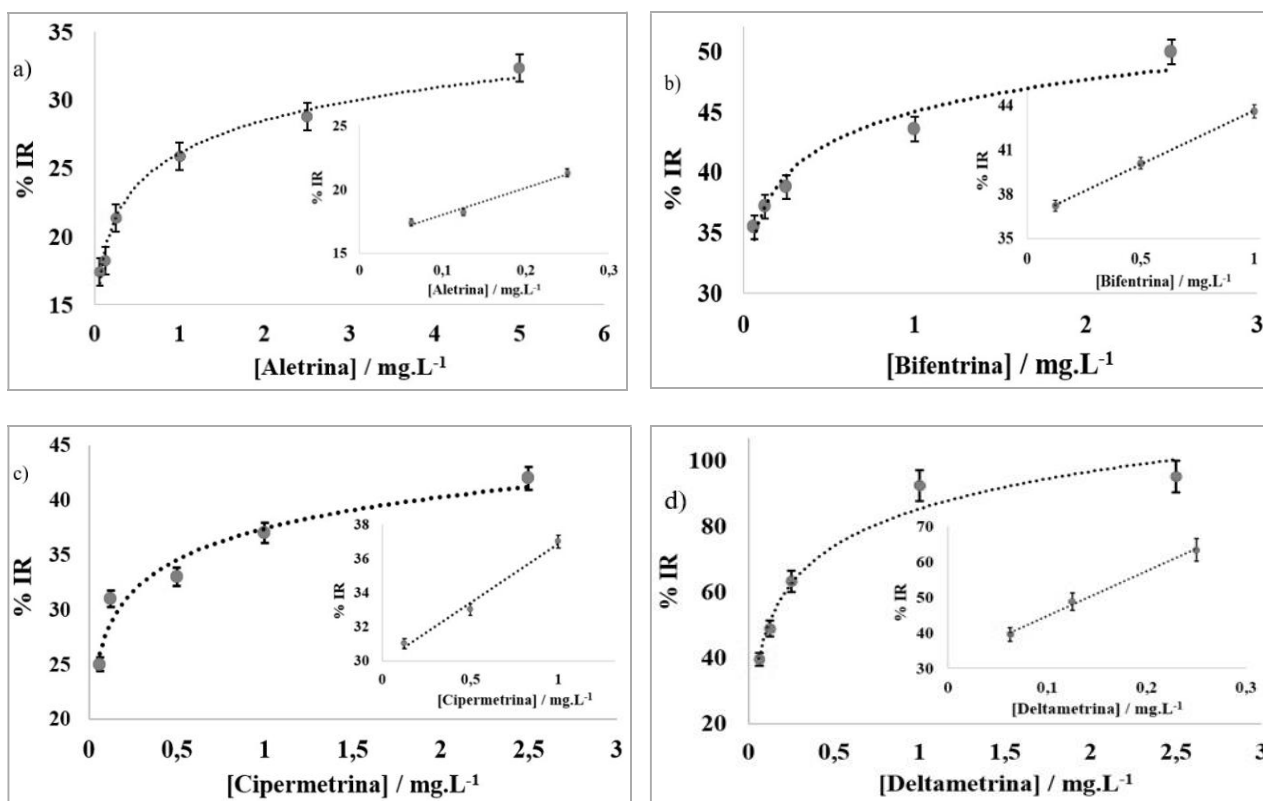
Torres *et al.* (2004) analisaram essa mesma enzima purificada de fígado de ratos com o substrato CDNB e encontraram V_{\max} de 0,016 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$ e o K_M de 0,323 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ espectrofotometricamente. A diferença verificada entre os valores dos parâmetros cinéticos obtidos neste estudo que utilizou enzima comercial de fígado equino e os encontrados na literatura, pode estar relacionada ao tipo de técnica analítica aplicada e ao tipo da enzima. Torres *et al.* (2004) esclarecem que a variação dos valores pode ser dependente da enzima purificada, tendo em vista que também encontrou diferença de valores em seus estudos em que relacionou com outro trabalho que utilizou a GST extraída de cérebro bovino.

Considerando o menor valor de K_M obtido, pode-se afirmar que o CDNB se mostrou o melhor substrato para a enzima GST. Esse resultado está de acordo com o que foi mostrado anteriormente pelo gráfico de Pareto na Figura 16. Os seguintes ensaios cinéticos, com a enzima GST, foram realizados na presença dos inibidores piretroides.

6.5 Cinética de Inibição por Inseticidas Piretroides

6.5.1 Curvas de inibição relativa e IC₅₀

Os valores percentuais referentes a inibição relativa - IR, foram obtidos com os ensaios espectrofotométricos contendo concentrações fixas de CDNB, GSH, e carga enzimática, em função das concentrações crescentes dos inseticidas piretroides, como mostra as curvas analíticas de inibição na Figura 21. Observa-se que tais curvas apresentaram correlação não linear (com perfil logarítmico), mostrando gradativamente, a menor disponibilidade das moléculas enzimáticas para ligação ao substrato. Nesse processo, as concentrações elevadas do composto inibidor podem afetar os sítios ativos da enzima, saturando-os ou tornando-os parcialmente inativos (MARQUES *et al.*, 2006).



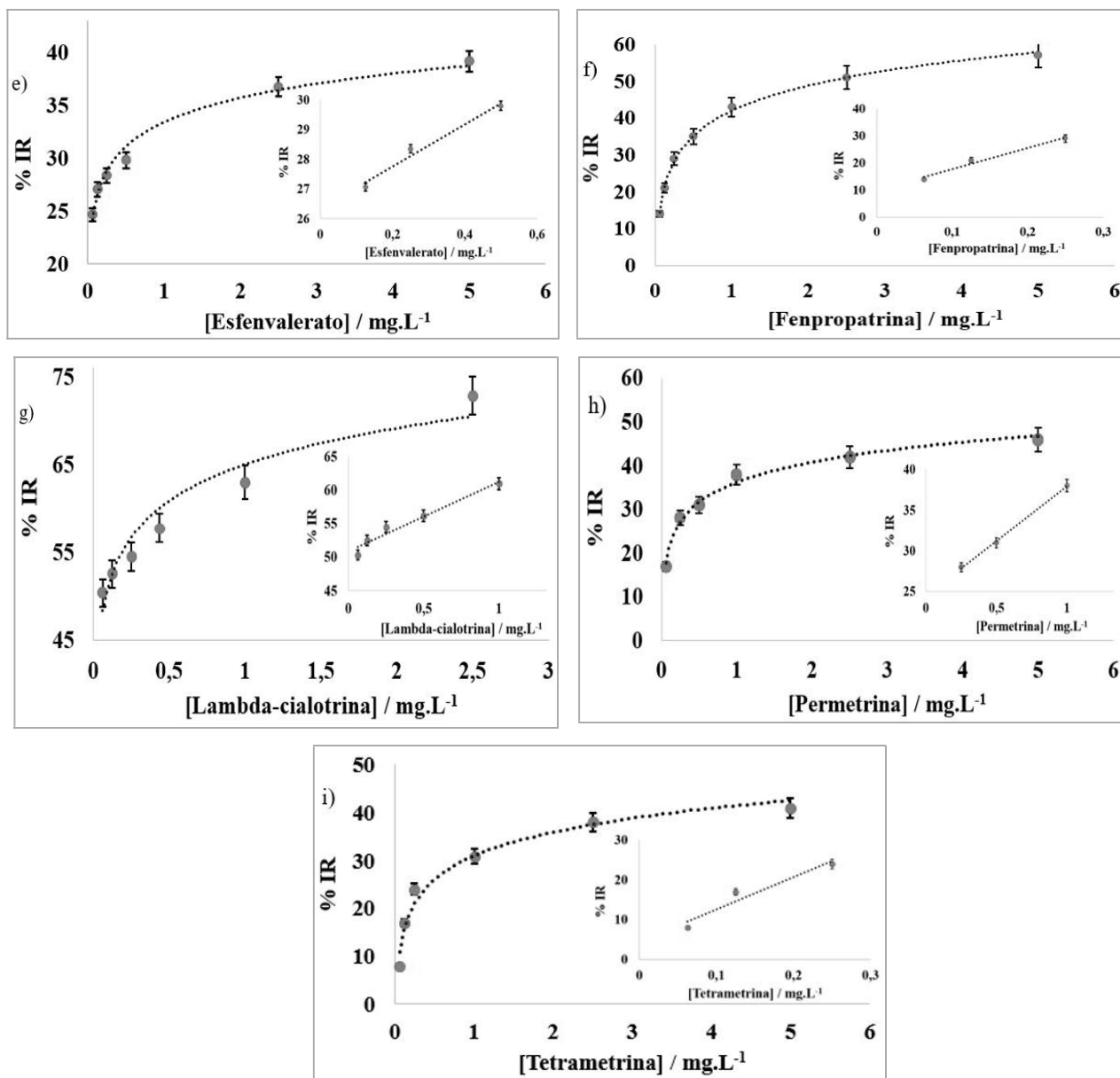


Figura 21 - Curvas de inibição para os nove pesticidas em estudo, obtidas por ensaios espectrofotométricos, destacando-se a faixa linear.

A partir das curvas analíticas de inibição da GST foram determinados os dados referentes a equação linear, coeficiente de correlação - R^2 , faixa linear de trabalho e a sensibilidade da técnica, representada pelo limite de detecção - LD para cada analito piretroide (Tabela 15). O LD representa a menor concentração ou massa do analito que pode ser detectada, pela técnica instrumental aplicada (RIBEIRO *et al.*, 2008; TALEUZZAMAN, 2018).

Os LD's, foram calculados com base em um valor mínimo de 10% de inibição (NUNES *et al.*, 2014), onde os menores registros para esse parâmetro, foram obtidos

para os compostos deltametrina, fenpropratrina, aletrina e tetrametrina, o que significa dizer que a enzima GST apresentou maior sensibilidade com estes inseticidas, por meio de espectrofotometria.

Tabela 15 - Dados analíticos em termos de equação da reta, faixa de linearidade e limites de detecção, obtidos por espectrofotometria

Pesticida	Equação da reta	R²	Faixa Linear (mg.L⁻¹)	LD (mg.L⁻¹)
Aletrina	$y = 21,406x + 15,875$	0,98	0,0625 a 0,25	0,09
Bifentrina	$y = 7,2995x + 36,339$	0,99	0,125 a 1,0	0,12
Cipermetrina	$y = 6,9189x + 29,919$	0,98	0,125 a 1,0	0,36
Deltametrina	$y = 125,06x + 32,385$	0,99	0,0625 a 0,25	0,03
Esfenvalerato	$y = 7,0914x + 26,335$	0,97	0,125 a 0,5	0,17
Fenpropratrina	$y = 77,714x + 10,0$	0,97	0,0625 a 0,25	0,08
Lambda-cialotrina	$y = 10,367x + 50,851$	0,96	0,0625 a 1,0	0,14
Permetrina	$y = 13,429x + 24,5$	0,99	0,25 a 1,0	0,13
Tetrametrina	$y = 85,333x + 2,6667$	0,94	0,0625 a 0,25	0,09

Os inseticidas piretroides tiveram os valores de IC₅₀ calculados e são demonstrados na Tabela 16. Pode-se observar que os resultados variaram de 1,3 a 4,3 mg.L⁻¹, onde as menores concentrações foram registradas para os compostos deltametrina e lambda-cialotrina. Destaca-se que o composto deltametrina, apresentou-se, aproximadamente 3,3 vezes menor que a aletrina com IC₅₀ de 4,3. Esse valor mostra que o piretroide deltametrina reduziu a atividade da enzima GST pela metade, mesmo estando em concentração mais baixa. Esse resultado apontou sua forte capacidade inibitória em relação aos demais pesticidas analisados. Corroborando esse resultado, a literatura relata que, entre os piretroides, a deltametrina foi o composto químico originado da inclusão do grupo substituinte α -ciano no grupo 3-fenoxibenzila, atribuindo maior potência inseticida em relação a outros compostos piretroides previamente sintetizados, como a permetrina (SODERLUND *et al.*, 2002).

Tabela 16 - Capacidade inibitória dos diferentes pesticidas piretroides sobre a GST

Composto	IC₅₀ (mg.L⁻¹)	IC₅₀ (mmol.L⁻¹)
Aletrina	4,3	1,42x10 ⁻²
Esfenvalerato	3,5	8,34x10 ⁻³
Tetrametrina	3,3	9,96x10 ⁻³
Permetrina	3	7,67x10 ⁻³
Cipermetrina	2,9	6,97x10 ⁻³
Bifentrina	2,5	5,91x10 ⁻³
Fenpropratrina	2,5	7,16x10 ⁻³
Lambda-cialotrina	1,7	3,78x10 ⁻³
Deltametrina	1,3	2,57x10 ⁻³

Muitos compostos piretroides apresentam-se como uma mistura complexa de isômeros com dois ou mais carbonos assimétricos, e sua composição pode ser um importante parâmetro toxicológico e ecotoxicológico, pois normalmente a atividade química e o destino ambiental podem diferir de acordo com o isômero considerado (PARENTE *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2010). É importante destacar que os piretroides são amplamente utilizados desde 1970 (MONTANHA e PIMPÃO, 2012) e tornaram-se uma preocupação pública por causa da contaminação ambiental e os efeitos tóxicos sobre grupos de animais não alvo, o que desfavorece a biodiversidade e o equilíbrio ambiental (CHEN *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2016).

Pesquisas toxicológicas indicaram que os piretroides estão entre os inseticidas que mais afetam espécies aquáticas, tais como peixes e crustáceos (VIEIRA e MARTINEZ, 2018; VIEIRA *et al.*, 2007) e espécies que são agentes de polinização, como as abelhas (CHMIEL *et al.*, 2020; PALMQUIST *et al.*, 2012). Para os peixes a toxicidade ocorre devido a propriedades lipofílicas, com isso os contaminantes são absorvidos fortemente por suas brânquias, mesmo estando em concentração baixa na água (REHMAN *et al.*, 2014). As abelhas podem ser afetadas por meio da exposição por contato ou ingestão ambiental, levando ao acúmulo de pesticidas dentro das abelhas individualmente e em toda a colmeia (CHMIEL *et al.*, 2020).

Testes de contato com os inseticidas deltametrina e cipermetrina demonstraram alterações comportamentais significativas, respectivamente, a partir de 90 e 60 minutos de exposição, em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (BOVI, 2013).

Em pesquisa realizada no Estado da Paraíba foram utilizados os inseticidas bifentrina e deltametrina com as espécies de abelhas nativas *Melipona subnitida* e *Melipona scutellaris*, popularmente conhecidas como jandaíra e uruçú. Nos resultados foram observados sintomas de intoxicação (prostração, paralisia e tremores) nas primeiras horas e mortalidade significativa dessas abelhas, variando de 80% a 100% no intervalo de duas a três horas (ARAÚJO, 2019).

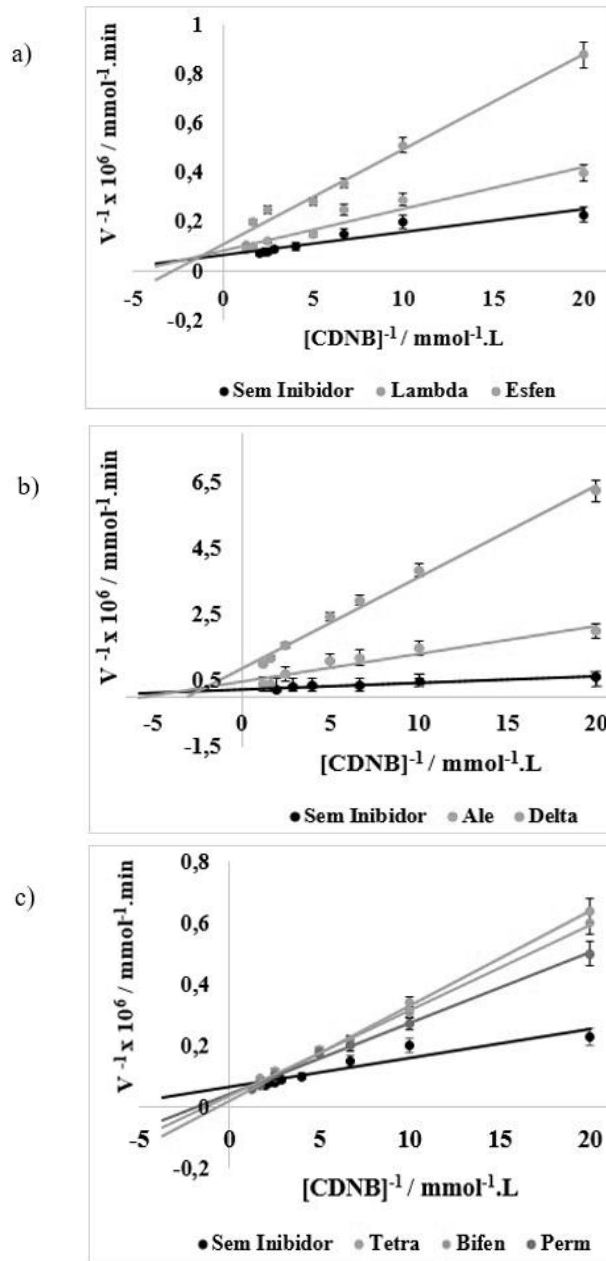
6.5.2. Determinação da constante de inibição - K_i

Na Figura 22 estão os gráficos de Lineweaver-Burk, a partir dos quais foi determinado o tipo de inibição que os pesticidas piretroides provocaram sobre a enzima GST, assim como também foi calculado a constante de inibição- K_i . Observa-se na Figura 22a e 22b, que as retas se cruzaram a esquerda do eixo $1/V_0$, indicando que os inibidores (lambda-cialotrina, esfenvalerato, aletrina e deltametrina) realizaram inibição não competitiva, também denominada de inibição mista. Com isso fizeram ligação em um local distinto do sítio ativo, ao qual o substrato se liga, e que podem realizar ligação tanto à enzima quanto ao complexo enzima-substrato. Estudos anteriores verificaram comportamento de inibição semelhante para os compostos deltametrina (MARKUS *et al.*, 2018) e lambda-cialotrina (BALCI *et al.*, 2019; GÜLLER *et al.*, 2018) e de forma diferente, foi verificado inibição competitiva para lambda-cialotrina em outro trabalho (ÖZASLAN *et al.*, 2018).

Na Figura 22c e 22d o comportamento dos inibidores (tetrametrina, bifentrina, permetrina, cipermetrina e fenpropratrina) indicou que a GST foi inibida competitivamente, embora as retas não estejam se encontrando exatamente em cima do eixo $1/V_0$. Este perfil de inibição demonstra que os compostos competiram diretamente com o substrato pelo sítio de ligação da GST.

Esses diferentes comportamentos de inibição podem estar relacionados com os mecanismos de reversibilidade apresentados por cada tipo de composto inibidor. Alguns inibidores enzimáticos são substâncias que possuem estrutura parecida com as dos substratos enzimáticos, mas que não reagem ou reagem lentamente com a enzima; outros afetam a atividade catalítica sem interferir na ligação dos substratos; enquanto outros podem realizar ambos os processos (VOET e VOET, 2013).

Borah *et al.* (2018) relatam que em estudo de inibição realizado com a glutatona S-transferase utilizando os pesticidas carbedanzim e dinocap, verificaram a ocorrência de inibição mista para os dois inibidores e que não é possível calcular um único valor para a constante de inibição a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk porque o inibidor pode se ligar tanto a enzima livre como ao complexo enzima-substrato.



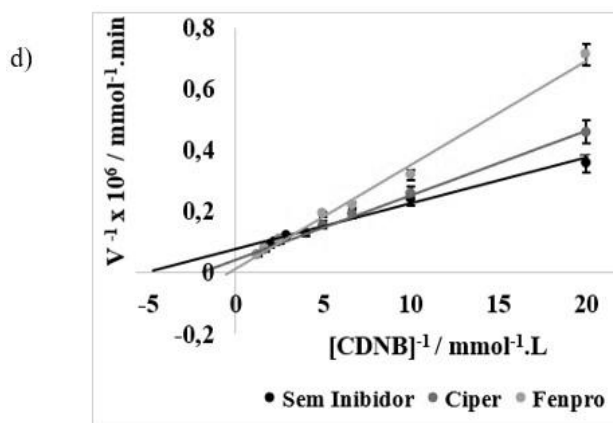


Figura 22 - Representação de Lineweaver-Burk para a enzima GST na presença de inibidores piretroides: não competitivos (a) lambda-cialotrina, esfenvalerato (b) aletrina, deltametrina; competitivos (c) tetrametrina, bifentrina, permetrina e (d) cipermetrina, fenpropatrina.

Os compostos inibidores podem interagir com enzimas e/ou complexos enzima-substrato de várias maneiras diferentes para inutilizar a atividade de uma enzima ao realizar uma reação de catálise (BORAH *et al.*, 2018). A inibição da glutatona S-transferase pode levar a consequências graves sobre os seres vivos, tendo em vista que está presente em diversos organismos, como micro-organismos, insetos, plantas, peixes, pássaros e mamíferos (DZOYEM *et al.*, 2014) e que tem papel importante na desintoxicação de compostos endógenos e exógenos (CHIKEZIE, 2015). A toxicidade dos pesticidas pode afetar não só os organismos-alvo, mas também os seres humanos e outros animais que estão expostos a esses compostos (ÖZASLAN *et al.*, 2018) seja pela contaminação do ambiente (FERNANDES NETO e SARCINELLI, 2009; GAN *et al.*, 2005) ou dos alimentos (MELLO e SILVEIRA, 2012; TREVIZAN e BAPTISTA, 2000).

Os valores para as constantes de inibição- K_i foram calculados para cada pesticida e estão demonstrados na Tabela 17 em ordem decrescente. Onde observa-se uma tendência inversamente proporcional de redução da V_{max} e aumento dos valores de K_i para a maioria dos compostos. A constante de inibição é considerada o melhor indicador para representar o potencial de interação entre o inibidor e a enzima (ROBIN *et al.*, 2020). Nesse sentido o composto deltametrina, foi o que mais se destacou com maior valor para esse parâmetro, ou seja, maior potencial de inibição sobre a GST, em relação aos demais que apresentaram valores menores e aproximados.

Tabela 17 - Parâmetros cinéticos da enzima GST na presença de inibidores piretroides e valores de K_i

NOME DO COMPOSTO	V_{max} (mmol.min ⁻¹)	K'_M (mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹)	K_i (μ mol ⁻¹ .L.min ⁻¹)	Tipo de inibição
Deltametrina	$1,2 \times 10^{-6}$	0,35	20 ^a	Não competitivo
Esfenvalerato	$3,0 \times 10^{-5}$	0,58	1,1 ^b	Não competitivo
Cipermetrina	$2,5 \times 10^{-5}$	0,56	1,00 ^b	Competitivo
Permetrina	$2,5 \times 10^{-5}$	0,61	0,87 ^b	Competitivo
Lambda - cialotrina	$1,4 \times 10^{-5}$	2,4	0,83 ^b	Não competitivo
Aletrina	$5,7 \times 10^{-5}$	0,78	0,68 ^b	Não competitivo
Bifentrina	$3,0 \times 10^{-5}$	0,85	0,39 ^c	Competitivo
Tetrametrina	$4,2 \times 10^{-5}$	1,3	0,29 ^d	Competitivo
Fenpropatrina	$7,4 \times 10^{-5}$	2,5	0,12 ^e	Competitivo

K'_M = constante de Michaelis – Menten (ensaios variando a concentração do substrato CDNB na presença de inibidor); K_i = constante de inibição, calculada a partir da representação de Lineweaver-Burk, na presença do inibidor. Valores de K_i com mesma letra, na vertical, não diferem significativamente entre si, no nível de 95% de probabilidade, pelo teste t de Student não pareado.

Os valores das constantes de inibição foram submetidos à análise de variância e as médias, foram comparados pelo teste t de Student não pareado considerando $p < 0,05$. Os resultados mostraram diferença significativa para 4 dos inibidores, conforme indicado na Tabela 17.

Comparando-se com estudos antecedentes apresentados na Tabela 18, os registros de K_i para deltametrina utilizando GST de placenta humana foram inferiores ao do presente estudo. No entanto, os demais valores de K_i com GST de fígado de peru, de fígado de peixe e de frutos de mirtilo foram mais elevados. As diferenças nesses resultados, podem estar relacionadas as diversas fontes da enzima GST utilizadas e mesmo em relação ao substrato (GSH ou CDNB) considerado como principal nos ensaios cinéticos de inibição.

Tabela 18 - Dados para a constante de inibição relatados na literatura

Pesticida	K _i	Origem da GST	Referência
*Cipermetrina	0,22 mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹	Purificada de fígado de peru	(GÜLLER <i>et al.</i> , 2018)
*Lambdacialotrina	0,122 mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹		
**Deltametrina	5,61 µmol ⁻¹ .L.min ⁻¹	Placenta humana Comercial	(MARKUS <i>et al.</i> , 2018)
*Deltametrina	7,96 µmol ⁻¹ .L.min ⁻¹		
*Lambdacialotrina	0,025 mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹	Purificado de fígado de peixe Van Lake (<i>Chalcalburnus tarichii</i> Pallas)	(ÖZASLAN <i>et al.</i> , 2018)
*Cipermetrina	0,310 mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹	Purificada a partir de frutos de mirtilo (<i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.)	(BALCI <i>et al.</i> , 2019)
*Lambdacialotrina	0,633 mmol ⁻¹ .L.min ⁻¹		

*Fixo [GSH], variado [CDNB]. **Fixo [CDNB], variado [GSH].

Com os resultados até aqui obtidos, sobre as características de inibição dos nove princípios ativos piretroides em relação a GST, foi possível verificar a viabilidade analítica para o desenvolvimento de um biossensor enzimático voltado para a detecção dessa classe de pesticidas.

Nesse sentido, tem-se a seguir a etapa de estudo eletroquímico cujas as concentrações dos substratos enzimáticos utilizadas foram mantidas, CDNB 0,2 mmol.L⁻¹, GSH 7,0 mmol.L⁻¹, e a carga enzimática utilizada foi de 0,18 mU por biossensor.

6.6 Princípio Bioquímico do Biossensor Enzimático

Na reação catalisada pela glutiona S- transferase ocorre a desprotonação da glutiona reduzida gerando o ânion tiolato GS⁻, que possui maior reatividade. A reação de conjugação do tiolato com o CDNB gera um complexo instável e na sequência a formação do conjugado glutionil-dinitrobenzeno - GS-DNB (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2015). A associação do substrato CDNB com GSH libera íons H⁺ e Cl⁻, que podem ser monitorados eletroquimicamente. E no sentido de diminuir os potenciais eletroquímicos nas análises têm-se utilizados eletrodos de carbono quimicamente modificados com mediadores (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Os mediadores eletroquímicos são substâncias de baixa massa molecular com propriedades redox que,

em uma primeira etapa, interage com o substrato ou produto de uma determinada reação e, então difunde-se até a superfície do eletrodo de trabalho, onde sofre uma transferência de elétrons rápida sob um potencial menor (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

6.7 Caracterização Eletroquímica dos Sensores e Biossensores

No processo de análise dos eletrodos, o uso de técnicas eletroanalíticas são dependentes da superfície eletródica, que deve apresentar elevada razão sinal-ruído e boa reprodutibilidade. O eletrodo de trabalho a ser utilizado depende de dois fatores: do comportamento redox do analito e das correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Além de considerar a janela de potencial de trabalho, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, entre outras características (GALLI *et al.*, 2006).

Visando determinar o potencial de trabalho e o mediador eletroquímico a ser empregado, as técnicas eletroquímicas aqui aplicadas foram, inicialmente a voltametria cíclica e posteriormente a cronoamperometria. Tais técnicas eletroanalíticas são amplamente empregadas em estudo de biossensores (ARDUINI *et al.*, 2019; AYAT *et al.*, 2021; BLASQUES *et al.*, 2020; SOLHI *et al.*, 2020; VILLIS *et al.*, 2018).

Assim, para conhecer o comportamento dos eletrodos, foram analisados em tampão fosfato os sensores contendo somente a pasta de carbono (grafite), sensores modificados com os mediadores azul de Meldola com sal de Reinecke (MBRS) com duas camadas ou ftalocianina de cobalto-CoPC e biossensores modificados e não modificados com tais mediadores, conforme mostra a Figura 23. Comparando-se os resultados obtidos, é possível verificar maior resposta eletroquímica nos eletrodos da Figura 23b, os quais contêm a presença da GST, em relação aos da Figura 23a, que não contêm. Observa-se também que o biossensor com mediador MBRS em presença da GST apresentou a formação de um segundo pico na varredura anódica, em relação a Figura 23a, com valores de corrente de 35 e 28 μA , nos potenciais de trabalho -250 mV s^{-1} e próximo a 100 mV s^{-1} , respectivamente, e picos catódicos próximos a -600 e -200 mV s^{-1} . Em ambos picos anódicos, houve maior intensidade de corrente em relação ao eletrodo com mediador CoPC.

A presença dos mediadores na superfície do eletrodo de trabalho, tem como finalidade favorecer para uma rápida transferência eletrônica (MENDONÇA *et al.*,

2012). Além disso, biossensores contendo mediadores são menos susceptíveis a interferências eletroquímicas (MENDONÇA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2021). O uso de um mediador para melhorar o desempenho de dispositivos sensores é comum, e vários tipos de mediadores (como Azul de Meldola, Azul da Prússia, éteres de coroa, ftalocianina de cobalto e hexacianoferrato de níquel) foram integrados com sucesso no processo de impressão de sensores para muitos analitos alvo (HAYAT e MARTY, 2014).

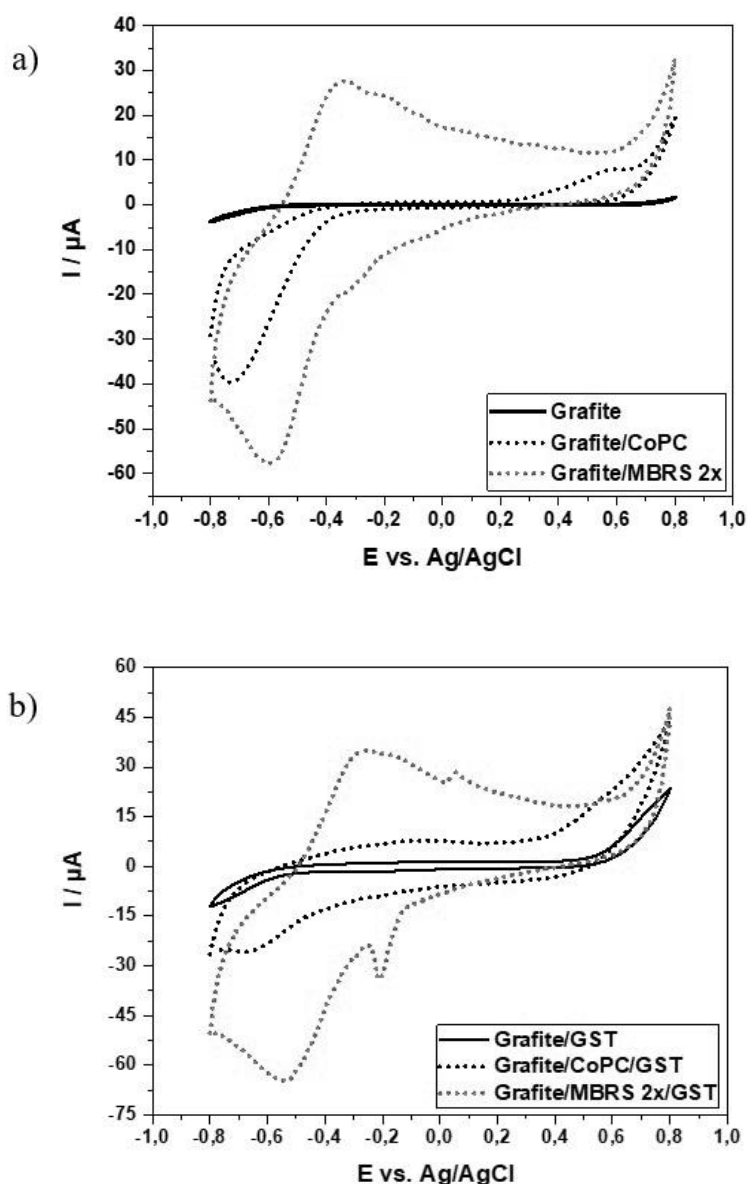


Figura 23 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono (grafite) sem mediador, com mediador CoPC e MBRS em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 sem enzima (GST) (a) e com enzima imobilizada no eletrodo de trabalho (b). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A Figura 24 apresenta os voltamogramas produzidos no ensaio eletroquímico em presença do substrato enzimático, utilizando-se os sensores com pasta de carbono, sensores modificados com os mediadores MBRS e CoPC e biossensores com e sem mediadores. Verifica-se que a resposta eletroquímica nesta etapa aumentou em comparação aos analisados na etapa anterior, em tampão fosfato (Figura 23), evidenciando a interação com meio em que foi promovida a reação.

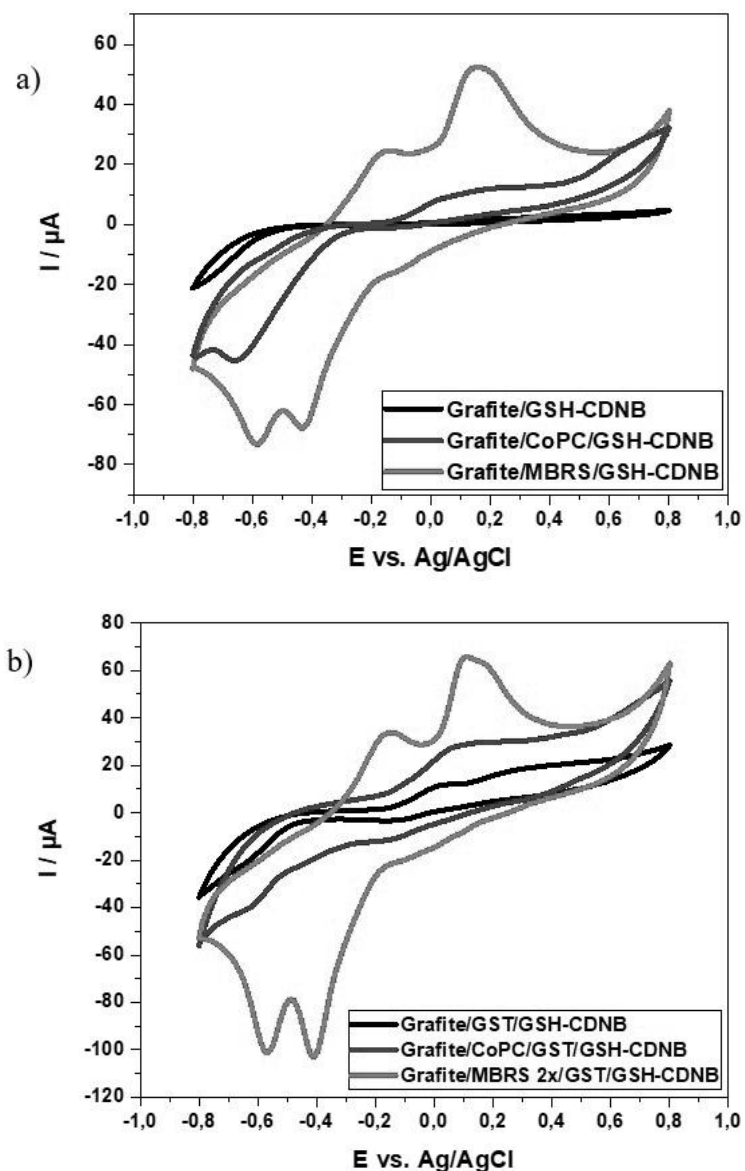


Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono (grafite) sem mediador, com mediadores (CoPC e MBRS) sem enzima (GST) (a) e com enzima (b) em substrato enzimático (GSH $7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e CDNB $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A análise em solução com substrato (Figura 24) demonstrou diferenças significativas no perfil dos eletrodos, quanto ao aumento de corrente, principalmente em relação aos modificados com MBRS. Nestes, é notória a ampliação do segundo pico anódico com deslocamento de potencial de trabalho para próximo de 200 mV s⁻¹, onde o biossensor (Figura 24b) atingiu maior pico de corrente (66 μA) em comparação ao sensor (52 μA) (Figura 24a). Este resultado evidencia tanto a interação e a influência do meio reacional, como o favorecimento do sistema pela mediação. Com isso considera-se que o emprego do eletrodo com mediador MBRS com duas camadas é mais conveniente para ser utilizado na proposta desta pesquisa. Esta escolha foi semelhante à realizada por Costa (2021) que testou biossensores a base de acetilcolinesterase, modificados com CoPC e MBRS com uma camada e com duas camadas, sendo que o eletrodo de trabalho com este último mediador apresentou o melhor resultado. De acordo com Marques *et al.* (2010) Meldola blue é um corante catiônico que atua mediando os processos redox do meio, regenerando o sítio catalítico da enzima imobilizada o que faz com que o biossensor seja mais versátil.

Em seguida, passou-se a realizar ensaios por cronoamperometria, onde foram comparados dois tempos de análise, 30 e 60s, e verificou-se que para o segundo tempo, houve uma maior estabilidade da corrente elétrica gerada, fixando-se assim 60s como o tempo padrão para a realização das medidas cronoamperométricas seguintes.

Na sequência, foram realizadas análises, para a confirmação do potencial de trabalho a ser aplicado com o biossensor, cujos os resultados estão representados na Figura 25. Foram avaliados os potenciais 100, 200 e 250 mV s⁻¹.

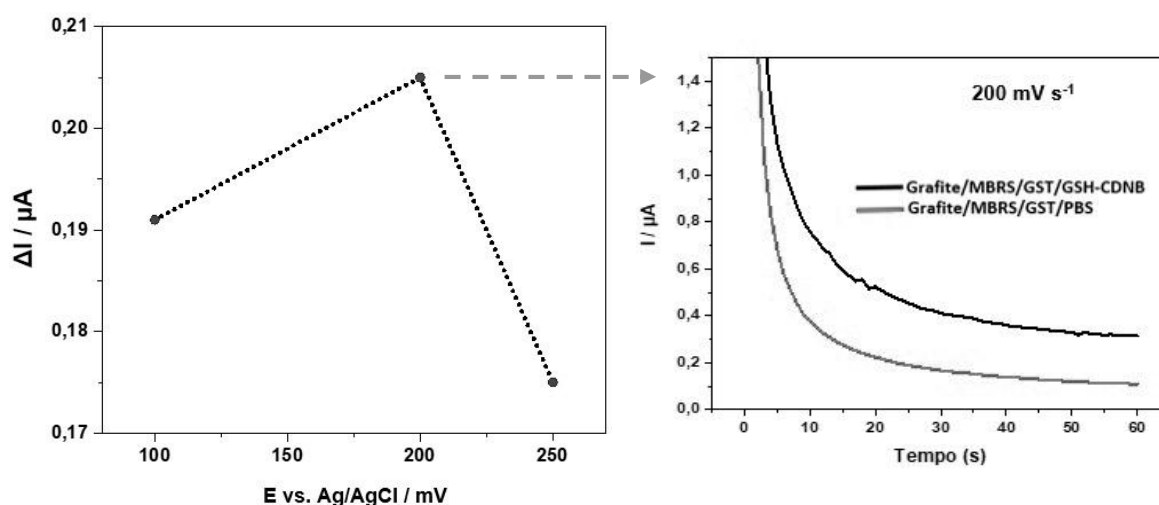


Figura 25 – Análise do potencial de trabalho cronoamperométrico.

Constatou-se que o potencial de trabalho em 200 mV s⁻¹ se mostrou mais conveniente ao processo enzimático em análise, tendo em vista que apresentou melhor diferença no sinal de corrente entre a solução tampão fosfato e a solução contendo o substrato enzimático (GSH-CDNB). Este resultado foi diferente em comparação ao estudo realizado por (BORAH *et al.*, 2018), que analisou a inibição da GST com pesticidas organotiofosfato, em que foi utilizado potencial de trabalho de 300 mV s⁻¹. No entanto, outros trabalhos ressaltam que o emprego de valores menores de potencial de trabalho é mais adequado, uma vez que suprimem a influência por outros componentes da matriz (MENDONÇA *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2008).

6.8 Princípio da Inibição Enzimática

A determinação do efeito dos pesticidas piretroides aplicando este biossensor é baseada na inibição gerada sobre a atividade da enzima GST, imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho. Na presença de tais pesticidas, a enzima terá sua ação catalítica afetada, reduzindo a intensidade de corrente elétrica, a um potencial fixo, conforme está representado na Figura 26.

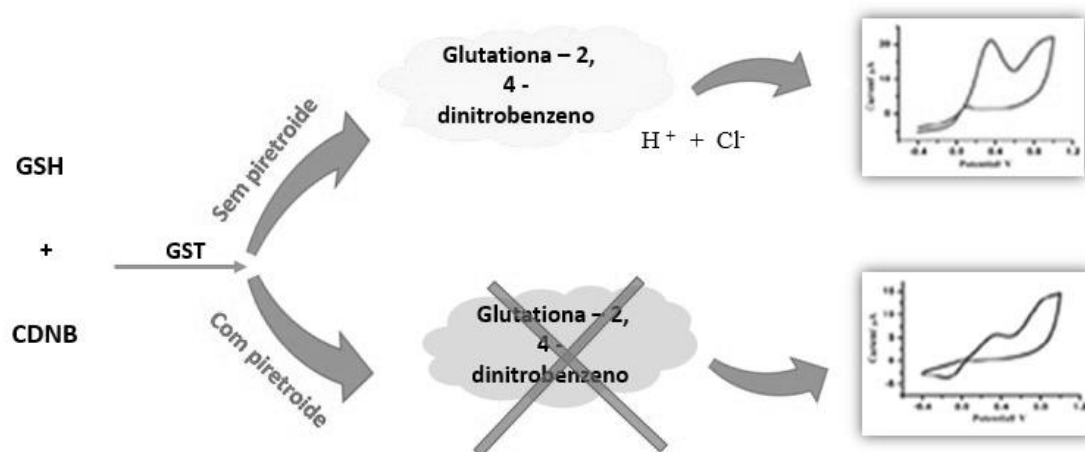
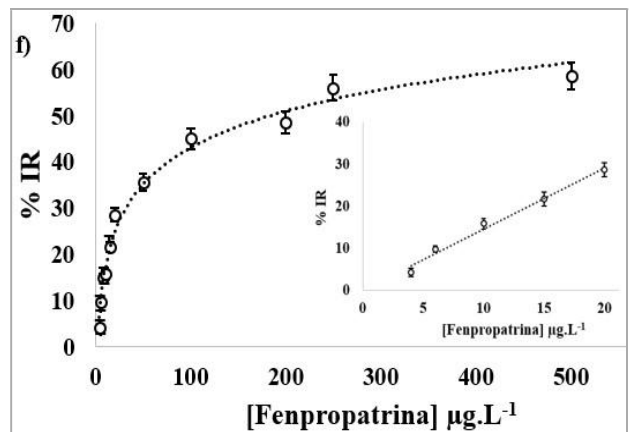
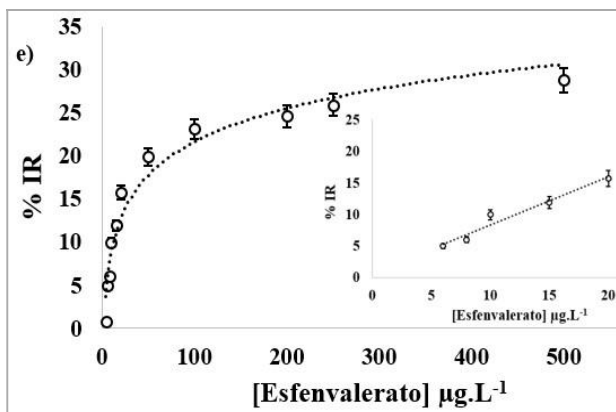
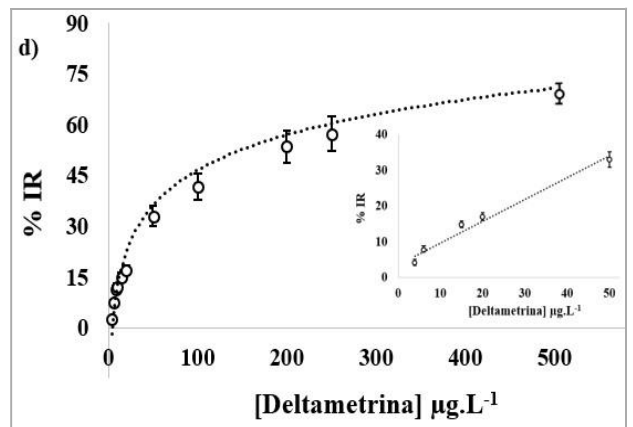
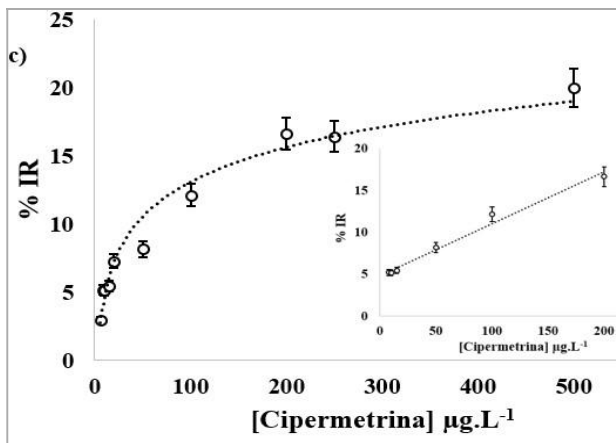
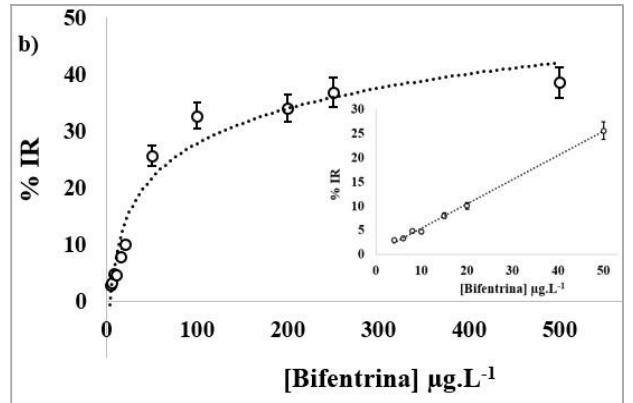
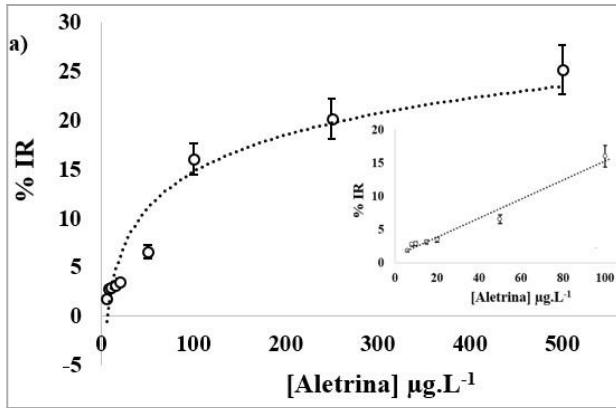


Figura 26 - Reação da enzima GST monitorada pelo biossensor eletroquímico.
 Fonte: O autor (adaptado de BORAH *et al.*, 2018).

6.9 Avaliação Eletroquímica do Efeito Inibitório de Pesticidas Piretroides

Os ensaios eletroquímicos de inibição foram realizados através de medidas cronoamperométricas, com o registro dos valores de corrente antes e após a inibição causada pelos pesticidas. Com base nessas observações, foram construídas curvas, onde

foram plotados os percentuais de inibição em função da concentração dos inseticidas piretroides (Figura 27). Por consequência, houve a diminuição do sinal de corrente conforme aumentou-se a quantidade do composto inibidor, apresentando percentuais crescentes de inibição.



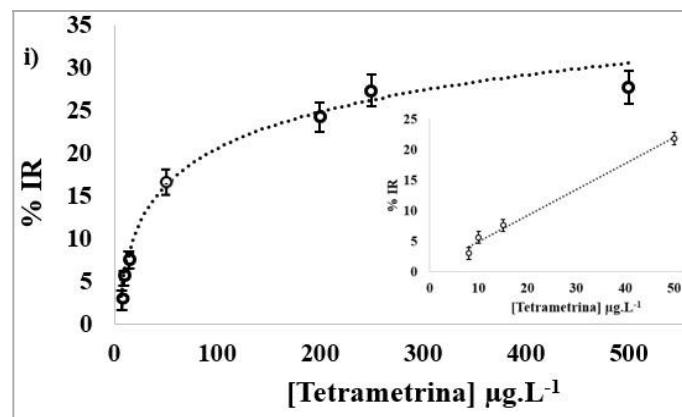
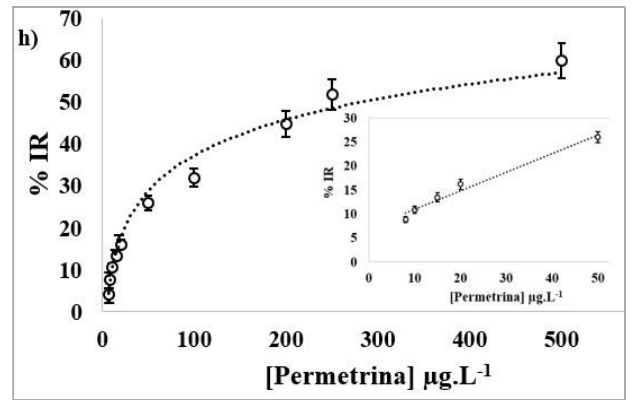
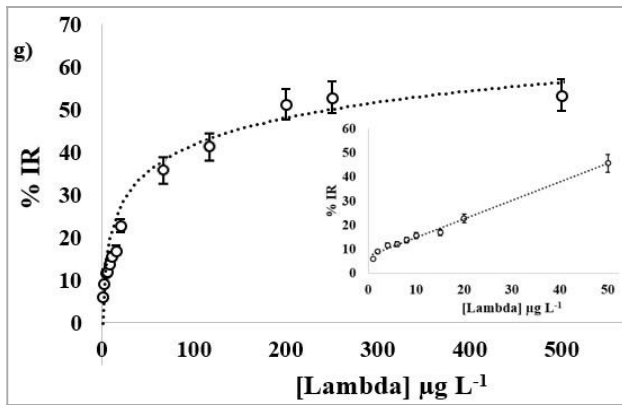


Figura 27 - Curvas de inibição para os nove pesticidas em estudo, obtidas por ensaios cronoamperométricos, destacando-se a faixa linear.

As curvas analíticas iniciais de inibição apresentaram correlação não linear, com perfil logarítmico, conforme mostra a Figura 27. As regiões lineares foram destacadas e apresentadas na Tabela 19, assim como os respectivos limites de detecção (LD's) que foram determinados com base em um valor mínimo de 10% de inibição relativa (NUNES *et al.*, 2014). Pode-se observar que o biossensor apresentou maior sensibilidade para os compostos lambda-cialotrina, fenpropatrina e permetrina, considerando que para estes inseticidas foram encontrados os menores limites de detecção.

Tabela 19 - Dados analíticos referentes ao biossensor em termos de equação da reta, faixa de linearidade e limites de detecção, obtidos por cronoamperometria

Pesticida	Equação da reta	R ²	Faixa Linear (µg.L ⁻¹)	LD (µg.L ⁻¹)
Aletrina	$y = 0,1433 x + 0,9291$	0,97	6 a 100	63,30 ^a
Bifentrina	$y = 0,4997 x + 0,4089$	0,99	4 a 50	19,19 ^b
Cipermetrina	$y = 0,0617 x + 4,8450$	0,98	8 a 200	83,54 ^c
Deltametrina	$y = 0,6127 x + 3,3989$	0,97	4 a 50	10,77 ^b
Esfenvalerato	$y = 0,7572 x + 0,7743$	0,96	6 a 20	12,18 ^b
Fenpropatrina	$y = 1,4543 x + 0,0406$	0,98	4 a 20	6,91 ^b
Lambda-cialotrina	$y = 0,7682 x + 7,1387$	0,99	1 a 50	3,72 ^d
Permetrina	$y = 0,3876 x + 7,0931$	0,98	8 a 50	7,49 ^b
Tetrametrina	$y = 0,4249 x + 0,6823$	0,99	8 a 50	21,93 ^e

Valores de LD com mesma letra, na vertical, não diferem significativamente entre si, no nível de 95% de probabilidade, pelo teste t de Student não pareado.

Em comparação com estudos que utilizaram outras enzimas e a enzima GST de fígado equino para a detecção de diversos pesticidas, o presente biossensor se mostrou mais sensível nos limites de detecção para a maioria dos compostos piretroides aqui analisados, como pode-se verificar nos dados na Tabela 20.

Tabela 20 - Dados sobre o desempenho de biossensores relatados na literatura e do presente estudo

Pesticida	Método de detecção	LD (µg.L ⁻¹)	Referência
Carbendazim		2	
Clorpirifós		60	
DDT (dicloro-difenil-tricloroetano)	Glutaciona S-transferase imobilizada em eletrodo de platina usando matriz de óxido de grafeno-gelatina	40	(BORAH <i>et al.</i> , 2018)
Dinocap		50	
Etion		100	
Molinato	Glutaciona S-transferase em eletrodo carbono vítreo	64	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013b)
Fenobucarb	Glutaciona S-transferase imobilizada em	2	(BORAH <i>et al.</i> , 2017)

Temefós	eletrodo de platina como contra eletrodo e	4	
Dimetoato	Ag / AgCl como o eletrodo de referência	5	
Fenitroion	Tirosinase imobilizada em eletrodo de grafite poli (2-hidroxibenzamida)	4,7	(FÁTIMA <i>et al.</i> , 2019)
Captan	Glutaciona S-transferase em eletrodo de ouro modificado por SAM (monocamada automontada) de APTES (3-aminopropil) trietoxissilano)	1000	(SINGH <i>et al.</i> , 2009)
Cipermetrina		83,54	
Aletrina		63,30	
Tetrametrina		21,93	
Bifentrina	Glutaciona S-transferase imobilizada em	19,19	
Esfenvalerato	eletrodo de trabalho modificado com	12,18	Este estudo
Deltametrina	MBRS	10,77	
Permetrina		7,49	
Fenpropratrina		6,91	
Lambda-cialotrina		3,72	

De acordo com o Ministério da Saúde, que dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano, em se tratando de substâncias químicas, que representam risco à saúde, consta somente o Valor Máximo Permitido (VMP) para o piretroide permetrina de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em água potável. Para as categorias de corpos hídricos, o Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA não definiu os limites aceitáveis para essa classe de pesticidas, o que dificulta o controle sobre o lançamento dessas substâncias químicas nesses ambientes e os efeitos sobre os organismos aquáticos. No entanto, destaca-se que 33% dos limites de detecção encontrados no presente estudo estão abaixo dos Limites Máximo de Resíduos (LMRs) de piretroides, permitidos para diversas culturas agrícolas no Brasil, e 66% estão dentro da faixa de detecção conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Tabela 21). Não foram localizados os valores de LMR para os ingredientes ativos: aletrina e tetrametrina, o que é considerado preocupante tendo em vista a segurança alimentar. De acordo com dados de 2014 e 2018 da ANVISA a presença do composto aletrina foi encontrada em amostras de pimentão e de feijão.

A Tabela 21 também mostra os valores de ingestão diária aceitável-IDA, que corresponde a quantidade de uma substância em mg.kg^{-1} p.c., que pode ser ingerida

diariamente em proporção ao peso corpóreo, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável para a saúde humana (CALDAS, 2000; MEIRA e SILVA, 2019). Todavia, isso exige um eficiente controle de qualidade quanto a presença de resíduos de pesticidas, em produtos agrícolas consumidos pela população.

Tabela 21 - Limites máximos de resíduos (LMR) de piretroides e os parâmetros sobre a Ingestão diária aceitável (IDA)

Ingrediente ativo	LMR (mg.kg⁻¹)	IDA (mg.kg⁻¹ p.c.)
Aletrina	-	-
Bifentrina	0,01 a 1,0	0,02
Cipermetrina	0,01 a 1,0	0,05
Deltametrina	0,01 a 1,0	0,01
Esfenvalerato	0,01 a 1,0	0,02
Fenpropatrina	0,01 a 2,0	0,03
Lambda-cialotrina	0,01 a 2,0	0,05
Permetrina	0,01 a 0,5	0,05
Tetrametrina	-	-

Fonte: O autor (elaborado a partir de dados da ANVISA).

A Tabela 22 apresenta o resumo das condições operacionais utilizadas nos ensaios cronoamperométricos do presente estudo para o desenvolvimento do biossensor.

Tabela 22 - Condições operacionais do biossensor desenvolvido para detecção de inseticidas piretroides

Enzima	Glutationa S-transferase
Concentração do Substrato	GSH 7,0 mmol.L ⁻¹ CDNB 0,2 mmol.L ⁻¹
Carga de enzima	0,18 mU/Eletrodo
Método de imobilização	Ligação cruzada com glutaraldeído
Agente de imobilização	Glutaraldeído / BSA

Potencial de trabalho fixo	200 mV s ⁻¹ versus Ag / AgCl
Tempo de corrida cronoamperométrica	60s
Tempo de inibição com o pesticida ou a amostra de água	10 min
Tipo de sensor	Sensor serigrafado de três eletrodos: de referência (Ag/AgCl); auxiliar (grafite) e de trabalho (grafite, modificado com MBRs)

Na ocasião, é importante destacar que o custo de produção dos biossensores, em escala de laboratório, é estimado em torno de dois a três dólares, considerando-se que as quantidades de reagentes, pastas de grafite, Ag/AgCl, mediador eletroquímico, tinta e a enzima GST (na etapa de imobilização) utilizadas, são pequenas. No entanto, é necessário o emprego de máquina de impressão semiautomática para fabricação dos eletrodos, onde 24 unidades são impressas por vez, em tela de PVC (10,5 x 20 cm). Esse baixo custo de produção indica que este é um processo economicamente viável e pode ser testado em nível industrial e tornar-se um produto de mercado.

Com isso, o presente estudo gerou o depósito de uma patente de invenção referente ao biossensor eletroquímico acima citado, o qual foi realizado em 18 de novembro de 2021, conforme número do Processo BR1020210231513 protocolado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI.

6.10 Aplicação de Biossensor a Base de GST para Detecção de Piretroides em Águas Superficiais

Para se fazer a determinação se a amostra estaria ou não contaminada, foi considerado o limite de detecção de 10%. Assim, resultados acima desse limite podem ser considerados contaminados. A Figura 28 mostra os valores de inibição da GST, os quais foram determinados mediante uso de biossensores em amostras de água coletadas no Rio Bacanga, conforme mostra a distribuição dos pontos no mapa (Figura 29).

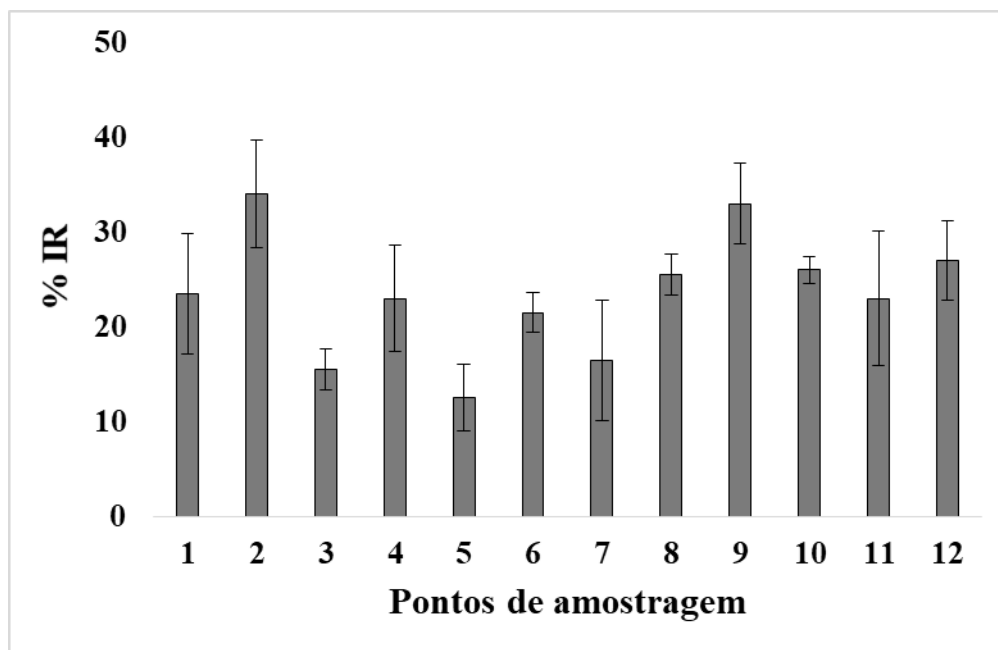


Figura 28 - Valores percentuais de Inibição Relativa – IR referente a detecção de pesticidas, utilizando biossensor baseado na GST, em amostras de água coletadas em diferentes pontos do Rio Bacanga, em São Luís, MA.

Observou-se que todas as amostras analisadas apresentaram inibição relativa, em relação a atividade enzimática, as quais variaram de 12 % a 34 %. Estes percentuais estão dentro do limite de detecção do biossensor aqui desenvolvido para investigação de piretroides. Em estudo anterior realizado na mesma região da presente pesquisa, onde foi utilizado um biossensor eletroquímico à base da enzima acetilcolinesterase, verificou-se uma inibição de 50% da atividade enzimática em 14% dos pontos amostrados o que foi relacionado a presença de pesticidas na água (SOUTO, 2016). Em levantamento realizado em polos de produção agrícola na Ilha de São Luís (MA), verificou-se que os inseticidas piretroides (cipermetrina e deltametrina), correspondem a segunda classe de agrotóxicos mais utilizada pelos produtores rurais (SANTOS *et al.*, 2012a).

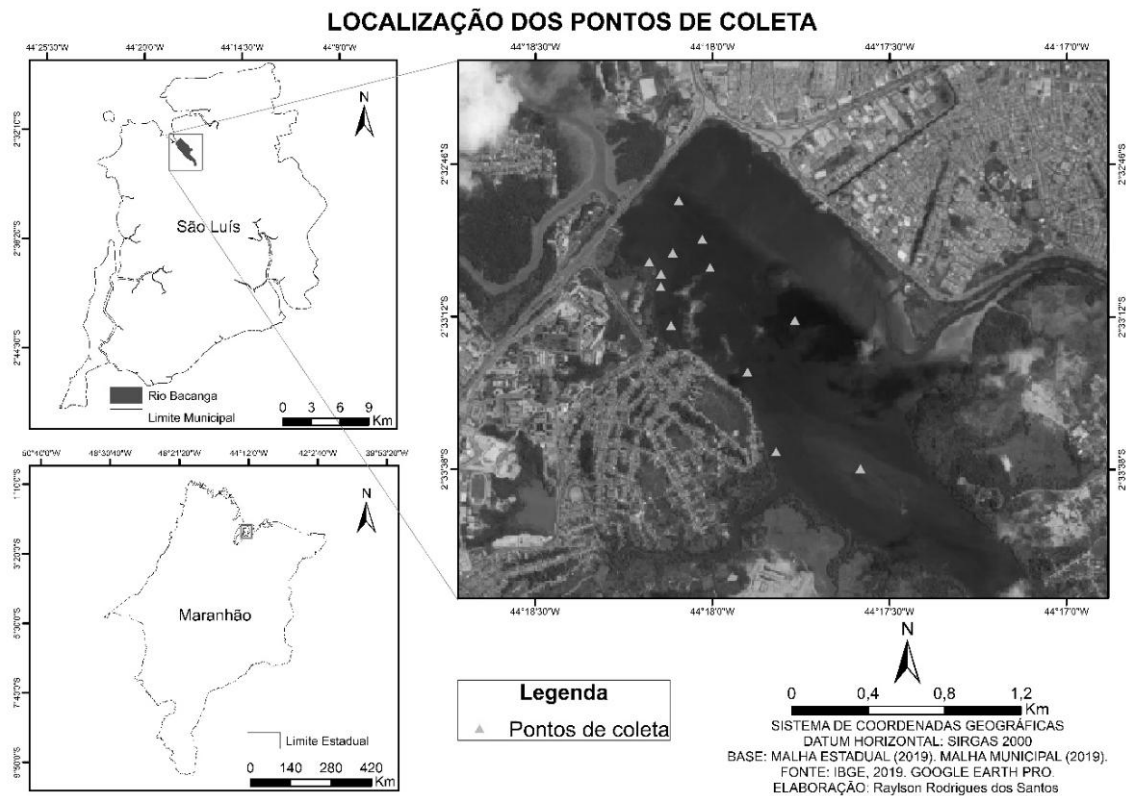


Figura 29 - Mapa da área de coleta das amostras de água em diferentes pontos do Rio Bacanga, São Luís, MA.

De acordo com a literatura, uma vez que os pesticidas são aplicados, podem atingir os corpos hídricos por meio de processos como a lixiviação, escoamento superficial e volatilização. As duas últimas formas estão mais relacionadas a contaminação de águas superficiais (como rios e lagos). Na volatilização, os pesticidas podem ser carregados através da atmosfera (por longas distâncias) e, posteriormente, através das chuvas, serem depositados sobre o manancial (GAMA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2007). Em estudo realizado para analisar águas provenientes de chuvas, em dois municípios do estado do Mato Grosso, os resultados mostraram a presença de resíduos de diferentes agrotóxicos, em mais da metade das amostras coletadas, evidenciando o risco de contaminação para além das áreas de plantio (MOREIRA *et al.*, 2012). No escoamento superficial, o carregamento desses compostos ocorre através da água de enxurradas na superfície do solo, o que poderá ocasionar a contaminação das águas de superfície (GAMA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Tais processos de transportes, podem está influenciando a contaminação da área em estudo, justificando assim os resultados de inibição enzimática encontrados. Além disso, é importante frisar que a estação do ano em que a amostragem foi realizada,

corresponde ao período chuvoso. Período este, considerado como o mais provável de ocorrer a contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos, em decorrência do aumento de pragas, e da aplicação pelos agricultores, de uma nova quantidade de inseticida a cada chuva mais intensa (VEIGA *et al.*, 2006). Com isso pode-se encontrar quantidades elevadas de resíduos desses compostos, devido a sua aplicação nos sistemas agrícolas (SANTOS *et al.*, 2012a).

É importante destacar também, que a área de coleta em questão, está inserida em um contexto com diversas interfaces, descritas a seguir. Áreas com grande adensamento urbano, zona residencial (construções de taipa e tijolo), áreas com grande fluxo superficial e com grande impermeabilidade do solo. Na região também possui bairros com pouca ou nenhuma infraestrutura, desprovidos de rede de esgoto e asfalto, caracterizados por vilas ou invasões. Além de área com vegetação densa, área de manguezal e áreas estuarinas com fluxo das marés (PEREIRA *et al.*, 2018).

Áreas cujo o uso e a ocupação ocorreram de forma desordenada, podem acarretar impactos negativos para os ecossistemas hídricos superficiais adjacentes causando a contaminação por meio de despejos residenciais e industriais no ambiente (ZABOTTO, 2019). Tais ações podem afetar a qualidade (química e sanitária) da água, causar a deterioração do manancial, gerar prejuízos aos organismos aquáticos e à saúde humana (TANIGUCHI, 2019).

6.11 Análise da Estabilidade do Biossensor

Para analisar a estabilidade do dispositivo, foram realizadas medidas cronoamperométricas utilizando biossensores diferentes e o mesmo biossensor com a GST imobilizada, em meio contendo substrato enzimático. Os dados obtidos foram utilizados na construção de gráficos ou cartas de controle. Esta ferramenta foi utilizada para avaliar se o processo em questão foi operado em controle estatístico, considerando os limites superiores e inferiores de ação e de advertência. Estudos destacam a necessidade de adoção de estratégias eficazes, como as cartas de controle, para monitorar a qualidade de determinado processo, ao longo do tempo, visando detectar variações fora do padrão (BECKER *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021).

As cartas de controle, mostram no eixo y, os valores médios de corrente, gerados a partir de medidas em triplicata, realizadas nas mesmas condições operacionais. E no

eixo x, a quantidade de medidas. As linhas horizontais representam: a intensidade de corrente média; os limites superiores e inferiores de ação (média do sinal de corrente \pm três vezes o desvio padrão) e de advertência (média do sinal de corrente \pm duas vezes o desvio padrão).

Na análise do método, o processo será considerado estatisticamente fora de controle, se dois ou mais resultados, sequencialmente, ultrapassarem uma das linhas de advertência, ou se um único resultado ultrapassar uma das linhas de (BECKER *et al.*, 2019a). Com base nesses critérios, o processo aqui desenvolvido atendeu os limites estabelecidos, conforme mostra a Figura 30, mantendo-se dentro dos parâmetros de controle estatístico, mostrando boa reprodutibilidade com os diferentes biossensores (n=10) confeccionados no mesmo dia, cujo coeficiente de variação (CV) foi 7,1 %.

Este resultado foi considerado satisfatório, se comparado com outro trabalho que desenvolveu biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamato (maneb e zineb), o qual obteve os seguintes dados: CV de 7,4% e 5,8%, respectivamente, para ensaios com sensores diferentes, confeccionados em dias diferentes e no mesmo dia (LIMA *et al.*, 2007).

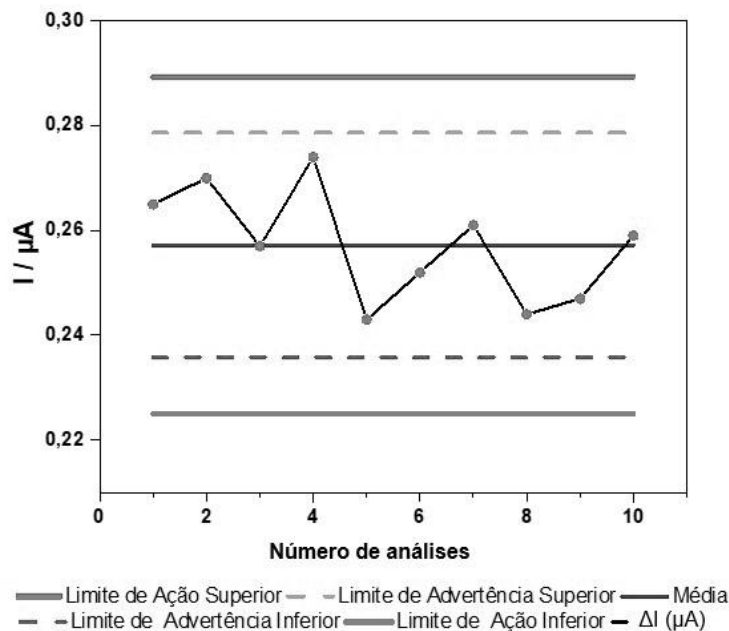


Figura 30 - Gráfico de controle estatístico para monitoramento da reprodutibilidade de 10 biossensores com mediador MBRS, à base de GST.

O gráfico de controle na Figura 31 mostra os resultados sobre o monitoramento da estabilidade, a qual foi avaliada com o mesmo biossensor por um período de 22

semanas (mantido em refrigeração a 4 °C), onde verificou-se a corrente inicial de 268 nA, e até a quarta semana, houve redução de 15 % dessa medida. Após esse período, observou-se gradativa perda da atividade enzimática ao longo do tempo com redução do sinal amperométrico próximo a 60 % da medida inicial. De acordo com a literatura, o decaimento de sinal eletroquímico pode ocorrer devido à desnaturação ou lixiviação da enzima e além de possível adsorção dos produtos da reação, bloqueando o acesso ao substrato (MATERON *et al.*, 2014).

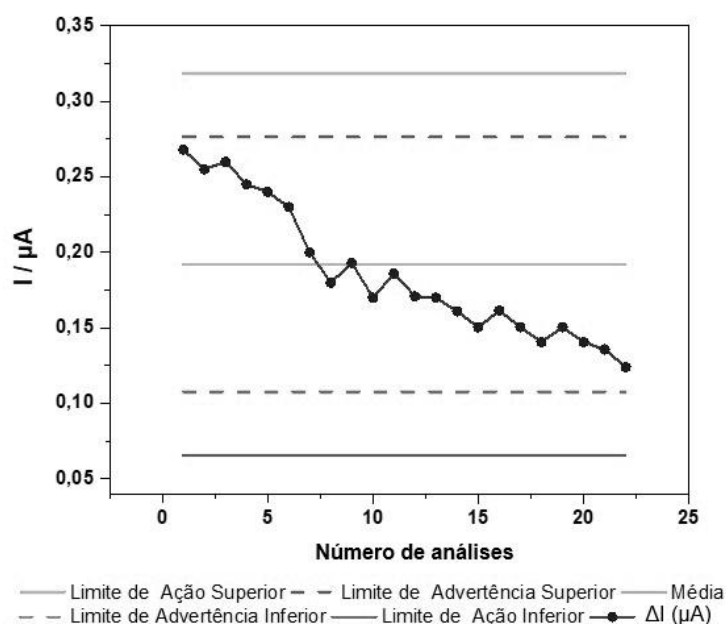


Figura 31 - Gráfico de controle estatístico para monitoramento da estabilidade do mesmo biossensor com mediador MBRS, à base de GST.

De todo modo, mesmo com as variações decorridas ao longo do período de avaliação, o biossensor aqui desenvolvido não extrapolou uma única vez nenhuma das linhas de advertência ou de ação, se apresentando estatisticamente dentro de controle durante o período registrado.

Outros estudos também realizaram o monitoramento da estabilidade dos biossensores desenvolvidos. Lima *et al.* (2007) construíram biossensores com MBRS, baseados na enzima aldeído desidrogenase, os quais se mostraram estáveis por até seis meses, com apenas 12% de redução do sinal eletroquímico. Costa (2021), fez uso de carta de controle para avaliação de biossensores com MBRS, a base de acetilcolinesterase para detecção de pesticidas organofosforados, e verificou estabilidade do dispositivo em um tempo máximo de doze semanas.

Ribeiro *et al.* (2021a), também observaram por meio de gráfico de controle, que o biossensor modificado com o mediador azul da prússia, baseado na enzima xantina oxidase, mostrou-se estatisticamente estável por um período de sete meses. Materon *et al.* (2014) que utilizou biossensor baseado em GST para detecção de drogas anticâncer, observou uma redução de aproximadamente 50% do sinal eletroquímico até o décimo quinto dia de análise.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A proposta deste estudo foi realizada com êxito, tendo em vista que foi desenvolvido um dispositivo eletroquímico, suficientemente sensível para a detecção de inseticidas piretroides, baseado no princípio de inibição da glutathione S-transferase. Este biossensor amperométrico utilizou eletrodo de trabalho contendo grafite e o mediador eletroquímico azul de Meldola com sal de Reinecke.

Os resultados indicaram que este sistema eletroquímico é adequado para aplicação em análise de amostras de alimentos (frutas e vegetais), tendo em vista que apresentou capacidade de detecção de concentrações de inseticidas piretroides, dentro da faixa de valores estabelecidos pelo órgão oficial do governo brasileiro. Assim como, também pode ser aplicado para análise de água considerando que foi capaz de detectar para a maioria dos inseticidas piretroides estudados, concentrações inferiores a $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (VMP para permetrina em água potável no Brasil).

A aplicação do biossensor diretamente em águas naturais do Rio Bacanga, apresentou resposta inibitória para todas as amostras testadas, sugerindo que pode estar ocorrendo na região, contaminação por inseticidas piretroides.

O dispositivo aqui desenvolvido apresentou características relevantes, tais como sensibilidade adequada, baixo custo para o seu desenvolvimento, simplificado processo de construção e manuseio, além de apresentarem boa reprodutibilidade e estabilidade ao longo do tempo de análise.

Foram fundamentais as etapas de trabalho executadas anteriormente à elaboração deste biossensor, considerando que os resultados gradualmente nortearam o progresso desta pesquisa. Assim, ressalta-se que a avaliação quanto ao destino no ambiente, indicou que os inseticidas podem se fixar principalmente às partículas do solo, sedimento e através do escoamento superficial, podem atingir o meio aquático (águas de superfície). Uma vez nesse ambiente, podem se depositar na região de fundo, entrar em contato com as espécies bentônicas e assim promover processo de bioacumulação, colocando em risco à saúde humana, seja pela alimentação, como pelo consumo da água.

Todos os ingredientes ativos piretroides investigados através de docagem molecular, demonstraram afinidade de ligação com o sítio ativo da enzima GST, e potencial inibitório sobre sua atividade catalítica, o que foi confirmado por análises *in*

vitro, as quais são mais sensíveis para avaliar a capacidade de interação enzima-inibidor.

Os resultados cinéticos através de espectrofotometria indicaram que os inseticidas piretroides afetam a GST, reduzindo a sua atividade catalítica, principalmente o composto deltametrina, que apresentou maior potencial inibitório. Os compostos foram analisados através dos valores K_i e IC_{50} , utilizando-se o CDNB como substrato principal. Acrescenta-se que apesar de pertencerem a mesma classe química, exibiram mecanismos de inibição enzimática diferentes entre si (competitivo e misto).

Por fim, considera-se que associação das metodologias *in silico* e *in vitro* (espectrofotometria e eletroquímica) aqui empregadas, constituíram uma importante estratégia para a realização desta pesquisa, e a obtenção dos dados resultantes, tendo em vista que o protótipo elaborado pode auxiliar no monitoramento e controle ambiental de agroquímicos piretroides. Ressalta-se também que o presente estudo gerou publicações de dados iniciais em revistas científicas e outros artigos foram submetidos para revistas nacionais e internacionais e aguardam parecer. Uma patente de inovação foi gerada como produto da presente Tese e depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, antes mesmo da data de defesa deste estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

ABOUZIENA, H. F.; HAGGAG, W. M. Métodos alternativos de controle não químicos de plantas daninhas: Uma revisão. **Planta Daninha**, v. 34, n. 2, p. 377–392, 2016.

AHN, K. C. et al. Immunoassays and Biosensors for monitoring environmental and human exposure to pyrethroid insecticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2792–2802, 13 abr. 2010.

ALONSO, M. B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? **Environment International**, v. 47, p. 99–106, 2012.

ALVES, S. R.; OLIVEIRA-SILVA, J. J. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. **É Veneno Ou É Remédio?: Agrotóxicos, Saúde E Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 137–156, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de ingredientes ativos de uso autorizado no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>>. Acesso em: 4 jul. 2021.

ARAÚJO, W. L. **Toxicidade de inseticidas sobre abelhas sem ferrão. 2019. 73 f. Tese (Doutorado em Agronomia)** - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2019.

ARDUINI, F. et al. Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, n. October 2018, p. 346–354, 2019.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

ARRUDA, I. G. **Biossensores amperométricos fabricados a partir de eletrodos enzimáticos de polifenol oxidase para a detecção de pesticidas. 2016. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências)** - Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de São Carlos, 2016.

ASAL, M. et al. Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 6, 2018.

AYAT, M. et al. Porous silicon-modified electrode for electrochemical pesticide biosensor. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 18, n. 1, p. 53–62, 2021.

AZEVEDO-JUNIOR, W. F. **Bioinformática aplicada ao desenvolvimento de fármacos**. Rio Grande do Sul: Pontifícia Universidade Católica, 2015.

BALCI, N. et al. Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. 1–18, abr. 2019.

BARROCAS, P. R. G. et al. Biosensors to monitor the exposition to environmental pollutants. **Cad. Saúde Colet.**, v. 16, n. 4, p. 677–700, 2008.

BECKER, M. M. et al. Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. **Talanta**, v. 204, n. June, p. 626–632, 2019.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. Molegro Virtual Docker for Docking. In: AZEVEDO JUNIOR, W. F. (Ed.). **Docking Screens for Drug Discovery**. Humana Press, New York, 2019. v. 2053p. 149–167.

BITTENCOURT-JUNIOR, F. F.; SOARES, É. R. Uma revisão sobre pesticidas:

mecanismos de ação, consequências socio-ambientais e estratégias para mitigação. **Interbio**, v. 7, n. 2, p. 14–22, 2013.

BLASQUES, R. V. et al. Synthesis and characterization of a new ceramic nanomaterial SiO₂/NPsSm₂O₃/C-graphite for the development of electrochemical sensors. **Materials Chemistry and Physics**, v. 243, n. June 2019, 2020.

BOARD, P. G. et al. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Biochem. J**, v. 328, p. 929–935, 1997.

BORAH, H. et al. Glutathione-S -transferase-catalyzed reaction of glutathione for electrochemical biosensing of temephos, fenobucarb and dimethoate. **Analytical Methods**, v. 9, n. 27, p. 4044–4051, 2017.

BORAH, H. et al. A broad spectrum amperometric pesticide biosensor based on glutathione S-transferase immobilized on graphene oxide-gelatin matrix. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 828, n. September, p. 116–123, 2018.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

BRADBERRY, S. M. et al. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93–106, 2005.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982–1986, 2008.

CALDAS, E. D. *Revista de Saúde Pública Journal of Public Health*. v. 34, n. 5, 2000.

CALDEIRA, N. Z. et al. Uso de inseticidas piretroides: conhecimento, atitude e prática. **FIEP BULLETIN**, v. 84, n. d, p. 2012–2014, 2014.

ÇALISKAN, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S. V. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 117–120, 2003.

CARVALHO NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione s-transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 217–225, 2013.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014a.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: Uma Revisão De Suas Consequências Para a Saúde Pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014b.

CHEN, S. et al. Fenprothrin Biodegradation Pathway in *Bacillus* sp. DG-02 and Its Potential for Bioremediation of Pyrethroid-Contaminated Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2147–2157, 12 mar. 2014.

CHIKEZIE, P. C. Glutathione S-transferase Activity in Diagnostic Pathology. **Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development**, v. 05, n. 04, 2015.

CHMIEL, J. A. et al. Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for Probiotics as Mediators of Environmental Stress. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, n. February, p. 1–19, 2020.

CHRUSTEK, A. et al. Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. **Medicina (Lithuania)**, v. 54, n. 4, p. 1–15, 2018.

COLOSIO, C.; RUBINO, F. M.; MORETTO, A. Pesticidas. In: STELLA R. QUAH (Ed.). **International Encyclopedia of Public Health**. Academic Press, 2017. p. 454–462.

CONAMA-CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Conama Nº 357, de 17 de março de 2005* (Retificada pelas resoluções nº 393/2007, nº 397/2008, nº 410/2009 e nº 430/2011)**.

COSTA, A. R. C. **Deteccção de pesticidas na atmosfera da pré-amazônia aaranhense: uso de biossensores acoplados a drones. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química)** - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

CUNHA, F. DOS S. **Efeitos tóxicos de inseticidas piretróides sobre o peixe tambaqui (Colossoma macropomum). 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)** - Universidade Tiradentes, Sergipe, 2014.

CUNHA, F. DOS S. et al. Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 15, p. 15102–15110, 2018.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, dez. 2014.

DUAVÍ, W. C. et al. Contaminação de ambientes aquáticos por “Agrotóxicos urbanos”: O caso dos rios cocó e ceará, Fortaleza - Ceará, Brasil. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 622–630, 2015.

DZOYEM, J. P.; KUETE, V.; ELOFF, J. N. **Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data Interpretation, and Use in Plant Screenings**. Elsevier Inc., 2014.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical evaluation of glutathione S-transferase kinetic parameters. **Bioelectrochemistry**, v. 101, p. 46–51, 2015.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Pyrethrins and Pyrethroids Reregistration and Labeling This page includes information**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/pyrethrins-and-pyrethroids-reregistration-and-labeling>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

ERVILHA, I. C. **Relatório : vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos no Estado do Maranhão**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/08/Relat--rio-Maranh--o.pdf>>.

FÁTIMA, M. DE et al. Sensor eletroquímico enzimático de fenitroton baseado em um eletrodo de grafite modificado com tirosinase / poli (2-hidroxibenzamida). p. 1–19, 2019.

FELIX, F. F.; NAVICKIENE, S.; DÓREA, H. S. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) como Indicadores da Qualidade dos Solos. **Revista da Fapese**, v. 3, n. 2, p. 39–62, 2007.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição o processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 69–78, 2009.

FERRACINI, V. L. et al. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (Pe) e Juazeiro (Ba). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 1–16, 2001.

FIGUEIREDO, A. C. P. **Piretróides: uma nova geração de inseticidas. 2014. 33 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de

Ciências e Tecnologias da Saúde - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Humani nihil alienum, Lisboa, 2014.

FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. DA S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 99–104, abr. 2008.

GAJENDIRAN, A.; ABRAHAM, J. An overview of pyrethroid insecticides. **Frontiers in Biology**, v. 13, n. 2, p. 79–90, 2018.

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 462–467, 2013.

GAN, J. et al. Distribution and Persistence of Pyrethroids in Runoff Sediments. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, n. 3, p. 836–841, 2005.

GARCIA, M. et al. The effects of the insecticide lambda-Cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* under experimental conditions of tropical and temperate regions. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 2, p. 398–400, 2011.

GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 2285–2288, 2009.

GOSS, D. W. . Screening Procedure for Soils and Pesticides for Potential Water Quality Impacts. **Weed Science Society of America**, v. 6, n. 3, p. 701–708, 1992.

GUARDA, P. M. et al. Avaliação da contaminação por pesticidas nos sedimento do Rio Formoso no Estado do Tocantins. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. Especial, p. 123–135, 30 out. 2020.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N.; CANNON, P. L. Electrochemical determination of organophosphorous compounds. **Analytical Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 1437–1439, 1962.

GÜLLER, P. et al. Investigation of Some Pesticides' Effects on Activities of Glutathione Reductase and Glutathione S-Transferase Purified from Turkey Liver under in Vitro Conditions. **Journal of the Institute of Science and Technology**, v. 8, n. September 2011, p. 211–217, 2018.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 339–357, abr. 1989.

GUTÉS, A. et al. Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidaseamperometric biosensor and artificial neural network analysis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 1, p. 1668–1673, 2005.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 6, p. 10432–10453, 2014.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione s-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part i. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–520, 1995.

HINTZEN, E. P.; LYDY, M. J.; BELDEN, J. B. Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 110–116, 2009.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

IVANOV, Y.; GODJEVARGOVA, T. Immunochemical Assays for determination of organophosphorus pesticides in milk. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1–5, 2019.

JAVED, M. et al. Review on exposure, absorption and elimination of pyrethroids in humans. **Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS**, v. 180, n. 35, p. 180–184, 2015.

KIM, Y. et al. Omega class glutathione s-transferase: Antioxidant enzyme in pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

LEE, J. H. et al. A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents. **Biosensors & bioelectronics**, v. 25, n. 7, p. 1566–1570, 15 mar. 2010.

LI, H. et al. Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 258–271, 2017.

LIMA, E. P. et al. Pesticide exposure and its repercussion in the health of sanitary agents in the State of Ceará, Brazil. **Ciência & saúde coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2221–2230, 2009.

LIMA, R. S. et al. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos: estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 9–17, 2007.

LIU, T. et al. Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide-gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 1255–1261, 2011.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MAGALHÃES, W. S. et al. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 241–248, 2012.

MARKUS, V. et al. Assessment of the inhibitory activity of the pyrethroid pesticide deltamethrin against human placental glutathione transferase P1-1: A combined kinetic and docking study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n. December 2017, p. 18–23, 2018.

MARONI, M. et al. Biological monitoring of pesticide exposure: A review. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 5–8, 2000.

MARQUES, C. V. V. C. O.; MARQUES, P. R. B. DE O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 81–92, 2006.

MARQUES, P. R. B. DE O.; FARIA, R. C.; FERNANDES, J. B. Avaliação de eletrodos impressos modificados com enzimas AChE imobilizadas com náfton sobre carbono-meldola blue. **Ibersensor**, p. 1–6, 2010.

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

MATERON, E. M. et al. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 232–236, 2014.

MEDINA, M. E. **Efeitos do inseticida permetrina sobre o desenvolvimento de peixes-zebra. 2019. 133 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.**

MEIRA, A. P. G.; SILVA, M. V. Resíduos de agrotóxicos potencialmente contidos na dieta habitual de escolares. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. 1–12, 2019.

MELLO, I. N. K.; SILVEIRA, W. F. Resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 94–104, 2012.

MENDES, C. R. A. et al. Agrotóxicos: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira - uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, v. 17, p. 95–107, 2019.

MENDONÇA, C. D. et al. Construction of amperometric biosensors based on enzyme acetylcholinesterase containing macroalgae of estuary environment for detection of the anticholinesterase agent methyl parathion. **Cadernos de Pesquisa**, v. 19, p. 129–137, 2012.

MILHOME, M. A. L. et al. Assessment of surface and groundwater potential contamination by agricultural pesticides applied in the region of Baixo Jaguaribe, CE, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363–372, 2009.

MINISTÉRIO, DA A. **Número de agrotóxicos registrados em 2020.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1–58, 2012.

MOREIRA, J. C. et al. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557–1568, 2012.

MORGAN, M. K. et al. Pyrethroid insecticides and their environmental degradates in repeated duplicate-diet solid food samples of 50 adults. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 28, n. 1, p. 40–45, 2018.

MOTA, L. D. M. Agrotóxicos e transgênicos: solução ou problema à saúde humana e ambiental? **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 4, n. 1, p. 36–46, 2009.

MOURA, M. V.; SCHLICHTING, C. L. R. Artigo Inédito. **Revista Uningá**, v. 13, p. 37–44, 2007.

NASCIMENTO, D. J. N. **Ocorrência de princípios ativos de agrotóxicos em águas superficiais da região hidrográfica do médio curso do rio Paraíba - grupos carbamato e piretróide. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande, 2016.**

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaiá Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54–61, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª ed.

NOGUEIRA, P. R. R. B. et al. Biossensores para detecção de pesticidas: processos de imobilização da enzima acetilcolinesterase. **Revista Transdisciplinar Logos e Veritas**, v. 1, n. May, p. 33–46, 2014.

NUNES, G.S.; BADEA, M.; MEDEL, M.L.; NOGUER, T.; MARTY, J. L. Ultrasensitive biosensors for the detection of insecticide residues in fruit juices.

Bulletin of the Transilvania University of Brasov, v. 1, p. 29–36, 2008.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 462–471, 2005.

NUNES, G. S. et al. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. **Chemosphere**, v. 111, p. 623–630, 2014.

OLIVEIRA, D. P. C. DE et al. an Electrochemical Biosensor Based on the Tyrosinase Enzyme for the Determination of Phenol in Wastewater. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 924–931, 2015.

OLIVEIRA, G. A. V.; SILVA, J. M. S. F. Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de α -amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 726–732, 19 maio 2017.

OLIVEIRA, J. E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 2: aplicações em sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2013a.

OLIVEIRA, T. I. S. et al. Molinate quantification in environmental water by a glutathione-S-transferase based biosensor. **Talanta**, v. 106, p. 249–254, 2013b.

ÖZASLAN, M. S. et al. Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 9, p. 1–5, 2018.

PALMQUIST, K.; SALATAS, J.; FAIRBROTHER, A. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology. **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**, v. 1, n. 1, p. 1–30, 2012.

PARANÁ. **Secretaria de Estado da Saúde. Intoxicações agudas por agrotóxicos: atendimento inicial do paciente intoxicado**. Paraná: Pevaspea, 2018.

PARENTE, C. E. T. et al. Pyrethroid stereoisomerism: Diastereomeric and enantiomeric selectivity in environmental matrices – a review. **Orbital**, v. 10, n. 4 Special Issue, p. 337–345, 2018.

PATHAK, Y. et al. Rifampicin and Letemovir as potential repurposed drug candidate for COVID-19 treatment: insights from an in-silico study. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 3, p. 926–938, 2021.

PATSKOVSKY, Y. et al. Transition state model and mechanism of nucleophilic aromatic substitution reactions catalyzed by human glutathione S-transferase M1a-1a. **Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 3852–3862, 2006.

PEDROSA, V. A. et al. Determination of parathion and carbaryl pesticides in water and food samples using a self assembled monolayer /acetylcholinesterase electrochemical biosensor. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 4600–4610, 2008.

PEMBLE, S. E.; WARDLE, A. F.; TAYLOR, J. B. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 3, p. 749–754, 1 nov. 1996.

PEREIRA, S. V. et al. Análise espacial das formas de ocupação da bacia hidrográfica do rio Bacanga. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 31, p. 86–100, 2018.

PPDB: PESTICIDE PROPERTIES DATABASE. **Bifenthrin (Ref: FMC 54800)**. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/78.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

PRUSTY, A. K. et al. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: Perils and mitigations. **International Aquatic Research**, v. 7, n. 3, p. 163–191, 2015.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes

aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199–1208, 2014.

REHMAN, H. et al. Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. **Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS**, v. 2, n. 26, p. 60–70, 2014.

RIBEIRO, D. B. et al. Determination of the antioxidant activity of samples of tea and commercial sources of vitamin c, using an enzymatic biosensor. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2021.

RIBEIRO, E. B. et al. Integrated assessment of biomarker responses and microbiological analysis of oysters from São Luís Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 182–186, 2016.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RIBEIRO, M. L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.

RIBEIRO ML, LOURENCETTI C, POLESE L, NAVICKIENE S, O. L. Pesticidas: Usos e Riscos para o Meio Ambiente. **Holos Environment**, v. 8, n. 1, p. 53–71, 2008.

ROBIN, S. K. D.; ANSARI, M.; UPPUGUNDURI, C. R. S. Spectrophotometric Screening for Potential Inhibitors of Cytosolic Glutathione S-Transferases. **Journal of Visualized Experiments**, n. 164, p. 1–18, 2020.

RODRIGUES, L. E. A. Reflexões Sobre O Metabolismo Biossintético Das Piretrinas I E Ii - Revisão E Sugestões. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 20, p. 67–84, 2010.

ROGERS, H. A. et al. Bifenthrin Causes Trophic Cascade and Altered Insect Emergence in Mesocosms: Implications for Small Streams. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 21, p. 11974–11983, 2016.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, fev. 2001.

RUBIO, A. J.; GONÇALVEZ, J. E. **Análise química de agroquímicos em amostras de água e sedimento por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas coletadas da bacia do rio pirapó**. Anais do Encontro Internacional de Produção Científica-EPCC. **Anais...Maringá: Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR)**, 2017Disponível em: <<http://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123456789/1511/1/epcc--79796.pdf>>

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53–58, 2003.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.

SANTOS, C. L. et al. Avaliação da contaminação de corpos d'água Adjacentes a áreas agrícolas da ilha de São Luís (MA) por agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 22, n. 1, p. 85–95, 2012a.

SANTOS, C. L. DOS et al. Avaliação da contaminação de corpos d'água adjacentes a áreas agrícolas da Ilha de São Luís (MA) por agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 22, p. 85–95, 2012b.

SANTOS, M. A. T. DOS; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma

visão geral. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

SANTOS, T. L. L.; MARQUES, P. R. B. DE O.; NUNES, G. S. Construção, caracterização e otimização de biossensor amperométrico baseado em eletrodos de minicavidade com pasta de carbono. **Cadernos de Pesquisa**, v. 21, p. 1–15, 2014.

SELVAM, K. et al. Cellulase enzyme: Homology modeling, binding site identification and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1150, p. 61–67, 2017.

SILVA, F. G. S. **Avaliação da qualidade de solos e águas subterrâneas no Estado do Maranhão, em relação a alguns parâmetros físico-químicos e também à presença de pesticidas organofosforados. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.**

SILVA, M. P. **Determinação de pesticidas organofosforados através de método enzimático. 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.**

SILVA, S. B.; SATO, M.; RAGA, A. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1–30, 2019.

SINGH, R. P. et al. Glutathione-s-transferase based electrochemical biosensor for the detection of captan. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 1, p. 181–185, 2009.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do Km e V Max: Revisão e Uma Nova Proposta. **Ciência em Movimento - Biociências e Saúde**, v. 13, n. 27, p. 47–52, 2011.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3–59, 2002.

SOLHI, E.; HASANZADEH, M.; BABAIE, P. Electrochemical paper-based analytical devices (ePADs) toward biosensing: Recent advances and challenges in bioanalysis. **Analytical Methods**, v. 12, n. 11, p. 1398–1414, 2020.

SOUTO, L. A. DA S. **Desenvolvimento de biossensores amperométricos à base de acetilcolinesterase para detecção de microcistina. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.**

SOUZA, R. L. DE. **Aplicação da técnica de ancoragem molecular na otimização do fármaco hipoglicemiante metformina. 2015. 39 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário Luterano de Palmas, Tocantins, 2015.**

STOPPELLI, I. M. DE B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 0, p. 91–100, 2005.

TALEUZZAMAN, M. Limit of blank (LOB), Limit of detection (LOD), and Limit of quantification (LOQ). **Organic & Medicinal Chem IJ**, v. 7, n. 5, p. 555722, 2018.

TANG, W. et al. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. **Chemosphere**, v. 191, n. 308, p. 990–1007, 2018.

TANIGUCHI, N. **Contaminação da água potável por agrotóxico no Brasil é tema de audiência pública na Câmara dos Deputados – Fiocruz Brasília.** Disponível em: <<https://www.fiocruzbrasil.org.br/contaminacao-da-agua-potavel-por-agrotoxico-no-brasil-e-tema-de-audiencia-publica-na-camara-dos-deputados/>>.

Acesso em: 31 ago. 2021.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. DE F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia**

de Alimentos, v. 24, n. 2, p. 243–248, 2004.

TOSCANO, I. A. S. et al. Determinação de carbaril utilizando testes elisa (enzyme-linked immunosorbent assay) e clae com detecção por arranjo de diodos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 466–471, 2000.

TREVIZAN, L. R. P.; BAPTISTA, G. C. Resíduos de deltametrina em grãos de trigo e em seus produtos processados, determinados por cromatografia gasosa. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 199–203, 2000.

VALE, R. L. **Potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos aplicados na agricultura do entorno do reservatório São Gonçalo - PB. 2014. 97 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande, 2014.**

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

VERMA, N.; BHARDWAJ, A. Biosensor Technology for Pesticides—A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3093–3119, 2015.

VIEIRA, C. E. D.; MARTINEZ, C. B. DOS R. The pyrethroid Λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958–967, 2018.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

VILLALOBOS, J. U. G.; FAZOLLI, S. A. **Agrotóxicos: um enfoque multidisciplinar. 1. ed. São Paulo: EDUEM, 2017. 214 p.**

VILLIS, P. C. M. et al. Copper(II) trace determination in aqueous/ethanolic medium using an ionic imprinted hybrid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, n. 11, p. 10564–10586, 2018.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2013.

VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 4, p. 5–9, ago. 2018.

WIDERSTEN, M.; MANNERVIK, B. Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. **Journal of molecular biology**, v. 250, n. 2, p. 115–122, 7 jul. 1995.

WIGGERS, H. **Integração de métodos in silico e in vitro para o planejamento de inibidores da enzima Cruzaina. 2011. 150 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.**

WU, Y. Direct electrochemistry of cytochrome P450 6A1 in mimic bio-membrane and its application for pesticides sensing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 156, n. 2, p. 773–778, 2011.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. DE S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1206–1211, 2007.

XIONG, J. et al. Fenprothrin, a Widely Used Pesticide, Causes Dopaminergic Degeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 995–1008, 2016.

YAMASAKI, T. et al. Validation of ELISA Kits for Pesticide Residue Analysis in Vegetables and Fruits. **Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 56, n. 6, p. 240–246, 1 dez. 2015.

YE, J. et al. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern

chiral pesticides. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 7, p. 2371–2383, 2010.

ZABOTTO, A. R. **Estudos sobre impactos ambientais: Uma abordagem contemporânea**. Botucatu-SP: FEPAF, 2019.

ZAPP, E. et al. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sensors and Actuators B**, v. 155, p. 331–339, 2011.

ZHAO, F.; LIU, J.; LUO, J. Development of a high-quality ELISA method for dinotefuran based on a novel and newly-designed antigen. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1–11, 2019.

Apêndices

APÊNDICE A



Figura A1 – Foto do espectrofotômetro utilizado para os ensaios cinéticos.

APÊNDICE B



Figura B1 - Potenciostato utilizado para a realização dos ensaios eletroquímicos.

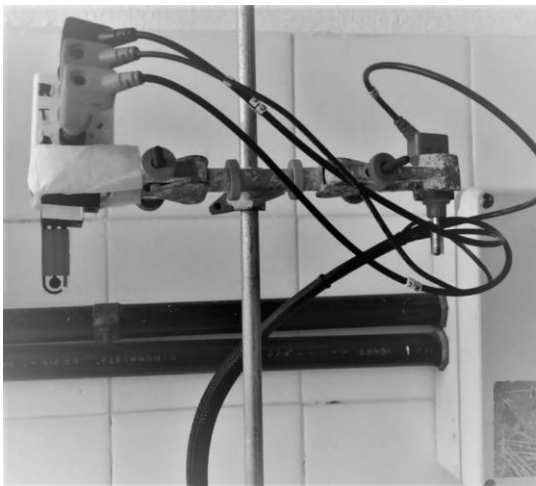


Figura B2 – Fotos do conector feito sob encomenda para acoplamento do biossensor durante os ensaios eletroquímicos.

APÊNDICE C

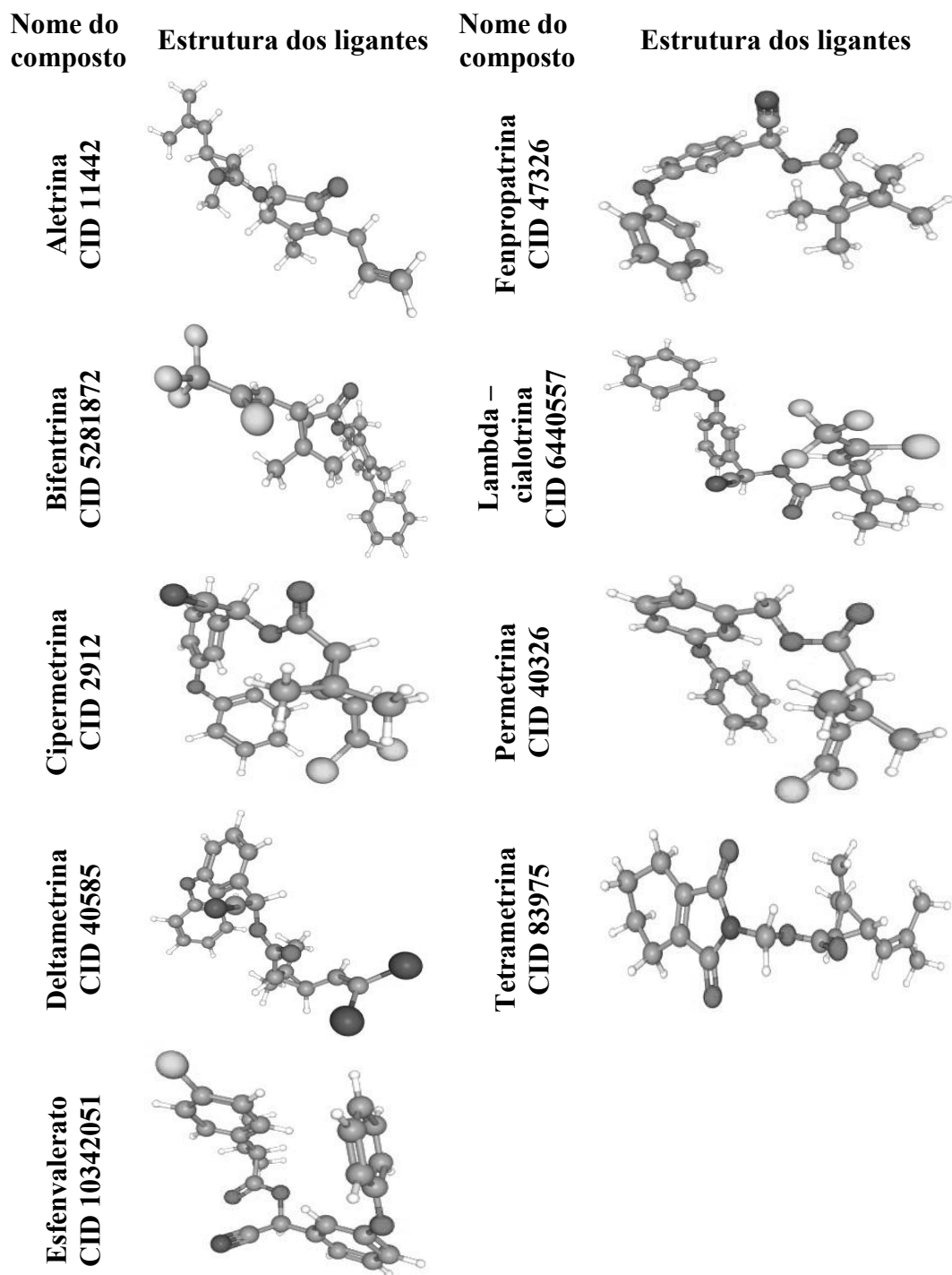


Figura C1 – Estrutura dos ligantes piretroides usadas na docagem molecular.
 Fonte: *Pubchem*.

APÊNDICE D

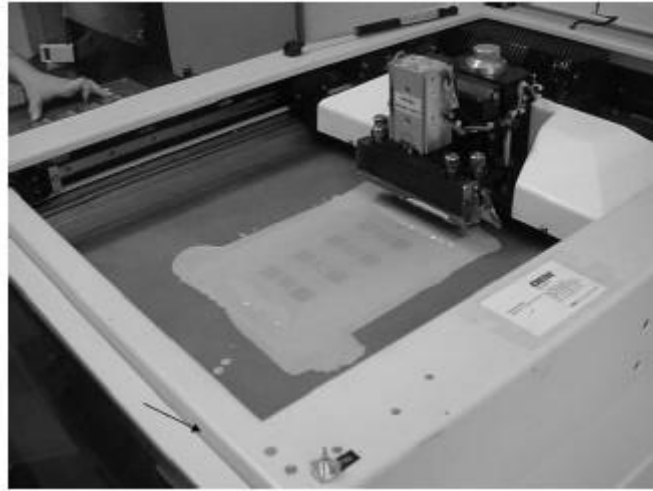


Figura D1- Máquina de serigrafia, no momento da produção de sensores eletroquímicos (eletrodos), a partir da deposição sucessiva de camadas de tinta e pastas de grafite e Ag/AgCl, sobre uma placa fina de PVC.

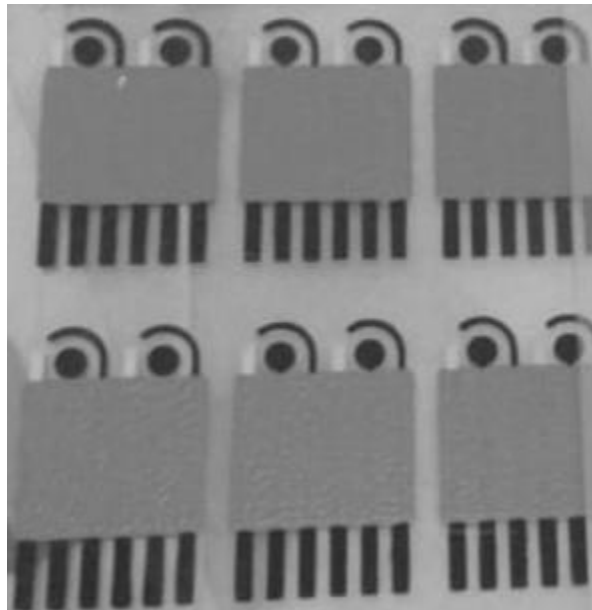


Figura D2- Cartela de eletrodos serigrafados.

APÊNDICE E

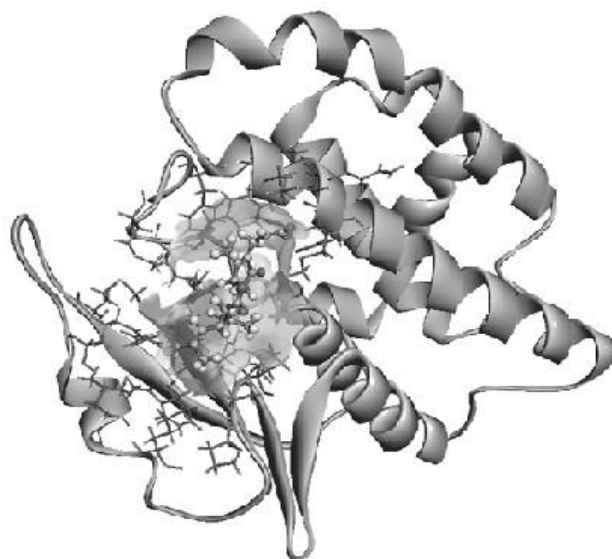


Figura E1- Docking molecular do inseticida piretroide aletrina à cadeia A da enzima glutationa S-transferase (GST) por meio do software Molegro Virtual Docker - MVD 6.0.

APÊNDICE F

Tabela F1– Resultados do ensaio cinético da GST sem inibidor, em função do CDNB

Ponto	[CDNB] (mmol/L)	V/mmol.min ⁻¹	1 / [CDNB] (mmol/L)	1/V/mmol.min ⁻¹	ABS média 340nm	CV (%)
0	0	0	0	0	0,110	0
1	0,1	3,9x10 ⁻⁶	10	2,56x10 ⁵	0,250	2,40
2	0,15	4,83x10 ⁻⁶	6,666667	2,07x10 ⁵	0,309	1,94
3	0,2	5,55x10 ⁻⁶	5	1,80x10 ⁵	0,355	0,00
4	0,25	6,68x10 ⁻⁶	4	1,50x10 ⁵	0,428	0,23
5	0,3	7,51x10 ⁻⁶	3,333333	1,33x10 ⁵	0,481	1,04
6	0,35	8,39x10 ⁻⁶	2,857143	1,19x10 ⁵	0,537	0,19
7	0,4	9,40x10 ⁻⁶	2,5	1,06x10 ⁵	0,602	1,99
8	0,45	1,01x10 ⁻⁵	2,222222	9,90x10 ⁴	0,646	1,39
9	0,5	1,08x10 ⁻⁵	2	9,26x10 ⁴	0,692	3,61

Tabela F2 – Resultados do ensaio cinético da GST sem inibidor, em função da GSH

Ponto	[GSH] (mmol/L)	V/mmol.min ⁻¹	1 / [GSH] (mmol/L)	1/V/mmol.min ⁻¹	ABS média 340nm	CV (%)
0	0	0	0	0	0,113	0
1	0,5	2,50 x10 ⁻⁶	2	4,00 x10 ⁵	0,160	4,38
2	1	2,91 x10 ⁻⁶	1	3,44 x10 ⁵	0,186	4,30
3	2	3,55 x10 ⁻⁶	0,5	2,81 x10 ⁵	0,228	10,09
4	3	3,95 x10 ⁻⁶	0,333333	2,53 x10 ⁵	0,253	0,40
5	4	4,40 x10 ⁻⁶	0,25	2,27 x10 ⁵	0,282	0,35
6	5	4,66 x10 ⁻⁶	0,2	2,14 x10 ⁵	0,299	3,01
7	7	5,22 x10 ⁻⁶	0,142857	1,92 x10 ⁵	0,334	0,00
8	8	5,38 x10 ⁻⁶	0,125	1,86 x10 ⁵	0,345	3,48
9	10	5,30 x10 ⁻⁶	0,1	1,89 x10 ⁵	0,340	2,35

APÊNDICE G



Biossensores Enzimáticos para Determinação de Pesticidas

Enzymatic Biosensors for Determination of Pesticides

Eliane Braga Ribeiro¹; Danilo Braga Ribeiro²; Andressa Rose Castro Costa³; Rute Sayuri Kano⁴; Rodrigo Vieira Blasques⁵; Paulo Roberto Brasil Oliveira Marques⁶; Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta⁷; Gilvanda Silva Nunes⁸

¹elianeribeiro.biologa@gmail.com

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís/MA – Brasil

²dannilobraga15@hotmail.com

³andressacastro.c@gmail.com

^{2,3}Mestrando (a) do Programa de Pós-Graduação em Química (UFMA) – São Luís/MA – Brasil

⁴rute.sayuri@gmail.com

⁴Graduanda em Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís/MA – Brasil

⁵blasques@live.com

⁵Mestrando do Programa de Engenharia em Nanotecnologia, PENt, COPPE/UFRJ – Rio de Janeiro/RJ – Brasil

⁶paulobrasil10@gmail.com

⁶Docente do Curso de Ciências Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Codó/MA – Brasil

⁷raifortes@gmail.com

^{7,8}Orientadora e Docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís/MA – Brasil

⁸gilvanda.nunes.ufma@gmail.com

Resumo

No presente trabalho, comprovou-se um crescente interesse mundial pelos biossensores voltados ao monitoramento de pesticidas. No entanto, percebeu-se que ainda existe um vasto campo de conhecimento a ser explorado na área de biossensoreamento, e esforços nesse sentido precisam ser envidados, tendo em vista que respostas rápidas no monitoramento levam a imediatas tomadas de decisão, no caso de contaminação ambiental, de alimentos ou de fármacos.

Palavras-chave: biossensores enzimáticos; pesticidas; contaminação ambiental; monitoramento.

Abstract

In the present work, there has been a growing worldwide interest in biosensors aimed at monitoring pesticides. However, it was realized that there is still a vast field of knowledge to be explored in the area of biosensing, and efforts in this regard need to be made, considering that quick responses in monitoring lead to immediate decision making in the case of environmental contamination, food or drugs.

Key-words: enzymatic biosensors; pesticides; environmental contamination; monitoring.

1. Introdução

Diversos estudos relatam que o crescente uso de pesticidas tem gerado uma série de transtornos e modificações no ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela sua acumulação nos segmentos (MARONI et al., 2000; CASSAL et al., 2014; NASCIMENTO e MELNYK, 2016). Mota (2009) destaca que a utilização de pesticidas tem sido apontada como um dos principais problemas para a saúde humana e ambiental, devido à comprovação da presença de resíduos tóxicos em alimentos e no ambiente. O monitoramento de pesticidas no ambiente torna-se extremamente necessária para a caracterização e o gerenciamento dos riscos ambientais decorrentes do uso desses produtos, além de poder fazer parte da avaliação no processo de registro de novos produtos ou da reavaliação dos que estão em uso (BADEA et al., 2008).

Diversas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para análise de amostras contaminadas e determinação de pesticidas ou outros poluentes ambientais. Dentre elas, os biossensores, também chamados de sensores biológicos (VERMA e BHARDWAJ, 2015). Tratam-se de dispositivos que combinam a atividade seletiva de elementos de reconhecimento biológico (enzimas, DNA, antígenos, anticorpos, células, organelas, tecido animal ou vegetal, entre outros) sensíveis a uma substância de interesse, a um transdutor que converte a reação de reconhecimento em um sinal mensurável, que pode ser elétrico, térmico ou acústico (NOGUEIRA et al, 2014).

Os biossensores enzimáticos, são assim denominados quando utilizam a atividade de uma enzima para produzir um sinal elétrico a ser monitorado. O monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima provocado pela presença do contaminante em estudo, na qual a atividade é medida antes e após a inibição (VERMA e BHARDWAJ, 2015; NUNES et al, 2014; NOGUEIRA et al, 2014; MARQUES e YAMANAKA, 2008).

O desenvolvimento e aprimoramento de procedimentos de monitoramento baseados no uso de biossensores tem sido de grande relevância, sendo que seu uso não se limita a esse fim, pois tem

sido empregado como ferramentas de “alarme” em indústrias de alimentos, de biocosméticos e para fins clínicos. Uma grande vantagem dessa tecnologia é a possibilidade de portabilidade e medidas de campo (ANDRADE, 2017; AMINE et al, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo não só realizar um estudo prospectivo tecnológico e científico sobre biossensores enzimáticos para a determinação de pesticidas, como também discutir brevemente o estado da arte dessa tecnologia, considerada altamente promissora para a garantia da qualidade de vida em todo o planeta.

2. Material e Métodos

As informações levantadas neste estudo foram obtidas a partir de documentos disponíveis nas bases de dados científicas: Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações – BDTD e Web of Science e na base de patentes *Derwent Innovations Index*, acessadas através do Portal de Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), em janeiro de 2020, e referentes ao período de 1991-2020. Para a busca, foram utilizados os termos “biossensor”, “enzima” e “pesticida”, com suas inúmeras variações, obtidas por meio dos truncadores; tais termos foram considerados norteadores, uma vez que representam adequadamente o tema em estudo. Os descritores foram pesquisados em português (base nacional) e em inglês (base internacional), de forma individual e/ou combinada, com auxílio dos operadores booleanos *and* e *not* (Tabela 1). Foram selecionados todos os documentos que citaram, no título ou no resumo, os termos pesquisados.

Foram coletados os dados quanto ao tipo de documento publicado, ano de publicação, quantidade de depósito de patente e o ano desse registro, país depositante, tipo de enzima e de pesticida utilizado. Estes dados, foram tabulados em software *Microsoft Office Excel*, versão 2010. Para análise e interpretação das informações empregou-se estatística descritiva onde os dados foram expressos em gráficos e em porcentagem.

3. Resultados e Discussão

Biossensores enzimáticos: o que são e para que servem

O biossensor é um dispositivo analítico que consiste em uma biomolécula, um transdutor e um sistema de saída. Pode ser definido também como um sensor modificado com material biológico incorporado à superfície de um transdutor (NOGUEIRA et al., 2014). A Figura 1 esquematiza um biossensor, sendo que as biomoléculas podem ser enzimas, anticorpos, DNA, organelas, células etc. Conforme o tipo de material biológico empregado para fazer o bioreconhecimento do analito

investigado, o sistema analítico pode ser chamado de biossensor enzimático, imunossensor, biossensor baseado em DNA, entre outras denominações (ASAL et al., 2018).

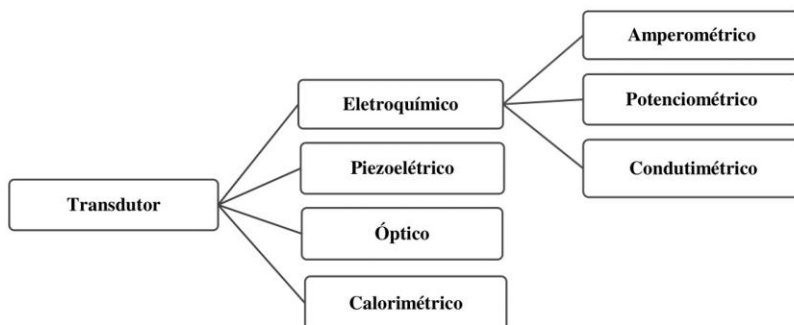
Figura 1 – Representação esquemática dos componentes de um biossensor



Fonte: autoria própria

O transdutor é o componente que capta as reações geradas pela interação entre o material biológico e o analito de interesse, e as converte em um sinal analítico mensurável (como corrente, potencial, mudança de temperatura ou absorção de luz através de meios eletroquímicos, térmicos ou ópticos) (VERMA e BHARDWAJ, 2015). De acordo com o tipo de transdutor empregado, o biossensor pode ser de diversos tipos de sistemas moduladores, conforme Figura 2.

Figura 2 – Tipos de transdutores empregados em biossensores



Fonte: autoria própria

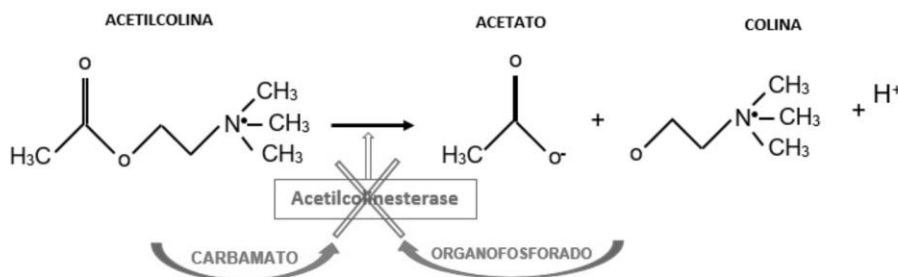
Em relação ao material biológico, as enzimas têm sido muito eficientes no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos voltados à detecção de agrotóxicos, em virtude de possuírem alta especificidade química e propriedades biocatalíticas tais, que lhe permitem reagir seletivamente com o analito-alvo (pesticida), gerando um sinal proporcional à concentração deste (SALOMÃO, 2018; VERMA e BHARDWAJ, 2015; NUNES et al, 2014; OLIVEIRA et al., 2013). Tal reação ocorre devido à habilidade do pesticida em inibir a atividade da enzima incorporada no biossensor. Marques e Yamanaka (2008) esclarecem que a expressão *inibição enzimática* refere-se à capacidade que uma substância tem de interferir, de modo específico, em uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação.

Dentre os biossensores enzimáticos, os mais explorados têm sido aqueles baseados na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), provocada principalmente pela ação dos pesticidas

organofosforados (OFs) e carbamatos (ASAL et al., 2018; ARDUINI et al., 2015; NUNES et al, 2014; LIU et al., 2011; CONG et al., 2009; BADEA et al, 2008). A ação desses contaminantes ocorre sobre as células nervosas (neurônios) do organismo-alvo (insetos e nematódeos), e consiste em inibir a atividade da enzima, desativando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que originaria acetato e colina (Figura 3). Tal inibição ocasiona o acúmulo da ACh nas junções neuromusculares colinérgicas da sinapse e causa vários efeitos neurotóxicos (excitação, convulsão, paralisia e morte) pelo superestímulo do sistema nervoso central (PEREZ-LEGASPI et al., 2015).

Resíduos dos pesticidas OFs têm sido monitorados com sucesso em agroecossistemas brasileiros empregando biossensores à base da enzima AChE (NUNES et al, 2014). Contudo, a maioria dessas aplicações ainda têm sido feitas por grupos de pesquisa, não havendo uma constância na oferta por sistemas biossensores comerciais que possam ser utilizados por pessoas interessadas, comerciantes e industriais.

Figura 3 – Representação da reação de inibição da acetilcolinesterase por ação de pesticidas



Fonte: autoria própria.

As tecnologias voltadas ao desenvolvimento, caracterização e uso dos biossensores vêm sendo bastante exploradas nas últimas quatro décadas, sendo que os protótipos em geral são testados mediante emprego de tecnologias analíticas convencionais. Os diferentes protótipos têm sido comercializados principalmente para as áreas clínica, agrícola e ambiental; contudo, indústrias de alimentos têm demonstrado grande interesse nessas novas e promissoras tecnologias, uma vez que, com elas, é possível detectar – e até mesmo quantificar – contaminantes os mais variados, ou mesmo determinar propriedades inerentes aos alimentos *in natura*, como por exemplo a atividade antioxidante em frutos (BECKER et al, 2019), com elevada rapidez e custo relativamente baixo.

Avanços no desenvolvimento de biossensores

Na presente pesquisa, foi feito um rastreamento dos trabalhos, grupos de pesquisa e instituições que têm se dedicado a desenvolver biossensores altamente sensíveis e seletivos. A Tabela I demonstra o quantitativo de registros documentais recuperados na busca, nas três bases de dados, envolvendo todas as combinações de termos empregados. Com base no escopo de descritores utilizados e suas combinações, a busca com o termo individual bio*sensor* encontrou o maior volume de registros, principalmente em relação ao número de documentos publicados na coleção principal da base de dados *Web of Science*.

Tabela I – Registros obtidos em relação ao desenvolvimento de biossensores

Palavras-chave	BDTD			Principal Coleção do Web of Science	Derwent Innovations Index
	Dissertações	Teses	Total	Documentos publicados	Patentes
Bio*sensor*	274	221	495	88.185	14.832
Bio*sensor* AND enzym*	99	81	180	21.557	3.173
Bio*sensor* AND enzymatic	28	23	51	6.073	342
Bio*sensor* AND electrochemical	90	81	171	25.291	1.829
Bio*sensor AND pesticid*	18	17	35	1.917	164
Bio*sensor AND enzym* AND pesticid*	15	16	31	1132	64
Bio*sensor AND enzym* AND detection AND pesticide	13	14	27	917	34
Bio*sensor AND electrochemical AND pesticid*	10	6	16	792	27
Bio*sensor* AND amperometric	30	12	42	10.381	226
Bio*sensor* AND amperometric AND pesticid*	4	2	6	630	7
Bio*sensor* AND amperometric* AND enzym* AND pesticid*	4	2	6	468	4
Bio*sensor AND enzym* AND agrotoxic*	1	0	1	0	0
Bio*sensor AND electrochemical AND enzym* AND pesticid*	8	6	14	444	15
Electrode AND pesticide	43	24	67	2.486	799
Electrode AND pesticide AND enzym*	11	10	21	894	115
Electrode AND enzymatic AND pesticide	4	6	10	289	11

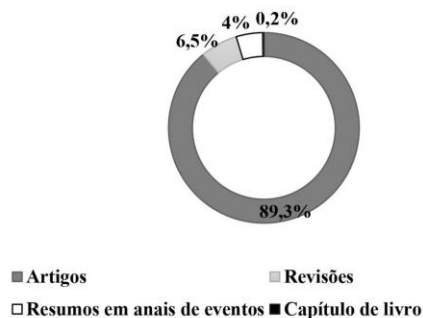
Fonte: BDTD, *Web of Science*, *Derwent Innovations Index*, 2020. Período: 1991-2020

Tal quantitativo apresentou expressiva redução, quando nova busca foi feita com dois ou mais termos combinados, objetivando o refinamento da pesquisa, de forma a selecionar os documentos eletrônicos para análise e posteriormente extrair importantes informações tecnológicas destes. Nesse sentido, comparando-se os resultados obtidos na busca inicial, em relação à busca com a combinação dos descritores bio*sensor and enzym*and pesticid*, foi encontrado, no *Web of Science*, um total de 31 registros de teses e dissertações e 1132 artigos publicados; na base *Derwent Innovations Index*, foram recuperados 64 pedidos de depósito de patentes.

Várias pesquisas vêm sendo feitas para descobrir novos métodos de análises e monitoramento de diferentes contaminantes, sejam eles ambientais ou de alimentos. Indubitavelmente, o volume de registros encontrados sobre biossensores deve-se ao fato de se tratar de uma ferramenta que há muito tem despertado interesse em diversos setores produtivos. (SALOMÃO, 2018). Em levantamento realizado por Salgado et al. (2015) em relação às áreas de aplicações dos biossensores, verificou-se que 45% dos usos destinavam-se à área clínica, seguido por 23% para a área ambiental, 15% para área de alimentos e o restante para fármacos, (bio)combustíveis e a indústria.

Na Figura 4, têm-se os tipos de documentos que foram publicados, no período considerado, na base *Web of Science*, sendo que majoritariamente são artigos científicos. As publicações em geral descrevem a construção e o uso de biossensores enzimáticos para detecção de pesticidas, sendo que os tipos de enzimas empregadas têm sido, prioritariamente, as colinesterases (acetilcolinesterases, AChE's, e butirilcolinesterases, BChE's), seguidas das enzimas glutationa-S-transferase, citocromo p450 (CYPs), tirosinase, polifenol oxidase, esterase, anidrase carbônica, organofosforohidrolase e peroxidase.

Figura 4 – Porcentagem por tipo de documentos publicados, na área de biossensores



Fonte: Autoria própria. Período: 1991-2020

Existe uma gama de pesticidas com diferentes classificações químicas, como por exemplo piretróides, carbamatos, compostos bipiridílicos, formicidas, organofosforados (OFs) e organoclorados (OCs), sendo que estas duas últimas classes estão entre as de maior toxicidade, tendo sido inclusive alguns compostos proibidos, devido aos efeitos comprovadamente prejudiciais à saúde humana (NOGUEIRA et al., 2014).

Dentre os pesticidas monitorados pelos biossensores, destacam-se os compostos das seguintes classes: inseticidas organofosforados, OFs (paration metílico, malation, clorpirifós, temefós, metamidofós, dimetoato, etc.) e alguns dos seus produtos de degradação (clorpirifós-oxon, paraoxon, etc); inseticidas carbamatos (carbofuran, carbaril, propoxur, metomil, etc); inseticidas piretróides (cipermetrina, deltametrina, permetrina, aletrina, etc.); herbicidas clorofenóxiácidos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D) e seu principal produto de degradação (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético 2,4,5-T); herbicidas do tipo triazinas (atrazina, simazina, aletrina, etc.), e fungicidas ditiocarbamatos (maneb, zineb, mancozeb, etc.). As enzimas AChE têm sido utilizadas como material de bioreconhecimento em biossensores para detecção de inseticidas OFs e carbamatos, sendo altamente sensíveis na medição direta desses compostos, com a possibilidade de realizações de medidas de campo (AMINE et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2014; PEDROSA et al, 2008).

De acordo com a Figura 5, os artigos recuperados na base *Web of Science* com os descritores bio*sensor and enzym*and pesticid* começaram a ter registros a partir de 1991, e desde então têm evoluído de forma crescente, tendo seu maior número de registros entre 2018 e 2019. No entanto, a literatura científica apresenta registros acerca dessa técnica a partir de 1962, época em que pesquisadores buscavam procedimentos mais práticos para se determinar resíduos de inseticidas organofosforados anticolinesterásicos, sobretudo em amostras de água e alimentos (GUILBAULT et al., 1962).

Figura 5 – Porcentagem de artigos com o tema biossensores

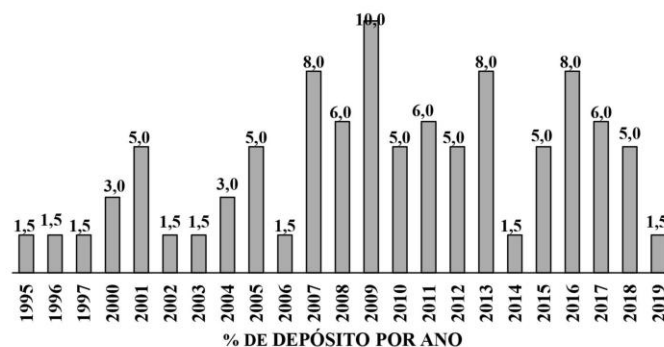


Fonte: *Web of Science*, 2020. Período 1991-2020

Dessa época, até os dias atuais, nota-se um expressivo desenvolvimento de pesquisas envolvendo biossensores, o que pode estar relacionado à diversidade de campos em que essas ferramentas podem ser aplicadas, tanto para detecção, como para quantificação de uma variedade de contaminantes. Dentre alguns trabalhos, tem-se o que foi realizado por Oliveira et al. (2013), que desenvolveram um biossensor baseado em glutationa-S-transferase para quantificar o herbicida sistêmico molinato em amostras de água de inundação de arrozais. Zheng et al. (2016) desenvolveram um eletrodo de nanopartículas de prata, modificado com AChE e quitosana para a detecção de inseticidas OFs. Alves et al. (2018) relataram o desenvolvimento e uso de um biossensor eletroquímico para detecção do inseticida OF fenitroton, baseado em um eletrodo de grafite modificado com tirosinase. Arduini et al. (2019) construíram biossensores em papel de origami para a detecção de várias classes de pesticidas (p. ex., o inseticida OF paraoxon e os herbicidas 2,4-D e atrazina) a partir da inibição das enzimas butirilcolinesterase, fosfatase alcalina e tirosinase, respectivamente. Sankar et al. (2020), por sua vez, construíram um dispositivo de papel incorporado em lipase para quantificação digital do inseticida OF clorpirifós em amostras de água, com base nos princípios de inibição enzimática e no processamento de imagem.

A Figura 6 apresenta os registros localizados na busca a partir dos termos bio*sensor and enzym* and pesticid*, referentes à distribuição dos pedidos de patentes depositadas anualmente, e que foram recuperados na base *Derwent Innovations Index*.

Figura 6 – Distribuição de acordo com o ano de depósito das patentes



Fonte: *Derwent Innovations Index*, 2020

Foram observados registros iniciais em 1995; a partir de 2007 houve um aumento considerável nesse quantitativo, sendo 2009 o ano com maior volume de solicitações. Até a

finalização da presente pesquisa, em fev/2020, não foi localizado nenhum registro de depósito em 2020. Os dados referentes a 2009 corresponderam a 9 pedidos de depósitos de patentes, sendo três deles feitos pelas seguintes empresas: *Siemens AG* (grupo empresarial alemão), cujo registro refere-se a um biossensor enzimático para determinar toxinas e pesticidas em amostra de água de esgoto; *Beijing Agric Prod Quality Inspection* (chinesa), que patenteou um biossensor para detectar micro resíduos de pesticidas na superfície de frutas e vegetais, e *OHMX Corporation* (empresa americana que atua na área voltada ao desenvolvimento de diagnósticos clínicos), cujo pedido de patente corresponde a um dispositivo para detectar uma variedade de analitos, dentre eles, pesticidas.

Sem dúvida alguma, universidades chinesas têm liderado as pesquisas e depósitos de patentes no campo dos biossensores. Como exemplo, cita-se o grupo chinês que vem trabalhando fortemente em parceria com a empresa *Biodetection Instruments*, localizada nos Estados Unidos. O grupo tem desenvolvido e comercializado biossensores e instrumentos para detecção rápida de diversos patógenos alimentares e resíduos químicos. O pedido de depósito localizado na presente pesquisa refere-se a um dispositivo para detecção de herbicidas da classe das triazinas. Outras duas tecnologias foram ainda patenteadas pelo pesquisador Z. Wang (da Universidade de Hong Kong) no período estudado. A primeira trata-se de um biossensor fluorescente à base da enzima AChE para detecção de resíduos de pesticidas na superfície de frutas e legumes, e a outra, um biossensor utilizando esterase de trigo para detecção de inseticidas OFs.

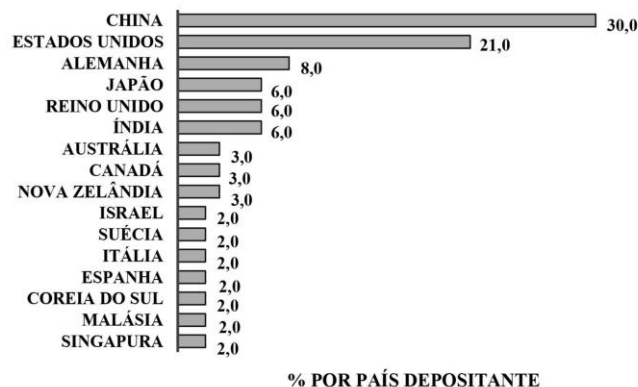
Vale mencionar aqui a colaboração multilateral entre algumas universidades chinesas, no sentido de desenvolver biossensores com elevado potencial de comercialização, com destaque para três documentos depositados em nome dos pesquisadores Shao-Hua Zuo e P. Zuo, ambos da Universidade de Ciência e Tecnologia da China Oriental que, juntamente com o pesquisador Xian-Bo Wu, da Universidade Médica do Sul da China, registraram um biossensor para detecção de pesticidas OFs, integrado a um microcontrolador digital e analógico.

Uma patente foi depositada por Reardon e colaboradores, da Universidade Estadual do Colorado (Estados Unidos), tratando-se de um biossensor para detecção de um composto orgânico halogenado e de pesticidas OCs no solo e na água. Finalmente, destaca-se aqui o registro de um dispositivo enzimático microencapsulado para detecção de pesticidas OFs, tendo como depositante somente a Universidade de Calcutá (Índia), sem menção aos inventores.

A Figura 7 mostra a distribuição dos depósitos de Patentes envolvendo os termos bio*sensor and enzym* and pesticid* conforme o país depositante no período de 1995 a 2020. Pode-se observar que a China é o país com maior quantidade de depósito de patentes, o que corresponde a

19 registros, seguido pelos Estados Unidos com 14 e a Alemanha com 5. Estes dados indicam o investimento direcionado a pesquisa e a forte aplicação do conhecimento científico nesses países.

Figura 7 – Distribuição de patentes relacionadas a biossensores, de acordo com o país depositante



Fonte: *Derwent Innovations Index*, 2020. Período: 1991-2020.

A concepção de dispositivos que empregam o princípio do reconhecimento biológico ocorre em sua maioria nos laboratórios das universidades e centros de pesquisa, onde os protótipos, ou mesmo os instrumentos contendo os biossensores acoplados a *softwares* embarcados, antes de serem patenteados, são testados quanto aos aspectos de segurança e eficácia, de forma a atrair o interesse comercial de empreendedores dispostos a produzi-los em larga escala (ANDRADE, 2017). Mueller e Perucchi (2014) mencionam que é de grande importância a posição do cientista, não só na busca de soluções de problemas sociais, econômicos, ambientais e de saúde pública, como também na produção de inovações com potencial mercadológico, como resultados de pesquisas acadêmicas.

A análise das informações obtidas em bases de patentes, além de servir como um termômetro internacional sobre o desenvolvimento tecnológico mundial e a capacidade de inovação, indica o desenvolvimento econômico e social dos países ou nações, os quais podem se tornar produtores e exportadores de tecnologias as mais variadas (LOBATO e ORTIZ, 2019). No tocante aos biossensores, observa-se que tais dispositivos tratam-se, na realidade, de ferramentas biotecnológicas em ampla expansão em diversos países. Segundo pesquisa norte-americana na área de tecnologia da informação, em 2016 o mercado de biossensores foi avaliado em cerca de US\$ 16 bilhões, podendo chegar a US\$ 27 bilhões até 2022 (ANDRADE, 2017), o que indica ser de fato uma área altamente promissora.

4. Conclusão

No presente trabalho, foi possível verificar que inúmeras pesquisas sobre biossensores enzimáticos para a determinação de pesticidas foram publicadas, o que favoreceu a divulgação científico-tecnológica dessa importante ferramenta analítica. O reconhecimento desses estudos, favoreceu, ao longo dos anos, a captação de mais recursos para aprofundamento das pesquisas e o desenvolvimento de metodologias altamente inovadoras, principalmente em se tratando de uma técnica que tem impacto positivo nas questões de monitoramento de contaminantes químicos, e consequentemente na qualidade da saúde humana e ambiental.

No entanto, a produção científica que resultou em produtos ou processos tecnológicos com potencial de mercado pode ser considerada ainda muito restrita, basta comparar o quantitativo de registros de depósito de patentes com o de artigos científicos, sendo este último inúmeras vezes superior. Por conseguinte, pode-se inferir que ainda existe um vasto campo de conhecimento a ser explorado e desenvolvido na área de biossensores, tendo em vista a necessidade na busca de soluções que identifiquem uma possível contaminação ambiental e que rastreiem a diversidade de substâncias químicas utilizadas nos mais variados processos, inclusive na produção de alimentos e fármacos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Superior de Investigações Científicas (CNPq, Proc. 314948/2018-0), pelas bolsas e auxílios concedidos, e à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP/UFMA), pelo apoio institucional.

Referências

- ALVES, M. F. et al. Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly (2-hydroxybenzamide) -modified graphite electrode. **Analytical biochemistry**, v. 553, p. 15-23, 2018.
- AMINE, A. et al. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 180-194, 2016.
- ANDRADE, R. O. Biossensores na medicina: portáteis e precisos, dispositivos pretendem aprimorar diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas. **Revista Pesquisa Fapesp**, v.1, n. 258, p. 68-71, 2017.
- ARDUINI, F. et al. Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 346-354, 2019.

ARDUINI, F. et al. Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 3-4, p. 643-651, 2015.

ASAL, M. et al. Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. **Sensors**, v. 18, n. 6, p. 1924, 2018.

BADEA, M et al. Biosensors for organophosphorus and carbamates pesticides detection from water samples. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, v. 9, p. 33-42, 2008.

BECKER, M. M. et al. Development of a highly sensitive xantine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. **Talanta**, v. 204, p. 626-632, 2019.

CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 2285-2288, 2009.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N.; CANNON, P. L. Electrochemical determination of organophosphorus compounds. **Analytical Chemistry**, v. 34, n.11, p. 1437-1439, 1962.

LIU, T. et al. Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide-gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 1255-1261, 2011.

LOBATO, A. O. C.; ORTIZ, R. M. A inovação e a proteção da propriedade intelectual no Brasil: análise da dependência nacional da tecnologia farmacêutica estrangeira. **Revista GEINTEC**, v. 9, n. 1, p. 4809-4824, 2019.

MARONI, M. et al. Biological monitoring of pesticide exposure: A review. Introduction. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 1-18, 2000.

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

MOTA, L. D. M. Agrotóxicos e transgênicos: solução ou problema à saúde humana e ambiental? **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 4, n. 1, p. 36-46, 2009.

MUELLER, S. P. M.; PERUCCHI, V. Universidades e a produção de patentes: tópicos de interesse para o estudioso da informação tecnológica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v.19, n.2, p.15-36, 2014

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.

NOGUEIRA, P. R. R. B. et al. Biossensores para detecção de pesticidas: processos de imobilização da enzima acetilcolinesterase. **Revista Transdisciplinar Logos e Veritas**, v. 01, n. 4, p. 33-46, 2014.

NUNES, G. S. et al. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. **Chemosphere**, v. 111, p. 623-630, 2014.

OLIVEIRA, J. E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2013.

OLIVEIRA, T. I. S. et al. Molinate quantification in environmental water by a glutathione-S-transferase based biosensor. **Talanta**, v. 106, p. 249-254, 2013.

PEDROSA, V. A. et al. Determination of parathion and carbaryl pesticides in water and food samples using a self assembled monolayer/acetylcholinesterase electrochemical biosensor. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 4600-4610, 2008.

PEREZ-LEGASPI, I. A.; RICO-MARTINEZ, R.; QUINTANAR, J. L. Reduced expression of exocytotic proteins caused by anti-cholinesterase pesticides in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Monogononta). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 759-765, 2015.

SALGADO, A.; JACOBY, G.; PAULA, L. A. O estado da ciência do desenvolvimento de biossensores a nível nacional. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2615-2622, 2015.

SALOMÃO, P. E. A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 3, p. 1, 2018.

SANKAR, K. et al. Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device. **Talanta**, v. 208, p. 120408, 2020.

VERMA, N.; BHARDWAJ, A. Biosensor technology for pesticides - a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3093-3119, 2015.

ZHENG, Q. et al. A nano-silver enzyme electrode for organophosphorus pesticide detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 21, p. 5819-5827, 2016.

Recebido em: 09/07/2020

Aprovado em: 10/11/2020

Figura G1- Artigo publicado no periódico Geintec.

APÊNDICE H

Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-7, 200_

http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170804

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE PESTICIDAS PIRETROIDES SOBRE A GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Eliane B. Ribeiro^{a,*}, Mihaela Badea^b, Danilo B. Ribeiro^a, Andressa R. C. Costa^a, Djanira R. dos Santos^a, Paulo R. B. O. Marques^a e Gilvanda S. Nunes^a

^aDepartamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís – MA, Brasil

^bDepartment of Fundamental, Prophylactic and Clinical Specialties, Transilvania University of Brasov, 500039 Brasov, Romania

Recebido em 29/05/2021; aceito em 14/07/2021; publicado na web em 10/08/2021

Artigo

INHIBITORY ACTIVITY OF PYRETHROID PESTICIDES ON GLUTATHIONE S-TRANSFERASE. Glutathione S-transferase (GST) is one of the enzymes used to evaluate the effects caused by environmental contaminants. The aim of this work was to study the effects of four pyrethroid compounds (allethrin, cypermethrin, deltamethrin and fenprothrin) on the catalytic activity of GST and to estimate the potential for environmental contamination *in silico* of these insecticides. Spectrophotometric analyses showed that the activity of the GST enzyme was inhibited by the four pesticides, with the values for the inhibition constant (K_i) varying from 0.12 to 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with the following order of inhibition from the highest to the lowest K_i value: deltamethrin > cypermethrin > allethrin > fenprothrin. They presented a competitive and non-competitive inhibition mechanism depending on the compound. The IC_{50} values (concentration that inhibits 50% of the enzyme activity) showed the insecticide deltamethrin with greater inhibitory capacity, since it reduced the activity of the GST enzyme by half, even though it was in a lower concentration in relation to the other analyzed compounds. The *in silico* evaluation indicated the possibility of most of the insecticides contaminating the surface waters (rivers and lakes) adhered to the suspended sediment, but did not show any potential for contamination of groundwater through leaching.

Keywords: synthetic pesticides; enzymatic activity; spectrophotometry; *in silico*; environmental contamination.

INTRODUÇÃO

Pesticidas são produtos químicos usados na agricultura para prevenir ou controlar os efeitos negativos de organismos nocivos.¹ Conforme a sua finalidade podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, nematocidas, reguladores de crescimento de plantas e outros.² Entre os pesticidas, estão os piretroides cujo desenvolvimento ocorreu a partir do *piretrum*, que é uma mistura de substâncias obtidas da maceração da flor do crisântemo (gênero *Chrysanthemum* spp.), conhecida por seus efeitos repelentes a insetos. Após estabelecidas as rotas para a sua síntese em 1980, surgiu a classe dos inseticidas piretroides.³

A partir desse período, foi desenvolvida uma variedade de estruturas piretroides, cujas formulações são empregadas em diversas áreas, no campo da veterinária, como antiparasitários em rebanhos, na medicina, como antiparasitários em humanos e em questões de saúde pública (combatendo mosquitos vetores de doenças) e no controle de pragas domésticas e agrícolas.⁴

Os piretroides constituem uma classe de inseticidas utilizados mundialmente, respondendo por mais de 17% do mercado global de agroquímicos.⁵ Devido ao crescente uso desses produtos, uma série de transtornos e modificações para o meio ambiente têm sido relatadas, como a contaminação do solo e de corpos hídricos,⁶ contaminação de alimentos,^{7,8} além da toxicidade para artrópodes aquáticos, abelhas e peixes.⁹

Apesar de serem conhecidos os impactos causados por pesticidas, ainda se faz necessário examinar os efeitos de compostos piretroides, sobretudo em relação a cinética da glutatona S-transferase (GST), que é uma enzima encontrada em vários seres vivos como fungos, plantas, animais e algumas bactérias.¹⁰ A GST constitui uma grande família de isoenzimas diméricas, citosólicas, que exercem função relevante na biotransformação e desintoxicação de compostos eletrofílicos (endógeno e exógeno como pesticidas e outros poluentes ambientais)

e na defesa das células contra o estresse oxidativo nos organismos.^{11,12} Especificamente, nas reações de desintoxicação, a GST realiza a catálise da conjugação entre um xenobiótico e a glutatona reduzida (GSH), formando um composto conjugado, que é metabolizado ou excretado em uma etapa posterior.¹³

Nesse contexto, diversos estudos indicam que a GST é uma importante enzima que está entre os principais marcadores bioquímicos utilizados para avaliar a exposição e os efeitos provocados por contaminantes ambientais.¹⁴⁻¹⁶ Assim, este trabalho tem como finalidade investigar de forma *in vitro*, a inibição da atividade catalítica da glutatona S-transferase usando os pesticidas piretroides aletrina, cipermetrina, deltametrina e fenpropatrina, demonstrados na Figura 1, bem como avaliar por meio *in silico*, o potencial de contaminação ambiental desses compostos.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

Foram adquiridos da Sigma-Aldrich os seguintes produtos: a enzima glutatona S-transferase (GST) de fígado equino, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), glutatona reduzida (GSH), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA, etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) e acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$). Os padrões analíticos foram adquiridos da Accu Standard (aletrina, deltametrina e fenpropatrina) e da Fluka (cipermetrina).

Para o preparo da solução tampão (pH 6,5) foram utilizados: fosfato de potássio monobásico, ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA e água deionizada purificada pelo sistema Milli-Q®. A dissolução da GSH foi feita com tampão fosfato, e o CDNB, com etanol absoluto (70% do volume) e água deionizada, sendo ambas preparadas antes de cada ensaio experimental. A solução estoque de GST foi preparada solubilizando-se em 1 mL de tampão fosfato (pH 6,5), 10 mg dessa enzima em pó contida no frasco, sendo 25 unidades de enzima por miligrama, conforme informações do

*e-mail: elianeribeiro.biologa@gmail.com

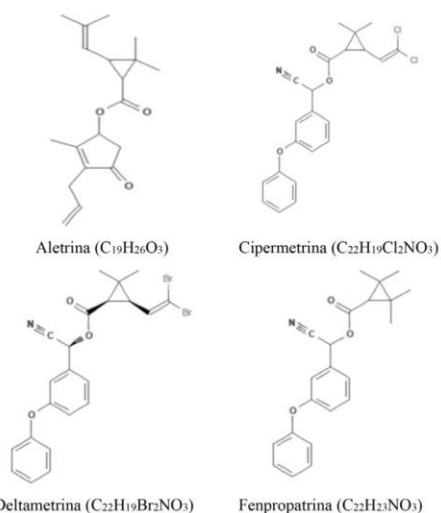


Figura 1. Estrutura química dos inseticidas piretroides analisados. Fonte: Pubchem

fabricante e foi armazenada a -20 °C. Os padrões de pesticidas foram dissolvidos em acetonitrila. As soluções de trabalho foram preparadas em tampão, em concentração apropriada, a partir da solução-estoque.

Equipamentos

As medidas de absorbância foram registradas em espectrofotômetro UV/Vis (Thermoscientific, Orion AquaMate 8000) utilizando cubeta de quartzo com volume de 1 mL e 1 cm de caminho óptico.

Determinação da atividade cinética da GST

Para encontrar as melhores condições dos parâmetros a serem empregados nos ensaios de cinética enzimática, foi realizado um planejamento fatorial com três fatores e dois níveis, por meio do programa Minitab Statistical® versão 13.0. Os fatores correspondem aos reagentes empregados e os níveis à concentração mínima e máxima, desses reagentes (Tabela 1), as quais foram escolhidas tendo como base a realização de testes preliminares *in vitro*.

As variáveis foram as concentrações dos substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutatona reduzida (GSH), bem como a quantidade de enzima glutatona S-transferase (GST). Foram realizados oito ensaios em triplicata, tendo sido o experimento inteiramente casual.

A atividade da GST foi avaliada empregando-se o método já descrito na literatura¹⁷ adicionando-se quantidades variadas dos

reagentes GSH e CDNB, em tampão fosfato (PBS) pH 6,5, em presença ou ausência da enzima GST, perfazendo um volume total de 450 µL em cubeta de quartzo. A reação foi monitorada espectrofotometricamente, em um comprimento de onda de 340 nm, por um tempo de 3 minutos. Uma unidade de GST representa a quantidade de enzima necessária para conjugar 1 µmol de CDNB com GSH por minuto.

Os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculados a partir da equação de Lineweaver-Burk (Equação 1). Sendo: V_0 = velocidade inicial da reação; V_{max} = velocidade máxima de reação; $[S]$ = concentração do substrato; e K_M = constante de Michaelis-Menten. Para essa finalidade, foram realizados ensaios, mantendo-se fixa a carga enzimática da GST, a concentração de GSH permaneceu fixa e variou-se a concentração do CDNB, e o contrário, em que se fixou a concentração de CDNB e se variou a concentração de GSH. Serviu como controle o experimento realizado sem adição dos reagentes CDNB e GSH, conforme o ensaio.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \cdot \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

Ensaio de inibição da enzima GST por inseticidas piretroides

Nos testes para obtenção do mecanismo de inibição e constante de inibição- K_i , foram empregadas concentrações fixas de 0,25 mg L⁻¹ de cada pesticida em estudo, concentrações fixas de GSH, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 com concentrações crescentes de CDNB em cubeta de quartzo. Os resultados foram representados conforme método Lineweaver-Burk (representação de duplo recíproco), plotando-se gráficos $1/V_0$ versus $1/[S]$.

Para o cálculo da concentração que inibe 50% da atividade da enzima - IC_{50} , foram realizados ensaios com diferentes concentrações (0,0625 a 5 mg L⁻¹) de cada pesticida piretroides em concentração fixa do substrato CDNB, GSH e carga enzimática.

Análise *in silico* do risco de contaminação aquática por pesticidas piretroides

Essa etapa foi baseada na aplicação de duas metodologias: a aplicação dos critérios do método de GOSS¹⁸ para avaliação do risco de contaminação de águas superficiais e os critérios do índice de GUS - *Groundwater Ubiquity Score*,¹⁹ para o risco de contaminação de águas subterrâneas.

No método de GOSS, são propostos critérios físico-químicos para cada contaminante, cujos valores são apresentados em intervalos matemáticos, o que resulta na classificação dos ingredientes ativos dos pesticidas conforme o potencial de contaminação associado ao sedimento ou dissolvido em água (Tabela 2).

No índice de GUS, utiliza-se, para o cálculo, os valores correspondentes as propriedades físico-químicas empregadas (meia-vida (DT_{50}) e o coeficiente de adsorção ao solo (K_{oc})), de acordo com a Equação 2. Esse índice estabelece três

Tabela 1. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2³ para determinação cinética da atividade da enzima GST

Fatores	Níveis	
	Mínimo	Máximo
Glutaciona reduzida - GSH	0,5 mmol L ⁻¹	7,0 mmol L ⁻¹
1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - CDNB	0,2 mmol L ⁻¹	2,0 mmol L ⁻¹
Glutaciona S-transferase - GST	0,0125 U mL ⁻¹	0,25 U mL ⁻¹

Fatores = reagentes; Níveis = concentração dos reagentes; Concentração: GSH, CDNB, GST; U = atividade específica.

Tabela 2. Potencial de transporte dos inseticidas piretroides de acordo com o Método de Goss

Potencial	Transporte associado ao sedimento		
	DT ₅₀ solo	K _{oc} (mL g ⁻¹)	Solubilidade em água (mL g ⁻¹)
Alto	≥ 40	≥ 1000	-
	≥ 40	≥ 500	≤ 0,5
Baixo	< 1	-	-
	≤ 2	≤ 500	-
	≤ 4	≤ 900	≥ 0,5
	≤ 40	≤ 500	≥ 0,5
	≤ 40	≤ 900	≥ 2

Potencial	Transporte dissolvido em água		
	DT ₅₀ solo	K _{oc} (mL g ⁻¹)	Solubilidade em água (mL g ⁻¹)
Alto	> 35	< 100000	≥ 1
	< 35	≤ 700	≥ 10 e ≤ 100
Baixo	-	≥ 100000	-
	≤ 1	≥ 1000	-
	< 35	-	< 0,5

DT₅₀ = tempo de meia vida do pesticida; K_{oc} = constante de adsorção à matéria orgânica; S = solubilidade em água. Fonte: adaptado de GOSS.¹⁸

faixas de classificação à tendência de lixiviação do pesticida: GUS < 1,8 = não sofre lixiviação; 1,8 < GUS < 2,8 = faixa de transição; GUS > 2,8 = provável lixiviação.

$$GUS = \log(DT_{50 \text{ soil}}) \cdot (4 - \log K_{oc}) \quad (2)$$

As informações sobre as propriedades físico-químicas dos compostos analisados foram adquiridas a partir de levantamento feito em artigos científicos relacionados e em banco de dados de acesso livre: *Pesticide Properties Data* (PPDB) e *PubChem* (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise quimiométrica: otimização do ensaio espectrofotométrico

Os dados obtidos com o planejamento fatorial geraram diversos gráficos, apresentados a seguir. O gráfico de Pareto indicou que os parâmetros C (carga da enzima) e B (concentração de CDNB) foram os mais significativos para a resposta do sistema enzimático, podendo provocar variações mais expressivas, mesmo com pequenas diferenças em seus níveis (Figura 2).

A partir dessa análise, pode-se afirmar que a concentração do substrato GSH não representou um parâmetro determinante, sugerindo que se forem utilizados níveis de concentração mais elevados (7 mmol L⁻¹) ou menos elevados (0,5 mmol L⁻¹), não implicaria em diferença significativa na resposta cinética.

A Figura 3a apresenta o gráfico de superfície, o qual indica que, para se alcançar os valores de absorvância entre 0,3 e 0,4 (ideal para início dos trabalhos envolvendo inibição da enzima), deve-se trabalhar com o parâmetro carga de enzima em um nível mais baixo. Já para o parâmetro concentração do CDNB, pode ser tanto o nível alto como baixo de carga enzimática, pois a variação dele não afetou o sistema quando a concentração de GSH foi fixada no menor nível (0,5 mmol L⁻¹).

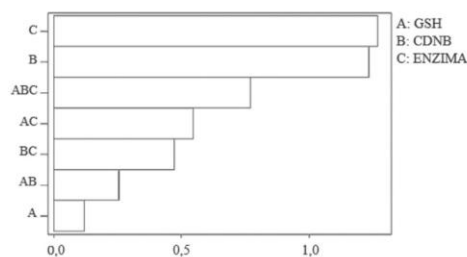


Figura 2. Gráfico de Pareto representando a influência das concentrações dos substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzo (CDNB) e glutatona reduzida (GSH) e a carga da enzima glutatona S-transferase (GST), nos resultados cinéticos

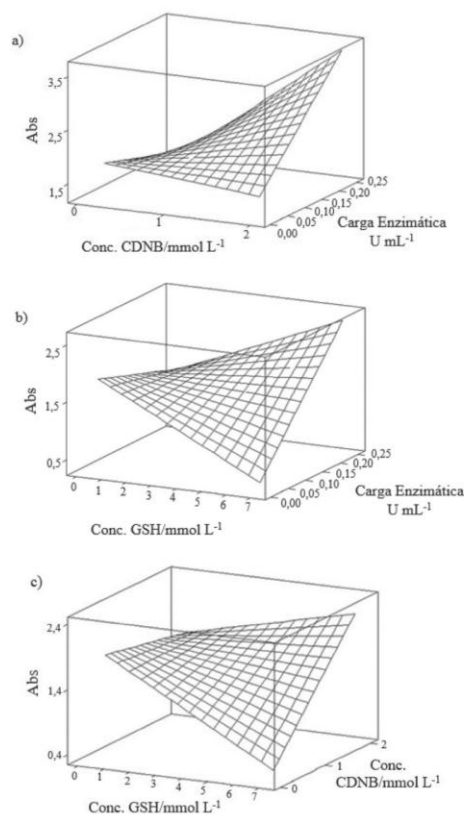


Figura 3. Gráficos de superfície de resposta: (a) com o fator GSH fixo (0,5 mmol L⁻¹), relacionando os fatores concentração de CDNB e carga da enzima GST no sistema; (b) com o fator CDNB fixo (0,2 mmol L⁻¹) relacionando os fatores concentração de GSH e carga da enzima e (c) com o fator carga da enzima fixo (0,0125 U mL⁻¹), relacionando os fatores GSH e CDNB

A Figura 3b indicou claramente que, quando a concentração de CDNB for fixada em 0,2 mmol L⁻¹, é melhor trabalhar com cargas

enzimáticas mais baixas e concentrações mais elevadas de GSH, para se ter valores de absorbância mais próximos de 0,3 e 0,4. Na Figura 3c, pode-se verificar que, fixando-se a carga da enzima em 0,0125 U mL⁻¹, a melhor condição ocorreu com a concentração de GSH em nível mais elevado e de CDNB em nível mais baixo.

A partir dos dados obtidos com o planejamento fatorial, e considerando-se o alto custo da enzima optou-se pela configuração: GSH 7,0 mmol L⁻¹; CDNB 0,2 mmol L⁻¹ e enzima GST 0,0125 U mL⁻¹, como melhor condição experimental a ser adotada para os ensaios cinéticos seguintes, uma vez que será utilizada a menor carga enzimática.

Cinética enzimática na ausência dos inseticidas piretroides

A glutatona é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos: ácido glutâmico, glicina e cisteína que existe no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que o local ativo responsável por suas propriedades bioquímicas é o grupo tiol da cisteína.²⁰ Na reação, a glutatona S-transferase catalisa a desprotonação da glutatona reduzida gerando o ânion tiolato GS⁻, que possui maior reatividade. A reação de conjugação do tiolato com o CDNB gera um complexo instável e na sequência a formação do conjugado glutatoni-dinitrobenzeno (GS-DNB) (Figura 4).²¹

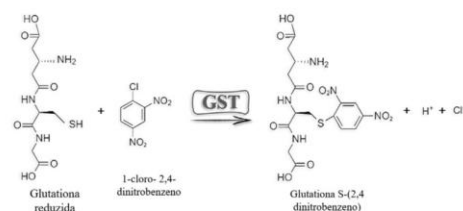


Figura 4. Reação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutatona reduzida (GSH), catalisada pela enzima glutatona S-transferase (GST)

Os registros referentes ao comportamento cinético dessa enzima frente a variação das concentrações dos substratos glutatona reduzida-GSH e 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno-CDNB encontram-se na Figura 5, em que foi relacionado o inverso da velocidade (1/V), pelo inverso da concentração do substrato (1/[S]).

A partir da equação dos gráficos de regressão linear: a) $y = 258355x + 158901$ com $R^2 = 0,97$ e b) $y = 20665x + 58694$ com $R^2 = 0,98$, os parâmetros de velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_M), apresentados na Tabela 3, foram determinados a fim de avaliar a medida da afinidade da enzima pelo substrato na formação do complexo enzima-substrato.

Os resultados demonstraram que a V_{max} mais elevada foi obtida pela reação com concentrações crescentes de CDNB, a qual apresentou um menor valor de K_M , indicando a maior afinidade enzimática. Em um estudo eletroquímico foram encontrados os parâmetros cinéticos da GST, para diferentes concentrações de GSH e CDNB incubados por dois períodos de tempo (15 e 30 min) e essa enzima demonstrou aproximada afinidade para ambos os substratos (GSH e CDNB) visto que encontrou o valor de K_M entre 100 e 111 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o CDNB e para GSH entre 104 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.²¹ Em outro estudo realizado com a enzima glutatona S-transferase comercial de fígado equino, foi encontrado menor valor de K_M para a GSH (0,083 mmol L⁻¹) em relação ao CDNB (0,15 mmol L⁻¹).²² Destaca-se que os dados do presente estudo foram registrados por meio de medidas espectrofotométricas e os estudos comparativos foram realizados medindo-se resposta eletroquímica.

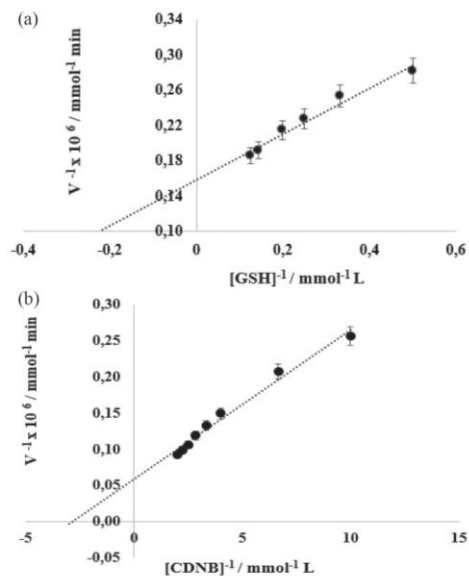


Figura 5. Plotagem do inverso da velocidade pelo inverso da concentração de (a) GSH e (b) CDNB conforme método Lineweaver-Burk

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de GST em relação ao CDNB e a GSH

Parâmetros	Resultados	
	CDNB	GSH
V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	0,017	0,0063
K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	350	1620

Em análise, com essa mesma enzima purificada de fígado de ratos, com o substrato CDNB os autores encontraram V_{max} de 0,016 mmol min⁻¹ e o K_M de 0,323 mmol L⁻¹ espectrofotometricamente.²³ A diferença verificada entre os valores dos parâmetros cinéticos obtidos no presente estudo que utilizou enzima comercial de fígado equino e os encontrados na literatura, pode estar relacionada ao tipo de técnica analítica aplicada e ao tipo da enzima. Os autores esclarecem que a variação dos valores pode ser dependente da enzima purificada, tendo em vista que também encontraram diferença de valores em seus estudos, onde utilizou-se a GST extraída de cérebro bovino.²³

Considerando o menor valor de K_M obtido, pode-se afirmar que o CDNB se mostrou o melhor substrato para a enzima GST. Esse resultado está de acordo com o que foi mostrado anteriormente pelo gráfico de Pareto na Figura 2. Os seguintes ensaios cinéticos, com a enzima GST, foram realizados na presença dos inibidores piretroides.

Cinética de inibição por inseticidas piretroides

Os resultados obtidos com os ensaios cinéticos contendo variadas concentrações de CDNB, concentrações fixas de GSH e dos quatro pesticidas piretroides estudados, e carga enzimática fixa, estão apresentados nos gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, cujos valores de R^2 foram de 0,98 (deltametrina) a 0,99 (aletrina, cipermetrina e fenpropatrina) (Figura 6).

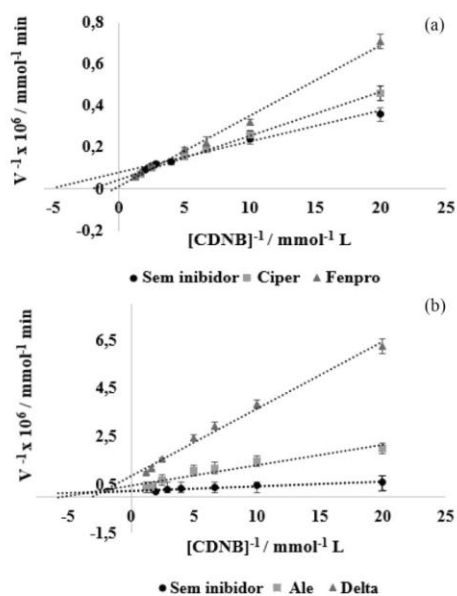


Figura 6. Representação de Lineweaver-Burk mostrando o efeito da concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ para cada inibidor (pesticida): (a) cipermetrina e fenpropatrina; (b) aletrina e deltametrina na reação cinética de GSH-CDNB catalisada por GST

A partir dos gráficos de Lineweaver-Burk, foi possível calcular a constante de inibição- K_i e determinar o tipo de inibição enzimática (Tabela 4). Os estudos *in vitro* mostraram que a atividade da enzima foi inibida por todos os pesticidas piretroides, com valor de K_i variando de $0,12$ a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentando a seguinte ordem de inibição do maior para o menor valor K_i : deltametrina > cipermetrina > aletrina > fenpropatrina. Esse resultado indica que o maior efeito inibitório sobre a GST foi apresentado pelo composto deltametrina. A constante de inibição- K_i reflete a interação potencial entre a enzima e o inibidor.²²

No trabalho realizado com o composto deltametrina, os valores de K_i registrados foram inferiores aos do presente estudo, sendo $5,61 \pm 0,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando concentração fixa de CDNB e variando a concentração de GSH e $7,96 \pm 0,97 \mu\text{mol L}^{-1}$ em concentração fixa de GSH, variando CDNB, utilizando GST de placenta humana.²⁴ Em outra análise, foi utilizada GST purificada de fígado de peru, GSH como substrato principal, e encontrou-se $0,22 \pm 0,118 \text{ mmol L}^{-1}$ para o piretrotide cipermetrina,²⁵ valor esse mais elevado em comparação ao registrado na presente pesquisa que utilizou CDNB como substrato. Pode-se inferir que tais variações nos valores de K_i estejam

relacionadas aos diferentes tipos de isoenzimas de GST usadas nos experimentos.

Os valores das constantes de inibição foram submetidos à análise de variância e as médias, foram comparadas pelo teste *t* de Student não pareado considerando $p < 0,05$. Os resultados mostraram diferença significativa para dois dos compostos piretroides, conforme indicado na Tabela 4.

Dentre os inibidores avaliados, os compostos cipermetrina e fenpropatrina inibiram competitivamente a enzima, ou seja, competiram diretamente com o substrato pelo sítio de ligação da GST. Os demais apresentaram inibição não competitiva (inibição mista) indicando que os inibidores se ligam tanto à enzima quanto ao complexo enzima-substrato. Esses diferentes comportamentos de inibição podem estar relacionados com os mecanismos de reversibilidade apresentados por cada tipo de composto inibidor. Alguns inibidores enzimáticos são substâncias que possuem estrutura parecida com as dos substratos enzimáticos, mas que não reagem ou reagem lentamente com a enzima; outros afetam a atividade catalítica sem interferir na ligação dos substratos; enquanto outros podem realizar ambos os processos.²⁶

Quanto aos resultados de IC_{50} , estão demonstrados na Tabela 4, em que se pode observar que o composto deltametrina se apresentou aproximadamente 3,3 vezes menor que a aletrina com IC_{50} de 4,3. Esse valor mostra que o piretrotide deltametrina reduziu a atividade da enzima GST pela metade, mesmo estando em concentração mais baixa. Esse resultado apontou sua forte capacidade inibitória em relação aos demais pesticidas analisados. Corroborando esse resultado, a literatura relata que, entre os piretroides, a deltametrina foi o composto químico originado da inclusão do grupo substituinte α -ciano no grupo 3-fenoxibenzila, atribuindo maior potência inseticida em relação a outros compostos piretroides previamente sintetizados, como a permetrina.⁴

É importante destacar que os piretroides são amplamente utilizados desde 1970²⁷ e se tornaram uma preocupação pública por causa da contaminação ambiental e os efeitos tóxicos sobre grupos de animais não alvo, os quais desfavorecem a biodiversidade e o equilíbrio ambiental.^{28,29}

Muitos compostos piretroides se apresentam como uma mistura complexa de isômeros com dois ou mais carbonos assimétricos, e sua composição pode ser um importante parâmetro toxicológico e ecotoxicológico, pois normalmente a atividade química e o destino ambiental podem diferir de acordo com o isômero considerado.^{30,31}

Contaminação aquática por pesticidas piretroides

Saber o comportamento dos pesticidas no ambiente é imprescindível para prever o risco de contaminação ambiental. Assim, dependendo de suas características os pesticidas podem permanecer em diferentes compartimentos do ambiente, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea.³² Tendo em vista essa avaliação, encontram-se demonstradas na Tabela 5 as características físico-químicas dos inseticidas piretroides analisados.

Tabela 4. Equação linear, valores de K_i , IC_{50} e tipo de inibição sobre a GST

Composto piretrotide	Equação linear	K_i ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IC_{50} (mg L^{-1})	Tipo de inibição
Aletrina	$y = 13579x + 17508$	$0,68^a \pm 0,10$	$4,3 \pm 0,49$	Não competitiva
Cipermetrina	$y = 22074x + 39488$	$1,00^a \pm 0,31$	$2,9 \pm 0,20$	Competitiva
Deltametrina	$y = 283067x + 804505$	$20,0^b \pm 0,72$	$1,3 \pm 0,22$	Não competitiva
Fenpropatrina	$y = 33903x + 13584$	$0,12^c \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,17$	Competitiva

K_i = constante de inibição, calculada a partir da representação de Lineweaver-Burk, na presença do inibidor. Valores de K_i com mesma letra, na vertical, não diferem significativamente entre si, no nível de 95% de probabilidade, pelo teste *t* de Student não pareado. IC_{50} = concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

Tabela 5. Características físico-químicas dos inseticidas piretroides estudados

Composto piretroide	S_w mg L ⁻¹	DT ₅₀ solo (dias)	DT ₅₀ água (dias)	K_{oc} mL g ⁻¹	Log K_{ow}
Aletrina	0,0001 (B)	60 (MP)	-	1400 (LM)	4,96 (A)
Cipermetrina	0,009 (B)	21,9 (NP)	3 (MR)	307558 (NM)	5,55 (A)
Deltametrina	0,0002 (B)	21 (NP)	17 (L)	10240000 (NM)	4,6 (A)
Fenpropratrina	0,33 (B)	28 (NP)	1 (MR)	5000 (NM)	6,04 (A)

NP = não persistente; MP = moderadamente persistente; L = lento; MR = moderadamente rápido; A = alto; B = baixo; LM = ligeiramente móvel; NM = não móvel; (-) = Dado indisponível. Fonte: elaborado a partir de PPDB - *Pesticide Properties Database*.

Pode-se observar que os compostos analisados apresentam baixa solubilidade em água (S_w), indicando que podem sofrer lenta remoção através de águas pluviais e pouca capacidade de migrarem no ambiente. Esse atributo físico-químico se refere à probabilidade dos contaminantes serem carregados superficialmente no solo e atingirem as águas superficiais.³²

Os altos valores para os coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}) registrados, sinalizam a tendência bioacumulativa dos quatro compostos piretroides, nos tecidos dos seres vivos. Esse parâmetro determina o caráter lipofílico da molécula do contaminante, ou seja, a afinidade por fases orgânicas, como as membranas biológicas.³³

Quanto ao tempo de meia vida (DT₅₀), apenas para um ingrediente ativo (aletrina) mostrou-se moderadamente persistente no solo, enquanto, para a água, este dado não estava disponível. Os demais inseticidas piretroides não indicaram persistência no solo. O tempo de permanência na água apresentou-se como moderadamente rápido para dois dos piretroides (cipermetrina e fenpropratrina) e lento para um deles (deltametrina).

Os valores do coeficiente de adsorção a matéria orgânica (K_{oc}) mostram que os pesticidas analisados não apresentam mobilidade ou são apenas ligeiramente móveis no solo. Medidas altas para o K_{oc} indicam que os contaminantes se fixam com firmeza à matéria orgânica do solo, podendo ser transportados através de partículas de sedimento, e não pela água.³⁴

Assim, conforme os critérios analisados, os resultados para o método de GOSS (Tabela 6) mostraram a possibilidade de contaminação de águas superficiais (rios, lagos e lagoas) por compostos piretroides. Os valores indicaram médio potencial de transporte em associação ao sedimento em suspensão e baixo para o transporte dissolvido em água, para três dos pesticidas (cipermetrina, deltametrina e fenpropratrina). Apenas para um composto, aletrina, foi observada alta potencialidade de chegar às águas de superfície através do transporte associado ao sedimento, e média potencialidade, dissolvido em água.

Em ambas as formas, em maior ou menor grau, esses pesticidas podem atingir as espécies aquáticas e provocar impactos negativos sobre elas, seja estando retidos no sedimento ou suspensos na coluna de água. Os peixes, por exemplo, podem sofrer alta toxicidade, devido às propriedades lipofílicas, que fazem com que tais contaminantes sejam absorvidos pelas guelras³⁵ e, assim, pode ocorrer processo de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.

Uma vez que estejam presentes na água, os principais efeitos sobre os organismos incluem alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento.³⁶

Tabela 7. Potencial de lixiviação dos inseticidas piretroides de acordo com o Índice GUS

Pesticida	Aletrina	Cipermetrina	Deltametrina	Fenpropratrina
Índice GUS	1,52	-1,99	-3,98	-0,80
Análise de GUS	NL	NL	NL	NL

NL = não sofre lixiviação. Fonte: elaborado a partir de PPDB - *Pesticide Properties Database*.

A presença de agrotóxicos em mananciais também pode ser prejudicial para os seres humanos, quando a água é utilizada para abastecimento público, tendo em vista que existe a necessidade de tecnologias mais complexas e seguras de tratamento em relação às que normalmente são usadas para obter a potabilidade.³⁷

Tabela 6. Potencial de transporte para os inseticidas piretroides de acordo com o Método de GOSS

Potencial	Potencial de transporte associado ao sedimento	Potencial de transporte dissolvido em água
Aletrina	Alto	Médio
Cipermetrina	Médio	Baixo
Deltametrina	Médio	Baixo
Fenpropratrina	Médio	Baixo

Fonte: elaborado a partir de PPDB - *Pesticide Properties Database*.

Os resultados para os índices de GUS (Tabela 7) evidenciaram que os quatro pesticidas piretroides, não apresentam potencial de contaminação para águas subterrâneas, uma vez que não sofrem lixiviação (GUS < 1,8).

A lixiviação ocorre quando a água se infiltra no solo e avança em profundidade, atingindo o lençol freático.³⁸ Quanto menor o valor de meia-vida, menos lixiviável o composto se apresenta. E no caso de pesticidas com valores reduzidos de K_{oc} , a meia vida passa a exercer influência na lixiviação. Quanto maior o valor de DT₅₀, maior será o potencial de contaminação das águas, dado o maior tempo necessário para a degradação do pesticida no solo e sua consequente permanência no ambiente.³⁹ Além da adsorção ao solo, DT₅₀ e a solubilidade em água, a tendência de um pesticida ser lixiviado depende de outras condições, como o tipo de solo, presença e preservação da cobertura vegetal, declividade do relevo e incidência de chuvas.⁴⁰ Também podem sofrer degradação pela influência de outros fatores físicos, químicos e biológicos.⁴¹

CONCLUSÕES

Os resultados cinéticos através de espectrofotometria indicaram que os quatro inseticidas piretroides afetam a GST, reduzindo a sua atividade catalítica, principalmente o composto deltametrina, que apresentou maior potencial inibitório, o qual foi analisado através dos valores K_i e IC_{50} , utilizando-se o CDNB como substrato principal. Embora os inseticidas aplicados neste estudo pertençam à mesma

classe, mostraram mecanismo de inibição diferentes dependendo do composto.

A avaliação quanto ao destino no ambiente indicou que os inseticidas podem se fixar principalmente às partículas do solo e sedimento, e através do escoamento superficial podem atingir o meio aquático. Uma vez nesse ambiente, podem se depositar na região de fundo, entrar em contato com as espécies bentônicas e assim promover uma acumulação progressiva através dos níveis tróficos, colocando em risco a saúde humana, seja pela alimentação ou pelo consumo da água.

Os dados apurados com esta pesquisa demonstraram a viabilidade do emprego da enzima glutatona S-transferase como molécula de bioconhecimento em trabalhos futuros no que tange ao desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas piretroides.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP/UFMA), pelo apoio institucional.

REFERÊNCIAS

- Balci, N.; Türkan, F.; Şakiroğlu, H.; Aygün, A.; Şen, F.; *Heliyon* **2019**, *5*, e01422.
- Aktar, W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A.; *Interdiscip. Toxicol.* **2009**, *2*, 1.
- Santos, M. A. T. Dos; Areas, M. A.; Reyes, F. G. R.; *Aliment. Nutr.* **2007**, *18*, 339.
- Soderlund, D. M.; Clark, J. M.; Sheets, L. P.; Mullin, L. S.; Piccirillo, V. J.; Sargent, D.; Stevens, J. T.; Weiner, M. L.; *Toxicology* **2002**, *171*, 3.
- Morgan, M. K.; MacMillan, D. K.; Zehr, D.; Sobus, J. R.; *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2018**, *28*, 40.
- Gan, J.; Lee, S. J.; Liu, W. P.; Haver, D. L.; Kabashima, J. N.; *J. Environ. Qual.* **2005**, *34*, 836.
- Trevizan, L. R. P.; Baptista, G. C.; *Sci. Agric.* **2000**, *57*, 199.
- Mello, I. N. K.; Silveira, W. F.; *Acta Vet. Bras.* **2012**, *6*, 94.
- Sánchez-Bayo, F.; Goka, K.; Hayasaka, D.; *Front. Environ. Sci.* **2016**, *4*, 1.
- Islam, S.; Sajib, S. Das; Jui, Z. S.; Arabia, S.; Islam, T.; *Sci. Rep.* **2019**, *1*.
- Cummins, I.; Dixon, D. P.; Freitag-Pohl, S.; Skipsey, M.; Edwards, R.; *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43*, 266.
- Kumar, S.; Trivedi, P. K.; *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1.
- Borah, H.; Dutta, R. R.; Gogoi, S.; Medhi, T.; Puzari, P.; *Anal. Methods* **2017**, *9*, 4044.
- Carvalho Neta, R. N. F.; Abreu-Silva, A. L.; *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2013**, *41*, 217.
- Ribeiro, E. B.; Bastos, L. S.; Galeno, L. S.; Mendes, R. S.; Garino, F.; Carvalho-Neta, R. N. F.; Costa, F. N.; *Mar. Pollut. Bull.* **2016**, *113*, 182.
- Ribeiro, E. B.; Noleto, K. S.; de Oliveira, S. R. S.; Batista de Jesus, W.; de Sousa Serra, I. M. R.; de Almeida, Z. S.; Andrade, T. S. O. M.; Soares, R. A.; Antonio, Í. G.; Santos, D. M. S.; Jorge, M. B.; Carvalho Neta, R. N. F.; *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *158*, 111348.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B.; *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130.
- Goss, D. W.; *Weed Sci. Soc. Am.* **1992**, *6*, 701.
- Gustafson, D. I.; *Environ. Toxicol. Chem.* **1989**, *8*, 339.
- Rover Júnior, L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 112.
- Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M.; *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 46.
- Borah, H.; Gogoi, S.; Kalita, S.; Puzari, P.; *J. Electroanal. Chem.* **2018**, *828*, 116.
- Torres, M. C. L.; Soares, N. de F. F.; Maia, J. F.; *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2004**, *24*, 243.
- Markus, V.; Terali, K.; Dalmizrak, O.; Ozer, N.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *61*, 18.
- Güller, P.; Akkemik, E.; Kör, S.; Çiftçi, M.; *J. Inst. Sci. Technol.* **2018**, *8*, 211.
- Voet, D.; Voet, J. G.; *Bioquímica*; 4th ed.; Artmed editora: Porto Alegre, 2013.
- Montanha, F. P.; Pimpão, C. T.; *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* **2012**, *9*, 58.
- Chen, S.; Chang, C.; Deng, Y.; An, S.; Dong, Y. H.; Zhou, J.; Hu, M.; Zhong, G.; Zhang, L.-H.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2147.
- Xiong, J.; Zhang, X.; Huang, J.; Chen, C.; Chen, Z.; Liu, L.; Zhang, G.; Yang, J.; Zhang, Z.; Zhang, Z.; Lin, Z.; Xiong, N.; Wang, T.; *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 995.
- Ye, J.; Zhao, M.; Liu, J.; Liu, W.; *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 2371.
- Parente, C. E. T.; Azevedo-Silva, C. E.; Meire, R. O.; Malm, O.; *Orbital* **2018**, *10*, 337.
- Cabrera, L.; Costa, F. P.; Primel, E. G.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1982.
- Milhome, M. A. L.; de Sousa, D. de O. B.; Lima, F. de A. F.; Nascimento, R. F. do; *Eng. Sanit. e Ambient.* **2009**, *14*, 363.
- Guarda, P. M.; Pontes, A. M. S.; Domiciano, R. de S.; Gualberto, L. da S.; Guarda, E. A.; *Desafios – Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins* **2020**, *7*, 123.
- Rehman, H.; Aziz, A. T.; Saggi, S.; Abbas, Z. K.; Mohan, A.; Ansari, A. A.; *Journal of Entomology and Zoology Studies* **2014**, *2*, 60.
- Oliveira, G. A. V.; Silva, J. M. S. F.; *Quim. Nova* **2017**, *40*, 726.
- Fernandes Neto, M. L.; Sarcinelli, P. N.; *Eng. Sanit. Ambiental* **2009**, *14*, 69.
- Rebelo, R. M.; Caldas, E. D.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1199.
- Ferracini, V. L.; Pessoa, M. C. Y. P.; Silva, A. S.; Spadotto, C. A.; *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2001**, *11*, 1.
- Dellamatrice, P. M.; Monteiro, R. T. R.; *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **2014**, *18*, 1296.
- Vryzas, Z.; *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2018**, *4*, 5.



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Figura H1- Artigo publicado no periódico Química Nova.

APÊNDICE I



Figura I1 - Artigo submetido ao periódico Sensors and Actuators Reports.