



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FERNANDA GABRIELLE SOARES DA SILVA**

**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**

São Luis

2016

**FERNANDA GABRIELLE SOARES DA SILVA**

**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**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Maranhão, para a  
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gilvanda Silva Nunes

São Luis

2016

Silva, Fernanda Gabrielle Soares da.

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 / Fernanda Gabrielle Soares da Silva. - 2016.

72 f.

Orientador(a): Gilvanda Silva Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Acetilcolinesterase. 2. Biossensor. 3. Pesticidas organofosforados. 4. Solos. 5. Águas subterâneas. I. Nunes, Gilvanda Silva. II. Título.

**FERNANDA GABRIELLE SOARES DA SILVA**

**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**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Maranhão, para a  
obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em:     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Silva Nunes  
Orientador-DETQI-UFMA

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Cícero Wellington Brito Bezerra  
DEQUI-UFMA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luiza Maria Ferreira Dantas  
DETQI-UFMA

**Aos meus pais**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por seu amor imenso e misericórdioso.

À Universidade Federal do Maranhão por me capacitar.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante o período de realização do Mestrado.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Gilvanda, pela dedicação, oportunidades, apoio e orientação durante a execução deste trabalho.

Aos meus amados pais, por tudo o que sou, pelo amor e dedicação a mim fornecidos. Em especial àquela a quem tenho a honra de chamar de mãe.

Aos meus irmãos, em especial à Mariana, minha fonte de esperança e força.

Aos meus tios, tias, primos, primas, avô, avós e madrinhas, por todo o apoio que sempre me deram, em especial à tia Natividade por ser muito mais que tia.

Ao meu amado Jardel, por seu amor, cumplicidade, companheirismo e dedicação durante esses anos e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus colegas de laboratório, Lorena, Ingrid, Francisco, Laiane, Helilma, Erison, Tayane e Temístocles, que sempre me auxiliaram no laboratório e fizeram melhores os meus dias.

A todos os meus amigos que acreditaram em mim.

À minha Pastoral da Acolhida, do Santuário de N. Sra. da Conceição, Monte Castelo, por ser meu refúgio e por restaurar as minhas forças.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Quando a noite esconde a luz, Deus acende as estrelas.”*

*Padre Fábio de Melo*

## RESUMO

O controle da qualidade de solos e águas subterrâneas tem-se tornado uma necessidade cada vez maior, pois as atividades humanas têm levado à contaminação de ecossistemas e afetado a saúde humana. A agricultura, por exemplo, tem deixado nos ecossistemas resíduos de inseticidas organofosforados (OFs), altamente tóxicos. Para se fazer uma análise dos impactos provocados por esses compostos em áreas agrícolas, é necessário que se tenha valores de referência de qualidade tomados em áreas não antropizadas, que apresentem mesma tipologia de solos e águas subterrâneas. Nesse particular, o ideal é que estes compostos não estejam presentes nesses ecossistemas. No presente trabalho, um biossensor eletroquímico à base da enzima acetilcolinesterase, imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído em presença de uma macroalga estuarina, foi utilizado para analisar pesticidas OFs em amostras de solo e de águas subterrâneas coletadas em áreas sem interferência humana, em todo o Estado do Maranhão, Brasil. Os biossensores empregados apresentaram, após otimização, sensibilidade com limite de detecção entre 0,054 e 1,44  $\mu\text{g/L}$ , reprodutibilidade com coeficientes de variação, CVs, intramedidas entre 8,3 e 9% e estabilidade, apresentando mínimas variações nas respostas após armazenados por 3 meses, o que os tornou adequados para serem utilizados no monitoramento de organofosforados nas matrizes ambientais. Também foram analisados alguns parâmetros físico-químicos de qualidade de águas e solos, tendo sido verificado que estes encontram-se dentro dos padrões da legislação brasileira. A monitoração da presença de OFs, empregando o biossensor aqui descrito, possibilitou descartar a hipótese de contaminação por esses poluentes, não obstante se saiba que tais compostos podem ter elevada mobilidade nos compartimentos ambientais.

Palavras-chaves: acetilcolinesterase; biossensor; pesticidas organofosforados; solos; águas subterrâneas.

## ABSTRACT

The quality control of soil and groundwater has become an increasing need because human activities have led to contamination of ecosystems and affected human health. Agriculture, for instance, has left ecosystems waste organophosphate insecticides (OFs), highly toxic. In order to make an analysis of the impacts of these compounds in agricultural areas, it is required to have reference values taken in undisturbed areas, presenting the same type of soil and groundwater. In this regard, the ideal is that these compounds are not present in these ecosystems. In this paper, an electrochemical biosensor based on the acetylcholinesterase enzyme, immobilized by crosslinking with glutaraldehyde in the presence of estuarine macroalgae, was used to analyze levels of OFs pesticides in soil and groundwater samples collected in areas without human interference, throughout the state of Maranhão, Brazil. Biosensors applied presented, after optimization, sensitivity with detection limit between 0,054 and 1,44  $\mu\text{g/L}$ , reproducibility with variation coefficient, CVs, internal measure between 8.3 and 9% and stability, showing minor variation in responses after being stored for 3 months), which made them suitable to be used in the organophosphates monitoring in the environmental matrices. Were also analyzed some physico-chemical parameters of quality of waters and soils, it has been verified that these are within the standards of the Brazilian legislation. The monitoring of the presence of levels, using the biosensor described herein, enabled to discard contamination hypothesis by these pollutants, nevertheless it is known that such compounds can have high mobility in environmental compartments.

Keywords: acetylcholinesterase; biosensor, organophosphate pesticides; soils; groundwater.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados no preparo da pasta enzimática a ser aplicada no eletrodo de trabalho-----	26
<b>Tabela 2.</b> Informações sobre os pontos tomados para amostragem de solos em áreas não antropizadas, em todo o Estado do Maranhão-----	27
<b>Tabela 3.</b> Informações sobre os pontos tomados para amostragem de águas subterrâneas em áreas não antropizadas, em todo o Estado do Maranhão-----	34
<b>Tabela 4.</b> Curvas analíticas e sensibilidade do biossensor AChE (EE) para diferentes inseticidas OFs-----	43
<b>Tabela 5.</b> Caracterização físico-química dos solos do Maranhão-----	44
<b>Tabela 6.</b> Caracterização físico-química das águas subterrâneas do Maranhão-----	48
<b>Tabela 7.</b> Inibições relativas geradas pela imersão do biossensor nos extratos de solos-----	50
<b>Tabela 8.</b> Inibições relativas geradas pela imersão do biossensor nas águas subterrâneas e nos seus extratos-----	53
<b>Tabela 9.</b> Matriz de correlação para os parâmetros físico-químicos-----	56
<b>Tabela 10.</b> Autovalores e variância total dos dados de análises físico-químicos das águas---	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Principais rotas de transporte e degradação de pesticidas no meio ambiente-----	18
<b>Figura 2</b> - Representação da formação do complexo enzimático-----	22
<b>Figura 3</b> - Reação de hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima AChE-----	23
<b>Figura 4</b> - Biossensor serigrafado de três eletrodos: Trabalho (grafite contendo a enzima AChE, a macroalga e o mediador TCNQ); Ag/AgCl (referência) e grafite (auxiliar)-----	25
<b>Figura 5</b> - Fluxograma das etapas de preparação das amostras de solo e extração dos compostos organofosforados-----	35
<b>Figura 6</b> - Fluxograma das etapas de extração e pré-concentração dos compostos organofosforados em amostras de águas subterrâneas-----	39
<b>Figura 7</b> - Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor à base da enzima acetilcolinesterase, AChE, na ausência e na presença da macroalga estuarina hidrolisada----	42
<b>Figura 8</b> - Dendograma da Análise de Cluster para as amostras de água-----	54
<b>Figura 9</b> - A Variação da variância explicada em função dos autovalores de Kaiser-----	57
<b>Figura 10</b> - Gráfico das cargas de dois Componentes Principais (CP1 x CP2) -----	58
<b>Figura 11</b> - Projeção das amostras analisadas no plano dos Componentes Principais, por agrupamento-----	59
<b>Figura 12</b> - Superfície de resposta em 3Dimensões –Potencial de Oxirredução (ORP) <i>versus</i> Salinidade <i>versus</i> Inibição -----	60
<b>Figura 13</b> - Superfície de resposta em 3Dimensões –Potencial de Oxirredução (ORP) <i>versus</i> Oxigênio Dissolvido (OD) <i>versus</i> Inibição -----	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina  
AChE - Acetilcolinesterase  
ACN - Acetonitrila  
ACP - Análise de Componentes Principais  
ATChCl - Cloreto de Acetilcolina  
BS - Bases Solúveis  
BSA - Soroalbumina Bovina  
CTC - Capacidade de Troca Catiônica  
CV - Coeficiente de Variação  
DCM - Diclorometano  
DDT - 1,1,1-Tricloro-2-bis(p-clorofenila)-etano  
DTNB - 5,5-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)  
EE - Enguia Elétrica  
Et-Ac - Acetato de Etila  
HEC - Hidroxietilcelulose  
IR - Inibição Relativa  
Kcat - Constante Catalítica  
Kd – Constante de Dissociação  
K<sub>H</sub> - Constante da Lei de Henry  
Koc – Constante de Partição de Carbono Orgânico  
Kow - Coeficiente de Partição Octanol-Água  
LD - Limite de Detecção  
LQ - Limite de Quantificação  
MeOH - Metanol  
MO - Matéria Orgânica  
n-Hex - n-Hexano  
OD - Oxigênio Dissolvido  
OF - Organofosforado  
ORP - Potencial de Oxirredução  
PBS - Solução Tampão Fosfato  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
PVC - Policloreto de Polivilina  
T - Temperatura  
t<sub>1/2</sub> - Tempo de Meia-Vida  
TCNQ - Tetracinaquinodimetano  
S - Solubilidade em Água  
SDT - Sólidos Dissolvidos Totais  
SPE - *Solid Phase Extraction*  
V = Valor de Saturação de Bases

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 PESTICIDAS</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 <i>Inseticidas organofosforados</i> .....	<b>15</b>
<b>3.2 O COMPARTIMENTO AMBIENTAL SOLO</b> .....	<b>16</b>
3.2.1 <i>Dinâmica dos organofosforados no solo</i> .....	<b>17</b>
<b>3.3 O COMPARTIMENTO AMBIENTAL ÁGUA SUBTERRÂNEA</b> .....	<b>19</b>
3.3.1 <i>Dinâmica dos organofosforados em água</i> .....	<b>19</b>
<b>3.4 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 ENZIMAS</b> .....	<b>21</b>
3.5.1 <i>Acetilcolinesterase</i> .....	<b>22</b>
3.5.2 <i>Atividade enzimática</i> .....	<b>23</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 LIMPEZA DO MATERIAL UTILIZADO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 PREPARO DO BIOSSENSOR</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 AMOSTRAGEM DE SOLOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5 AMOSTRAGEM DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.6 EXTRAÇÃO DOS OFS NAS AMOSTRAS DE SOLOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.7 EXTRAÇÃO DOS OFS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.9 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM OS BIOSSENSORES: DETECÇÃO DOS OFS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2 LINEARIDADE E SENSIBILIDADE DO BIOSSENSOR</b> .....	<b>44</b>
<b>5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>5.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DOS SOLOS EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE OFS</b> .....	<b>50</b>
<b>5.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA ATRAVÉS DO BIOSSENSOR</b> .....	<b>52</b>
<b>5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DE CORRELAÇÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, é evidente a necessidade de se controlar e prevenir a contaminação do solo, visando à manutenção de sua funcionalidade e à proteção da qualidade das águas superficiais e subterrâneas em todo o território brasileiro. Igualmente necessária é a prevenção à contaminação do subsolo e das águas subterrâneas, que são bens públicos e em alguns casos se constituem em reservas estratégicas para o abastecimento público e o desenvolvimento ambientalmente sustentável. Assim, a existência de áreas contaminadas pode configurar sério risco à saúde pública e ao ambiente. Nesse aspecto, torna-se necessário o estudo de parâmetros ambientais de áreas onde a interferência humana é desprezível, de forma a ter valores de referência de qualidade que sirvam de base comparativa para estudos em áreas supostamente contaminadas, como áreas urbanas, industriais, agrícolas, entre outras.

Entre as substâncias químicas tóxicas provenientes de atividades agrícolas, destacam-se os inseticidas organofosforados (OFs), que se encontram entre os pesticidas mais utilizados na agricultura (NASKEN *et. al*, 2015; WANG, *et. al*, 2015) e representam importantes classes de compostos tóxicos, porque esses compostos podem inibir a atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima que regula a acetilcolina, um neurotransmissor necessário para o bom funcionamento do sistema nervoso (LIU e WEI, 2014).

Por esse motivo, o monitoramento de resíduos de pesticidas em diversos ecossistemas ambientais é uma das exigências atuais, não só para a adequada comercialização dos produtos agrícolas, mas também visando a proteger a saúde humana e o ambiente. Deste modo, é urgente o favorecimento de condições que colaborem para o diagnóstico da situação, por meio da implantação de um eficiente monitoramento, visando ao controle efetivo de níveis de pesticidas nas águas subterrâneas e em solos.

Existem muitas técnicas capazes de detectar com alta sensibilidade e eficiência os pesticidas em níveis traços em diferentes matrizes, no entanto, a maioria destas técnicas demanda de um grande processo de pré-tratamento e da utilização de aparelhos sofisticados, o que gera aumento nos custos e no tempo de análise (KESTWAL, BAGAL- KESTWAL e CHIANG, 2015, SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de detectar esses compostos com sensibilidade e eficiência. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de biossensores tem emergido como alternativa promissora e atraído a atenção dos pesquisadores, pois apresentam rápidos tempos

de resposta, baixo custo e possibilidade de minituarização e portabilidade (WEI e WANG, 2015).

Neste trabalho, foi avaliada a qualidade ambiental em áreas-controle (não antropizadas ou minimamente antropizadas), isto é, supostamente não poluídas, no Estado do Maranhão, em relação não só às características físico-químicas dos solos e águas subterrâneas, mas também em relação à presença de resíduos dos inseticidas OFs nestas áreas. Inicialmente, foi descrito e caracterizado um biossensor amperométrico inovador (NUNES *et. al*, 2014), voltado para a detecção de pesticidas OFs, e depois tal protótipo foi empregado no monitoramento dessas substâncias químicas nas áreas selecionadas para estudo. Os resultados aqui apresentados poderão servir de base para um programa de monitoramento desses poluentes em áreas agrícolas em todo o Estado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a qualidade ambiental em relação aos parâmetros físicos-químicos de solos e águas subterrâneas do Estado do Maranhão e quanto à presença de pesticidas organofosforados nestes através de biossensores enzimáticos eletroquímicos.

### **2.2 Específicos**

- a) Preparar os biossensores do tipo serigrafado contendo a enzima e o mediador, a partir do preparo de uma pasta sensível da enzima;
- b) Verificar a eficiência do método analítico, empregando amostras reais, água e solos;
- c) Testar procedimentos de extração de pesticidas organofosforados em amostras de solos;
- d) Aplicar os novos sistemas biossensores na detecção desses pesticidas inibidores de colinesterases em solos e águas subterrâneas;
- e) Caracterizar solos e águas subterrâneas;
- f) Verificar a qualidade dos ecossistemas quanto às resoluções brasileiras.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Pesticidas

O crescimento da população mundial trouxe a necessidade do aumento dos produtos agrícolas, para isso nas últimas décadas o uso de pesticidas na agricultura mundial tem se tornado cada vez mais intenso (RIBEIRO *et. al*, 2013).

Denominam-se *pesticidas* as substâncias químicas, naturais ou sintéticas, utilizadas para exterminar, controlar ou combater as pragas (SILVA, 2011; ZAMBRONE, 1986).

As primeiras substâncias que foram utilizadas como pesticidas eram substâncias tóxicas naturais, como a nicotina, e substâncias inorgânicas, como enxofre. Com a descoberta do DDT [1,1,1-tricloro-2-bis(p-clorofenila)-etano], em 1940, começaram a ser usados pesticidas sintéticos e, desde então, inúmeros outros têm sido empregados (FERREIRA, 2005).

Embora inegável a contribuição benéfica para a produção de alimentos, o uso indiscriminado destes compostos pode causar sérios danos ao ambiente e à saúde humana (LEITE, 2013; RIBEIRO *et. al*, 2008).

Os organofosforados (OFs) são atualmente os inseticidas mais utilizados na agricultura mundial, e vieram substituir, juntamente com os carbamatos, os pesticidas clorados. No entanto, o uso intencional destes tem deixado resíduos nas plantas e no solo, podendo contaminar alimentos e os mananciais de água (FERREIRA, 2005), além das águas subterrâneas (NUNES *et. al*, 2012).

No Estado Maranhão, o uso de defensivos agrícolas tem crescido muito, sobretudo aqueles destinados à proteção de monocultivos, como a soja. Aliado a esse crescimento, há ainda a falta de conhecimento básico por parte dos trabalhadores rurais que utilizam esses compostos, o que tem ocasionado problemas sérios, não só no ponto de vista ambiental como de saúde pública (SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015).

##### 3.1.1 *Inseticidas organofosforados*

Inseticidas organofosforados (OFs) têm sido amplamente utilizados na agricultura e em aplicações domésticas como pesticidas, devido à sua elevada atividade inseticida e relativamente baixa persistência (LOKKA *et. al*, 2013; ESKENAZI e MAIZLISH, 1988).

Embora não sejam tão persistentes no ambiente quanto os pesticidas organoclorados, sua utilização pode causar danos em longo prazo ao ambiente e à saúde humana, pois muitos dos princípios ativos apresentam efeito bioacumulativo e alta toxicidade (WEI e WANG, 2015). A toxicidade destes compostos deve-se ao fato de inibirem irreversivelmente locais ativos catalíticos da enzima acetilcolinesterase (AChE), essencial à vida, pois permite a transmissão de sinais elétricos no sistema nervoso (SILVA, 2014; RAGHU *et. al.*, 2014).

A enzima AChE catalisa a hidrólise do seu substrato, a acetilcolina (ACh), gerando ácido acético, colina e elétrons que participam da rede de impulsos nervosos dos seres vivos animais. A ação tóxica desses compostos surge, portanto, a partir da inibição da atividade da AChE, levando ao acúmulo de acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas e, conseqüentemente, causando superestimulação colinérgica (KESIK *et. al.*, 2014). Esse efeito tóxico acarreta conseqüências graves em seres humanos, incluindo câimbras abdominais, tremor muscular, hipotensão, dificuldade em respirar, diarreia, batimentos cardíacos desaceleração (bradicardia), fasciculação muscular e paralisia (KAVRUK, ÖZALP e ÖKTEM, 2013; WILSON, 2005).

Tais agrotóxicos OFs, quando em contato com o solo, a água e o ar, podem persistir nesses compartimentos ambientais e também acumular-se no solo e na biota. Devido à sua moderada solubilidade em água, permanecem no solo ou seguem até as águas subterrâneas por lixiviação (KESTWAL, BAGAL- KESTWAL e CHIANG, 2015; SILVA, 2014; NUNES *et. al.*, 2012). Em função da elevada mobilidade no ambiente, sua alta toxicidade e grande aplicabilidade, o monitoramento desses compostos torna-se necessário e urgente em todo País.

### **3.2 O Compartimento Ambiental Solo**

O solo é a base de todos os ecossistemas, pois desempenha importantes funções para a sociedade e o ambiente. Ele se constitui por componentes orgânicos, minerais, gasosos e líquidos (NOGUEIROL, 2008). Além de ser fonte de nutrientes, é considerado, do ponto de vista ambiental, um “filtro” para a remoção de contaminantes (NOGUEIROL, 2008; BOLAN *et. al.*, 1999). Essa característica se deve às suas propriedades físicas: textura, porosidade, densidade, estrutura e permeabilidade. Através dos processos físicos (lixiviação e filtração), os solos propiciam as condições necessárias para que os processos de atenuação química ocorram (MARION, 2011).

Em áreas de climas tropicais, como é o caso do Brasil, existe uma grande diversidade dos tipos de solos, pelo fato de em uma mesma região haver enorme variação de fatores intrínsecos como pH, composição mineral, capacidade de troca iônica, teor de matéria orgânica, entre outros. Tudo isso torna os solos matrizes altamente complexas (MARTINS, 2010; HIGARASHI, 1999).

Por ser o local onde é feita a aplicação dos pesticidas, o solo é o compartimento do agrossistema que possui a maior possibilidade de ser contaminado por tais compostos. A contaminação pode dar-ser através da interação dos resíduos de pesticidas com as fases sólida, líquida e gasosa, e ainda com a porção viva do solo (SILVA, 2011; ANDREA, 1998).

Dependendo dos processos de atenuação que venham a ocorrer, os pesticidas podem ter diferentes destinos: mineralização total, permanência no solo por um longo tempo, contato com as águas subterrâneas ou biocumulação através da cadeia alimentar (PERES, 2000).

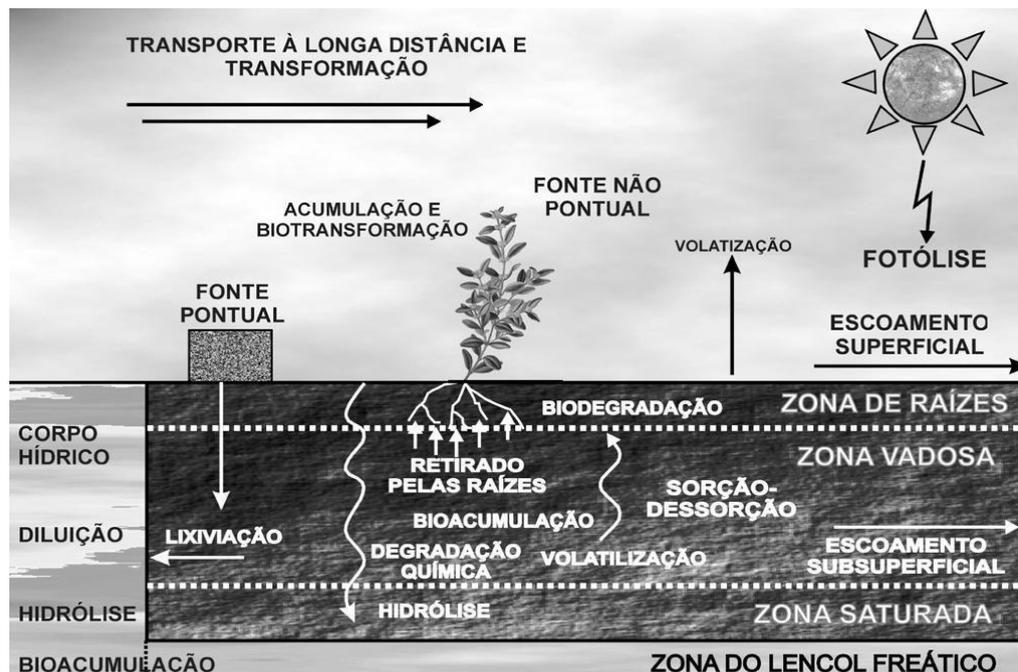
É importante ressaltar que um fator limitante para o uso do solo é a presença de metais pesados tóxicos (NOGUEIROL, 2008) e também a presença de contaminantes orgânicos tóxicos, como os pesticidas (PERES, 2000).

### *3.2.1 Dinâmica dos organofosforados no solo*

O solo atua como o principal receptor e acumulador de pesticidas, pois grande parte desses compostos não consegue atingir o organismo-alvo e acaba por alcançar esse compartimento ambiental (MARTINS, 2010; SILVA *et. al*, 2007).

Em contato com o solo, os pesticidas podem sofrer várias transformações físico-químicas e, dependendo delas, sofrerão destinos variados (PERES, 2000). A Figura 1 representa esquematicamente os principais processos de movimentação e degradação dos pesticidas na natureza.

**Figura 1-** Principais rotas de transporte e degradação de pesticidas no ambiente



Fonte: MARTINS (2010).

Considerando os processos demonstrados na Figura 1, merecem destaque os processos de lixiviação e escoamento superficial. Além das características químicas das moléculas, da forma e da quantidade de aplicação dos pesticidas, as propriedades físico-químicas destes compostos estão intimamente relacionadas a seu comportamento. Estas propriedades são: solubilidade em água ( $S$ ), coeficiente de dissociação ( $K_d$ ), coeficiente de partição de carbono orgânico ( $K_{oc}$ ), coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), constante de equilíbrio de ionização ácida ( $pK_a$ ), constante da lei de Henry ( $K_H$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) no solo e na água (MARTINS, 2010; CABRERA *et al.*, 2008), entre outras.

Além dessas características da molécula, os processos que desencadeiam a contaminação do solo dependem também das características do próprio solo (PERES, 2000). A matéria orgânica (MO) é o principal componente para a retenção de pesticidas não-iônicos, pois o aumento da quantidade de matéria orgânica aumenta a capacidade de adsorção destes pelos solos, diminuindo a lixiviação (SILVA, 2011; LUCHINI, 1995).

Outro fator importante é o pH, que na maioria das vezes determina a prevalência da degradação da molécula por um processo químico. O pH tem ainda um efeito bioquímico, pois exerce influência sobre o processo da atividade microbiana (SILVA, 2011; ANDREA, 1998).

### 3.3 O Compartimento Ambiental Água Subterrânea

Denomina-se água subterrânea toda água que fica abaixo da superfície da Terra. No Brasil, em geral, abastecem rios e lagos e representam parte da água da chuva que se infiltra no subsolo, sendo, portanto, importantes reservas de água doce. A distribuição dessas águas no Brasil é bastante variável, pois depende das condições climatográficas e se inter-relaciona no ciclo hidrológico (SILVA, 2006).

No Brasil, a água subterrânea é intensamente utilizada, sendo estimada a presença de no mínimo 400.000 poços com as mais diversas utilizações (SANTOS, 2014). O solo funciona como um filtro natural para a água subterrânea, retirando dela a maioria dos microorganismos através de processos como filtração, aeração e adsorção; no entanto, a retenção de contaminantes é dependente do tipo de solo em que se encontra. Em geral, as águas subterrâneas apresentam melhor qualidade quando comparadas às águas superficiais (SILVA, 2012; WHO, 2011).

Durante alguns anos, acreditou-se que as camadas de solo e rochas protegiam naturalmente as águas subterrâneas de qualquer contaminação; entretanto, esse pensamento foi desconstruído ao serem detectados traços de diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos nessas águas (SILVA *et. al*, 2014).

Por essa razão, atualmente, há uma preocupação mundial com o intuito de proteger as águas subterrâneas, o que tem levado os países a lançarem programas que avaliem a qualidade das mesmas (RIBEIRO *et. al*, 2007).

A legislação brasileira é considerada como uma das mais avançadas no mundo quando se refere aos recursos hídricos; entretanto, ainda há a necessidade de leis protecionistas mais específicas (ROCHA, 2014).

#### 3.3.1 Dinâmica dos organofosforados em água

Ao serem aplicados, os pesticidas tem como seus principais destinos os recursos hídricos (RIBEIRO *et. al*, 2007). Esses pesticidas podem entrar no sistema aquático por aplicação direta, dispersão por aplicação aérea ou terrestre, e podem ainda contaminar as águas subterrâneas pela lavagem de máquinas usadas nas aplicações, manuseio impróprio e descargas de restos de formulações em rios e lagos. Outra forma de contaminação dá-se através do transporte do solo pelos processos de escoamento superficial e lixiviação (GERALDES, 2012; SILVA, 2011).

Quando esses compostos estão em meio aquático, podem associar-se a sedimentos ou permanecer dissolvidos na água (SILVA, 2011; HASSETT *et. al*, 1975). Outro fator importante que pode influenciar no comportamento dos pesticidas em água é a exposição destes à radiação solar e, por conseqüente, a sua degradação fotoquímica (SILVA, 2011; LUCHINI, 1995).

O comportamento dos pesticidas em água também é um fator crucial, pois quanto maior a hidrossolubilidade, maior a facilidade de transporte destes do ponto de aplicação até rios e outros corpos d'água (SILVA, 2011; RAO *et. al*, 1983). Geralmente, os pesticidas quando se encontram nas águas subterrâneas estão em baixas concentrações e por longos períodos (GERALDES, 2012; BATISTA, 2003).

### **3.4 Biossensores Enzimáticos**

Existem muitas técnicas capazes de detectar com alta sensibilidade e eficiência os pesticidas em níveis traços em diferentes matrizes; no entanto, a maioria destas técnicas demanda um processo demorado de pré-tratamento, além da utilização de aparelhos sofisticados, o que gera aumento nos custos e no tempo de análise (KESTWAL, BAGALKESTWAL e CHIANG, 2015; SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015). Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos capazes de detectar esses compostos com a sensibilidade e a eficiência das técnicas tradicionais, porém com baixo custo e tempo de análise.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de biossensores tem emergido como alternativa promissora e atraído a atenção dos pesquisadores, pois estes protótipos apresentam rápidos tempos de resposta, baixo custo, capacidade de minituarização e portabilidade (WEI e WANG, 2015).

Biossensores são dispositivos capazes de transmitir informações analíticas utilizando um elemento biológico intimamente ligado ao transdutor. (SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015; THÉVENOT *et. al*, 2001). Alguns biocomponentes são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microorganismos, organelas e tecidos (vegetais, animais e fúngicos). Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (SILVA, 2014), merecendo destaque os biossensores enzimáticos.

O biossensor apresenta como característica fundamental a capacidade de combinar a atividade seletiva entre diferentes substratos de um elemento de bioreconhecimento, sensível a um analito de interesse, sendo esse o motivo de as enzimas serem o elemento biológico mais utilizado na construção de biossensores (PEREIRA, 2013; ALFAYA & KUBOTA, 2008; DU *et. al.*, 2008). A reação enzimática é monitorada diretamente através de vários tipos de transdutores (eletroquímico, óptico, fototérmico, amperométrico) (SILVA, 2011; PATEL, 2002).

Os biossensores apresentam as vantagens de, em geral, não estarem sujeitos a interferentes da matriz, apresentarem menores limites de detecção do que os métodos cromatográficos e a maioria dos biossensores podem ser usados diretamente nos extratos. Como desvantagem, os biossensores não discriminam os compostos presentes na amostra (FERREIRA, 2005).

Recentemente, tem-se desenvolvido biossensores utilizando diferentes abordagens no processo de imobilização da enzima, incluindo a utilização de biomassas como suporte, objetivando melhorar o desempenho dos ensaios enzimáticos (WEI e WANG, 2015; NUNES *et. al.*, 2014). O procedimento de imobilização da enzima, para construção dos biossensores utilizados neste trabalho, é baseado na incorporação de uma macroalga estuarina como suporte conforme desenvolvido por Nunes *et. al.* (2014). O biossensor final foi então utilizado na detecção de pesticidas em amostras ambientais reais.

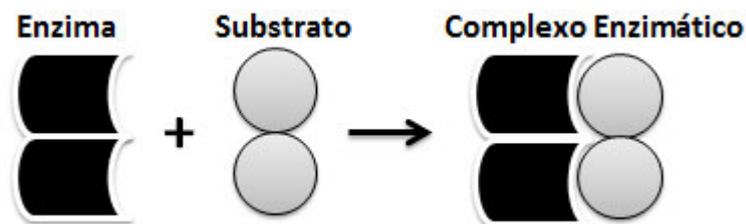
### **3.5 Enzimas**

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações bioquímicas através da interação física entre reagentes e produtos (SILVA, 2011). Elas possuem um alto grau de especificidade em relação aos seus substratos, aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições moderadas de temperatura e pH (MARTINEZ, 2011).

A principal desvantagem das enzimas na construção de biossensores se deve ao fato de apresentarem baixa estabilidade, principalmente na ocorrência de variação das condições físico-químicas do meio reacional (SILVA, 2011).

As enzimas são classificadas conforme as reações que catalisam; no entanto, observa-se que a maioria delas foi nomeada de acordo com o seu substrato, acrescentando-se o prefixo “ase”. As reações catalisadas por enzimas ocorrem no sítio ativo delas, no qual se liga uma molécula chamada substrato (MARTINEZ, 2011) (Figura 2).

**Figura 2-** Representação da formação do complexo enzimático



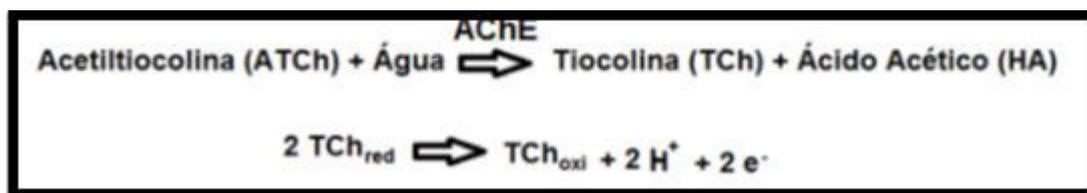
Fonte: Autora.

As enzimas têm sido muito utilizadas em diversas aplicações bioquímica, farmacêutica, bioanalíticas, biomédicas e industriais (SHAMAGSUMOVA *et. al*, 2015). Nas últimas décadas, têm sido exploradas também na construção de biossensores altamente seletivos para determinados tipos de analitos, incluindo os poluentes ambientais.

### 3.5.1 Acetilcolinesterase

Como já mencionado, no desenvolvimento de biossensores podem ser utilizadas várias enzimas, sendo que a acetilcolinesterase (AChE) tem sido a mais usada para essa finalidade, por apresentar elevada especificidade e estabilidade, sob condições ótimas de temperatura e pH (KESTWAL, BAGAL- KESTWAL e CHIANG, 2015; NUNES *et. al*, 2014; SASSOLAS, SIMON e MARTY, 2012).

A AChE é uma importante enzima e está presente no sistema nervoso central de organismos vivos. No sítio ativo da AChE ocorre a catálise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), favorecendo a transmissão dos impulsos nervosos (KESTWAL, BAGAL- KESTWAL e CHIANG, 2015). Tal enzima apresenta uma constante catalítica ( $K_{cat}$ ) em torno de  $10^4$ , dependendo da fonte, o que indica a capacidade da mesma hidrolisar cerca de 10 mil moléculas de ATCh por segundo (PEREIRA, 2013; DVIRA *et. al*, 2010). Essa hidrólise acontece de acordo com o esquema apresentado na Figura 3, que mostra a hidrólise de um substrato alternativo, a acetiltiocolina (ATCh), gerando tiocolina e acetato. Esse substrato, alternativo à acetilcolina (ACh), tem sido empregado por ser mais estável e possuir capacidade de se dimerizar no eletrodo de trabalho dos biossensores amperométricos, gerando assim o dobro de corrente que o substrato natural.

**Figura 3-** Reação de hidrólise da acetiltiocolina catalisada pela enzima AChE

Fonte: Autora.

Os biossensores enzimáticos baseados em AChE tem sido considerados altamente promissores para detecção de organofosforados, devido às características únicas dessa enzima e também porque o método utiliza a atividade enzimática para quantificar o analito (LIU e WEI, 2014).

### 3.5.2 Atividade enzimática

Atividade enzimática é a habilidade com que a enzima se liga ao substrato. Essa habilidade pode ser afetada por fatores como a presença de inibidores, pH e temperatura. Esses fatores podem aumentar, diminuir ou até mesmo suprimir a velocidade da reação catalítica (SILVA, 2014; HANSEN, 2011; DE CIRNE e PATACAS, 2007). Dentre os parâmetros para o desenvolvimento de um biossensor, a atividade enzimática representa o ponto mais importante ao se avaliar o potencial de aplicação de uma enzima (LEITE, 2013; MENDONÇA, 2011).

A imobilização da enzima, por sua vez, representa uma etapa fundamental para o desenvolvimento de biossensores, pois nessa etapa deve ser preservada ao máximo a atividade catalítica da enzima, além de manter a proximidade desta com o transdutor (YU *et. al*, 2015). Fatores como tempo de resposta, reprodutibilidade, estabilidade e sensibilidade do biossensor dependem diretamente da técnica de imobilização (LEITE, 2013).

Ao empregar a enzima AChE no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utiliza-se da atividade enzimática para quantificar os organofosforados, pois a enzima catalisa a hidrólise da acetilcolina, e o produto dessa reação produz um pico de oxidação irreversível. Quando o organofosforado entra em contato com a enzima, este inibe a atividade da AChE, diminuindo o pico de oxidação proveniente da reação de hidrólise (WEI e WANG, 2015; LIU e WEI, 2014).

Nesse trabalho, a enzima AChE foi utilizada no desenvolvimento de biossensores para detecção da presença de OFs, inibidores desta enzima, em amostras de solos e águas subterrâneas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório do Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

### 4.1 Limpeza do Material Utilizado

Toda a vidraria utilizada foi previamente lavada com solução de detergente Extran<sup>®</sup> alcalino a 5% (v/v), e depois enxaguados, sequencialmente, com água potável, água destilada e acetona. No caso de material volumétrico, a secagem foi feita ao ar; para os demais materiais, procedeu-se à secagem em estufa a cerca de 70°- 80° C.

### 4.2 Soluções e Reagentes

A enzima acetilcolinesterase (AChE) comercial extraída de enguia elétrica, cloreto de acetilcolina (ATChCl) e 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) foram obtidos de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO). A solução tampão fosfato (PBS, pH 7,2) foi preparada pela combinação de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , ambos da Merck. Acetato de sódio, EDTA, cisteína, metanol (MeOH), acetato de etila (Et-Ac), diclorometano (DCM), n-hexano (n-Hex), acetonitrila (ACN), sulfato de Sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Florisil<sup>®</sup>, lã de vidro, n-hexano, ácido clorídrico, cloreto de potássio, hidróxido de potássio, ácido sulfúrico, cloreto de cálcio foram também obtidos da Merck.

Para a etapa de imobilização enzimática, os seguintes reagentes foram empregados: glutaraldeído (Fluka Chemie, Basel, Suíça), hidroxietilcelulose, HEC (Fluka Chemie), soroalbumina bovina, BSA (Biochemical BDH Lim, Poole, Inglaterra) e grafite ultrapuro (Sigma-Aldrich, Brasil). Os padrões dos pesticidas organofosforados utilizados também foram obtidos da (Sigma-Aldrich, Brasil).

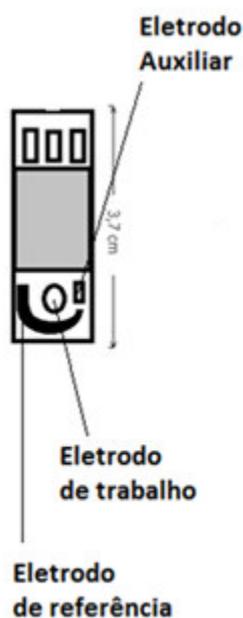
### 4.3 Preparo do Biossensor

Antes de cada imobilização, a atividade da AChE foi determinada espectrometricamente, empregando-se a metodologia cinética de Ellman *et. al* (1961), modificada por Nunes *et. al* (2001).

A preparação dos biossensores utilizados nesse trabalho foi previamente otimizada. Detalhes do seu preparo foram reportados por Nunes e colaboradores (2014). A seguir, uma descrição breve das etapas de preparo.

Os sensores originais foram impressos em PVC, sendo constituídos por 4 camadas sobrepostas, tendo o mediador tetraciaquinodimetano (TCNQ) (Sigma-Aldrich) no eletrodo de trabalho (NUNES *et. al*, 2014). O biossensor foi preparado adicionando-se uma pasta sensível contendo AChE na região de trabalho do sensor serigrafado (Figura 1) (NUNES *et. al*, 2014).

**Figura 4-** Biossensor serigrafado de três eletrodos: Trabalho (grafite contendo a enzima AChE, a macroalga e o mediador TCNQ); Ag/AgCl (referência) e grafite (auxiliar). Na parte circular (eletrodo de trabalho), a pasta enzimática foi manualmente depositada



Fonte: Autora.

As soluções de AChE, para imobilização no eletrodo de trabalho, foram diluídas diretamente no frasco, com PBS (pH 7,2), a partir de soluções-estoque, preparadas pela dissolução do pó da enzima em solução de NaCl 0,9 % (m/v). As soluções de trabalho foram preparadas mediante diluição de solução-estoque em PBS (pH 7,2). A macroalga da espécie

*Cladophoropsis membranacea* foi previamente hidrolisada, seca e pulverizada em graal de ágata, conforme previamente descrito por Nunes *et. al* (2014).

A pasta enzimática foi então preparada a partir da adição dos reagentes apresentados na Tabela 1, a uma mistura obtida previamente pela adição de 100 µL de solução de hidroetilcelulose (3 % m/v) a 100 mg de grafite, seguida de homogeneização. Uma porção de 2 mg desta pasta sensível foi imediatamente aplicada no eletrodo de trabalho de cada sensor. A atividade enzimática final foi de 1,52 mU/eletrodo.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados no preparo da pasta enzimática a ser aplicada no eletrodo de trabalho

REAGENTE ADICIONADO <sup>a</sup>	VOLUME OU MASSA ADICIONADA	PROPORÇÃO FINAL NA PASTA ENZIMÁTICA, APÓS HOMOGENEIZAÇÃO
Solução trabalho da enzima AchE	90 µL (volume determinado em função da atividade relativa da AChE na solução de trabalho)	Atividade relativa final: 240 mU/g da pasta
Solução de glutaraldeído a 25 % (m/v)	60 µL	16,5 % (m/m)
Solução de BSA a 3,2% (m/v)	10 µL	2,8 % (m/m)
Macroalga hidrolisada	4 mg	1,1 % (m/m)

<sup>a</sup>Adição feita a uma mistura de grafite e hidroxietilcelulose  
AChE: Acetilcolinesterase; BSA: Soroalbumina Bovina.

Fonte: Autora.

#### **4.4 Amostragem de solos**

Foram coletadas 50 amostras de solos em diferentes áreas do Maranhão com interferência antropogênica desprezível, no período de julho a agosto de 2015 (estação seca). As áreas foram selecionadas de forma a contemplar todos os tipos de solos e biomas presentes no Estado. A Tabela 2 apresenta informações sobre os pontos amostrais para solos, bem como seu georreferenciamento. Durante a amostragem, foram tomadas 10 subamostras de aproximadamente 100 g cada, coletadas da camada de até 20 cm de profundidade, em pontos de coletas com raios não superiores a 2 m em torno do ponto georreferenciado. As subamostras foram então combinadas via homogeneização por quarteramento, e a amostra final, de aproximadamente 1 Kg, acondicionada em saco de polietileno e preservada em caixa térmica a uma temperatura de 4°C, até chegada no laboratório.

**Tabela 2.** Informações sobre os pontos tomados para amostragem de solos em áreas não antropizadas, em todo o Estado do Maranhão

AMOSTRAS/ PONTOS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P1</b> <b>Aldeias</b> <b>Altas</b>	4°30'1.15"	43°29'10.40"	Estrada Povoado Santo Antônio	Argissolo	Patamar de Caxias	Cerrado
<b>P2</b> <b>Alto</b> <b>Parnaíba</b>	9°53'21.4"	46°10'07.7"	Povoado Porto Alegre	Neossolo Quartz (AREIAS QUARTZOZAS)	Cabeceiras do Parnaíba	Cerrado
<b>P3</b> <b>Parque do</b> <b>Mirador</b>	6° 47'45.2"	45°14'41.1"	Rio Itapecuru, Parque do Mirador	Gleissolo	Chapadas do Alto Itapecuru	Cerrado
<b>P4</b> <b>Carolina</b>	7° 16'53.8"	47° 02'15.4"	Estrada para a Serra do Caboclo, Parque Nacional da Chapada das Mesas	Neossolo Quartz	Planos Arenosos de Riachão	Cerrado
<b>P5</b> <b>Mirador</b>	6°43'7.2"	45°17'22.2"	Brejo Escuro, Parque do Mirador	Neossolo Quartz (areias quartzozas)	Chapadas do Alto Itapecuru	Cerrado
<b>P6</b> <b>PNLM</b>	2°35'07.03"	42°45'13.3"	Vila Atins	Neossolo Quartz	Tabuleiros dos Lençóis	Cerrado Elevação 9m
<b>P7</b> <b>Alcântara</b>	2°15'07.9"	44°33'56.1"	Estrada próxima ao Povoado Esperança	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico	Tabuleiros Costeiros	Amazônia (Litoral)
<b>P8</b> <b>São</b> <b>Benedito do</b> <b>Rio Preto</b>	3°18'50.1"	43°35'10.8"	Povoado Barra da Areia – APA Upaon-Açu	Plintossolo	Tabuleiros dos Lençóis Maranhenses Elevação: 94 m	Cerrado
<b>P9</b> <b>Ilha</b>	2°36'51.04"	44° 6'22.77"	Bom Jardim, Juçatuba, São José de Ribamar	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico	Tabuleiros Costeiros	Amazônia (Litoral)

Tabela 2. Continuação

AMOSTRAS/ PONTOS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P10</b> <b>Carutapera</b>	1°27'28.58"	46°3'44.10"	Povoado Sem Terra, Carutapera	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico	Superfície do Gurupi	Amazônia (Litoral)
<b>P11</b> <b>Parnarama</b>	5°51'07.04"	43° 12'48.05"	Povoado Coqueiro	Latossolo Amarelo	Tabuleiros do Parnaíba	Cerrado/Caatinga
<b>P12</b> <b>Paulo Ramos</b>	4°31'00.5"	45°23'44.4"	Fazenda Varão	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico	Plan. Dissecado Pindaré/ Grajaú	Amazônia
<b>P13</b> <b>Urbano Santos</b>	3°10'50.04"	43°10'46.04"	Povoado Guaribas II	Latossolo	Tabuleiros dos Lençóis Maranhenses Planalto	Cerrado Elevação 91 m
<b>P14</b> <b>Timbiras</b>	4°19'58.08"	44°02'21.04"	Povado Cavalo Morto	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico	Dissecado do Itapecuru Elevação 79 m	Cerrado
<b>P15</b> <b>Paulo Ramos</b>	4°34'33.4"	45°18'55.6"	Fazenda SABESA, Paulo Ramos	Argissolo Vermelho – amarelo eutrófico	Plan. Dissecado Pindaré/ Grajaú	Amazônia
<b>P16</b> <b>Loreto</b>	7°14'45.3"	45°08'45.9"	Estrada para Fazenda Santa Rita, Loreto	Luvissolo/ Argissolo	Tabuleiros do Balsas	Cerrado
<b>P17</b> <b>São Raimundo das Mangabeiras</b>	7° 11'26.9"	45°36'7.6"	Assentamento Bacuri, São Raimundo das Mangabeiras	Cambissolo	Tabuleiros do Balsas	Cerrado
<b>P18</b> <b>Santa Quitéria</b>	3° 28'08.02"	42°30'45.5"	Povoado Seringa	Solo aluvial	Vãos do Parnaíba Elevação 24 m	Cerrado/Caatinga

Tabela 2. Continuação

AMOSTRAS/ PONTOS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P19</b> <b>Anajatuba</b>	3°20'38.3"	44°39'39.4"	Povoado Bom Princípio, Anajatuba	Gleissolo	Baixada Maranhense	Amazônia (Pantanal)
<b>P20</b> <b>Penalva</b>	3°25'06.4"	45°10'15.4"	Povoado Pedra, Monção	Gleissolo	Baixada Maranhense	Amazônia (Pantanal)
<b>P21</b> <b>Alcântara</b>	2°22'11.3"	44°32'54.1"	Povoado Baixa Grande	Latossolo Amarelo	Tabuleiros Costeiros	Amazônia (Pantanal)
<b>P22</b> <b>Alto Parnaíba</b>	9°29'31.0"	45°54'27.9"	Estrada para o Povoado Boqueirão, Campeira, Alto Parnaíba	Latossolo Amarelo	Chapadas do Alto Rio Parnaíba	Cerrado
<b>P23</b> <b>Balsas</b>	9°05'58.4"	46°48'14.1"	Povoado Baixa Funda	Neossolo quartzarênico – areias quartzosas	Chapadas do Alto Parnaíba	Cerrado
<b>P24</b> <b>Ilha</b>	2°36'00.1"	44°16'35.2"	Parque Estadual do Bacanga	Latossolo Amarelo	Tabuleiros Costeiros	Amazônia (Litoral)
<b>P25</b> <b>Boa Vista do Gurupi</b>	1° 42'31.4"	46°12'16.1"	Conceição do Gurupi ou Conceição dos Panemas (Boa Vista do Gurupi)	Latossolo Amarelo	Superfície do Gurupi Elevação 91 m	Amazônia
<b>P26</b> <b>Sítio Novo</b>	6°28'46.7"	46°31'57.5"	Povoado Nova Veneza, Sítio Novo	Latossolo vermelho-amarelo	Patamares de Porto Franco e Fortaleza dos Nogueiras	Cerrado

Tabela 2. Continuação

AMOSTRAS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P27</b> Parque do Mirador	6°34'51.1"	45°00'28.9"	Estrada da Serra, Parque do Mirador, Mirador	Latossolo Vermelho -Amarelo	Chapadas do Alto Itapecuru	Cerrado
<b>P28</b> Tuntum	5°12'19.5"	45°13'00.2"	Fazenda João Neto, Tuntum	Luvissolo/ Argissolo	Patamar Cabeceiras Mearim	Cerrado
<b>P29</b> Cana Brava	5°34'52.1"	45°13'00.2"	Feijão Brabo- Barra do Corda	Latossolo Amarelo	Plan Dissecado Gurupi-Grajaú	Cerrado
<b>P30</b> Mirador	6°08'48.4"	44°20'17.4"	Assentamento Santana, Mirador	Latossolo Vermelho	Patamar Cabeceiras do Mearim	Cerrado
<b>P31</b> Formosa da Serra Negra	6°16'46.6"	46°13'45.5"	Fazenda Veneza, Formosa de Serra Negra	Nitossolo	Patam. de Porto Franco e Fortaleza dos Nogueiras	Cerrado
<b>P32</b> Nova Iorque	6°41'40.3"	44°00'34.4"	MA 368, Nova Iorque	Argissolo Vermelho Amarelo	Chapada Alto Itapecuru	Cerrado
<b>P33</b> Colinas	6° 14'09.6"	44°04'50.5"	Assentamento Boa Sorte, Colinas	Neossolo Litólico	Tabuleiro Médio Itapecuru	Cerrado
<b>P34</b> Carolina	7° 15'45.5"	47°1'37.6"	Topo da Serra do Caboclo, Parque Nacional da Chapada das Mesas	Neossolo Litólico	Planos Aren. de Riachão	Cerrado
<b>P35</b> Parque do Mirador	6°39'5.3"	45°00'37.7"	Estrada para a Serra, Parque do Mirador	Neossolo Litólico	Chapadas do Alto Itapecuru	Cerrado

Tabela 2. Continuação

AMOSTRAS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P36 Balsas</b>	9° 8'29.8"	46°39'28.7"	Estrada para o Povoado São Pedro	Neossolo Litólico	Vãos do Rio Parnaíba	Cerrado
<b>P37 Alto Parnaíba</b>	9°37'25.5"	45°59'22.8"	Estrada para o Povoado Consulta, Alto Parnaíba	Neossolo Litólico	Chapadas do Alto Parnaíba	Cerrado
<b>P38 Chapadinha</b>	3°46'40.90"	43°28'37.70"	Povoado Pau d'arco	Planossolo	Plan. Dissecado do Itapecuru	Cerrado
<b>P39 Pinheiro</b>	2°22'05.5"S	45° 09'04.8"	Povoado Cajazeiras, Pinheiro	Argissolo	Superfície de Bacabal	Amazônia (Pantanal)
<b>P40 Cândido Mendes</b>	1°53'22.6"	45°42'22.3"	Projeto De Assentamento Santa Helena, Cândido Mendes	Plintossolo	Superfície do Gurupi	Amazônia (Litoral)
<b>P41 Carolina</b>	7°28'03.1"	47°27'41.5"	Povoado Porto Alegre, Carolina	Plintossolo	Depressão do Rio Sereno	Cerrado
<b>P42 Carutapera</b>	1°18'06.3"	45°58'09.4"	Povoado Estiva- Carutapera	Plintossolo	Superfície do Gurupi	Amazônia (Litoral)
<b>P43 Caxias</b>	4°33'30.01"	43°0'54.08"	Povoado Sapucaia, Caxias	Plintossolo	Tabuleiro Parnaíba	Cerrado

Tabela 2. Continuação

AMOSTRAS/ PONTOS	COORDENADAS		LOCALIDADE	TIPO DE SOLO	UNIDADE DE RELEVO	BIOMA
	S	WO				
<b>P44</b> <b>Miranda do Norte</b>	3°31'17.8"	44°32'53.1"	Vila Embratel- Miranda do Norte	Plintossolo	Superfície de Bacabal	Amazônia
<b>P45</b> <b>Monção</b>	3°26'33.9"	45°26'38.14"	Povoado Pedra, Monção	Plintossolo	Superfície de Bacabal	Amazônia (Pantanal)
<b>P46</b> <b>Turiaçu</b>	1°38'24.2"	45°27'49.4"	Povoado Santa Terezinha	Latossolo	Superfície do Baixo Gurupi	Amazônia (Litoral)
<b>P47</b> <b>Marajá do Sena</b>	4°40'34.1"	45°25'20.7"	Povoado Vertente- Marajá do Sena	Neossolos Flúvicos	Plan.Diss. Pind/Grajaú	Cerrado
<b>P48</b> <b>Caxias</b>	4°34'34.61"	42°52'45.26"	Povoado São Miguel, Caxias	Solos Aluviais	Tabuleiros do Rio Parnaíba	Cerrado
<b>P49</b> <b>Grajaú</b>	6°02'38.2"	46°15'22.9"	Estrada após o Povoado São Félix para o Rio Grajaú, Grajaú	Vertissolo	Pat P. Franco Fortaleza dos Nogueiras	Cerrado
<b>P50</b> <b>Monção</b>	3° 35'15.1"	45°13'37.0"	Povoado de Monção	Plintosolo	Baixada Maranhense	Amazônia (Pantanal)

Fonte: Para parte dos Biomas: IBGE (2014) e tipo de solo DNPM (Brasil, 1986).

#### **4.5 Amostragem de Águas Subterrâneas**

As coletas de águas subterrâneas ocorreram nos pontos amostrais descritos e georreferenciados na Tabela 3. Foram selecionados 26 pontos de amostragem em função da sua proximidade com os pontos descritos na Tabela 2, amostragem de solos, sempre em locais onde se encontravam poços artesianos ou do tipo cacimbão. Ao final das coletas, foram contempladas zonas que apresentavam aquíferos sob influência de todos os tipos de solos apresentados na Tabela 2.

**Tabela 3.** Informações sobre os pontos tomados para amostragem de águas subterrâneas em áreas não antropizadas, em todo o Estado do Maranhão

AMOSTRAS	COORDENADAS		LOCALIDADE	PROFUNDIDADE (m)	BIOMA	Tipo de Solo
	S	WO				
A1 São Luís	2°36'00. 1"	44°16'35. 2"	Comunidade Rio da Prata, Parque Estadual do Bacanga, São Luis	28	Amazônia (Litoral)	Latossolo Amarelo
A2 Juçatuba	2°36'14. 8"	44° 6'22.7"	Comunidade Bom Jardim, Juçatuba, São Luis	32	Amazônia (Litoral)	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico
A3 Alcântara	2°22'09. 7"	44°33'20. 0"	Comunidade Baixa Grande, Alcântara	110	Amazônia (Litoral)	Latossolo Amarelo
A4 Grajaú	6°08'39. 5"	46°09'43. 0"	Assentamento São Félix, Grajaú	180	Cerrado	Vertissolo
A5 Formosa da Serra Negra	6°16'32. 0"	46°13'32. 2"	Fazenda Veneza, Formosa da Serra Negra	200	Cerrado	Nitossolo
A6 Sítio Novo	6°28'12. 7"	46°31'43. 8"	Nova Veneza, Sítio Novo	15	Cerrado	Latossolo vermelho-amarelo Cambissolo
A7 Bacuri	7°11'50. 9"	45°37'59. 3"	Assentamento Bacuri	70	Amazônia (Litoral)	
A8 Mirador	6°11'22. 03"	44°20'31. 4"	Assentamento Santana, Mirador	140	Cerrado	Latossolo Vermelho
A9 Colinas	6°13'58. 0"	44°03'22. 0"	Assentamento Boa Sorte, Colinas	11	Cerrado	Neossolo Litólico
A10 Anajatuba	3°20'45. 0"	44°38'57. 0"	Povoado Perimirim, Anajatuba	8	Amazônia (Pantanal)	Gleissolo
A11 Mirador	6°42'48. 5"	45°17'50. 2"	Povoado Brejo Escuro, Parque do Mirador	4	Cerrado	Neossolo Quartz (areias quartzozas)
A12 Alto Parnaíba	9°51'08. 9"	46°05'13. 2"	Povoado Promissão, Alto Parnaíba	10	Cerrado	Neossolo Quartz (AREIAS QUARTZOZAS)
A13 Alto Parnaíba	9°48'12. 9"	46°02'18. 7"	Povoado Curralinho, Alto Parnaíba	12	Cerrado	Neossolo Quartz (AREIAS QUARTZOZAS)
A14 Alto Parnaíba	9°25'55. 4"	45°56'16. 0"	Povoado Boqueirão, Alto Parnaíba	10	Cerrado	Latossolo Amarelo

Tabela 3. Continuação

AMOSTRAS	COORDENADAS		LOCALIDADE	PROFUNDIDADE (m)*	BIOMA	TIPO DE SOLO
	S	WO				
A15 Balsas	9°08'25.4"	46°40'27.6"	Povoado São Pedro, Balsas, APA DA NASCENTE DO BALSAS	8	Cerrado	Neossolo Litólico
A16 Balsas	9°04'49.5"	46°51'40.3"	Povoado Baixa Funda, Balsas	5	Cerrado	Neossolo quartzarênico – areias quartzosas
A17 Carolina	7°22'30.1"	47°06'30.6"	Povoado São José dos Pereira, Carolina	11	Cerrado	Neossolo Quartz
A18 Carolina	7°24'42.8"	47°08'38.9"	Fazenda Mangabeira, Carolina	12	Cerrado	Plintossolo
A19 Santa Quitéria	3°30'15.6"	42°32'27.5"	Povoado Seringa, Santa Quitéria	9	Cerrado/Caatinga	Solo aluvial
A20 São Benedito do Rio Preto	3°19'35.8"	43°33'47.4"	Residência particular, São Benedito do Rio Preto	64	Cerrado	Plintossolo
A21 Timbiras	4°20'28.9"	44°02'00.8"	Povoado Lagarto, Timbiras	8	Cerrado	Argissolo Vermelho – amarelo distrófico
A22 Urbano Santos	3°08'31"	43°12'23"	Povoado Guaribas II, Urbano Santos	10	Cerrado	Latossolo
A23 Vila de Atins	2°35'03.4"	42°45'14.2"	Sítio Santo Inacio, Vila de Atins	5	Cerrado (Litoral)	Neossolo Quartz
A24 Bom Jardim	2°35'03.4"	46°52'07"	Residencia em Povoado Rio dos Bois, Bom Jardim	10	Amazônia	Argissolo
A25 Centro do Guilherme	4° 24'30.7"	46°08'23.7"	Povoado Quadra 35, Centro do Guilherme	6	Amazônia	Argissolo
A26 Governador Edson Lobão	4° 24'30.7"	46°08'23.7"	Povoado N. Sra. Da Conceição, Governador Edson Lobão	20	Cerrado	Neossolo Flúvico

\*Profundidades acima de 20m relacionam-se a poços tubulares.

Fonte: Autora.

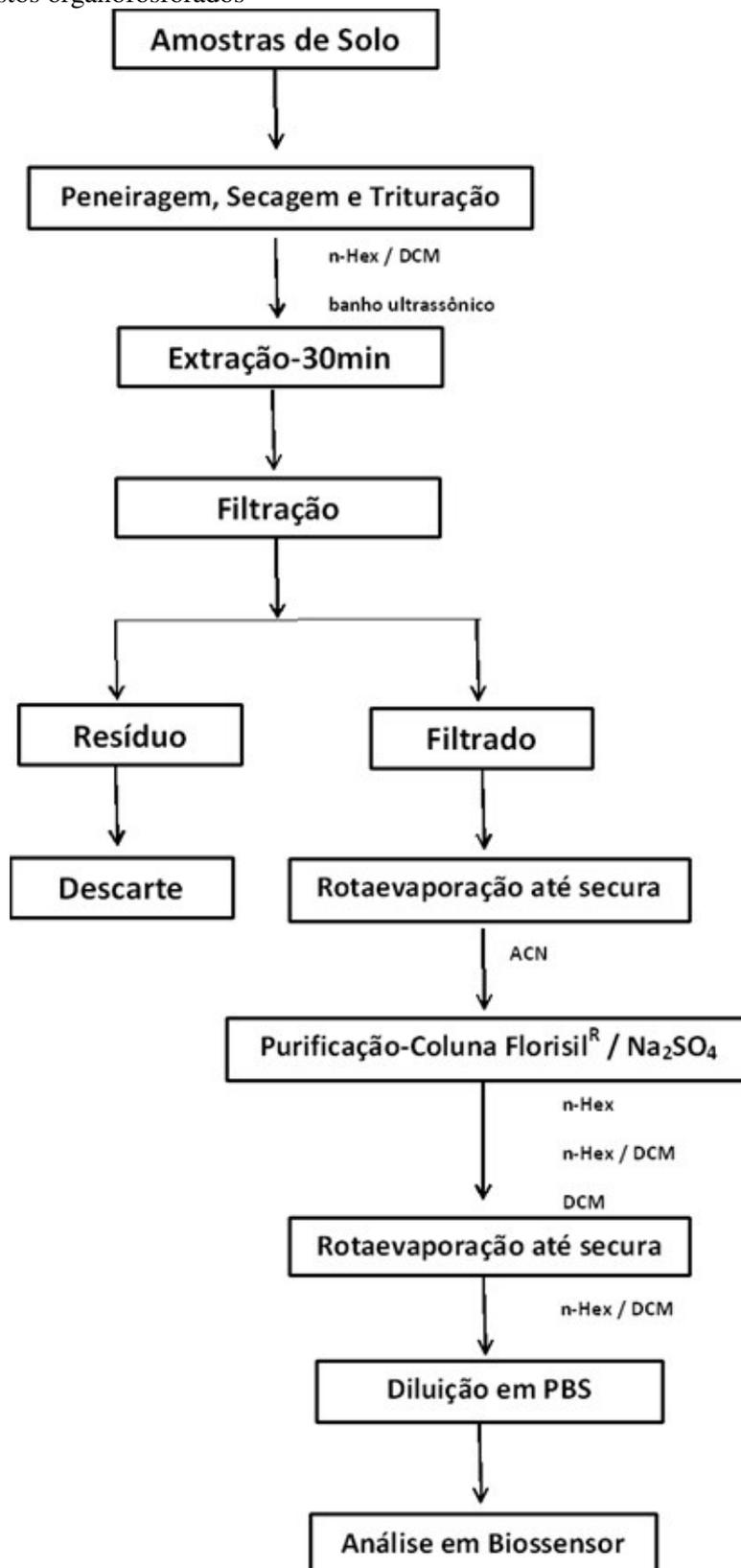
Os procedimentos de amostragem das águas subterrâneas ocorreram de acordo com as normas nacionais (CESTEB, 2001) e internacionais, respeitando-se os procedimentos de preservação da amostra e os prazos de validade. Parte das amostras foi analisada diretamente com o biossensor, e parte submetida à extração prévia dos compostos, antes dos ensaios com os biossensores.

#### **4.6 Extração dos OFs nas Amostras de Solos**

O solo foi previamente seco a  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ . Fragmentos e pedras visíveis foram retirados e, em seguida, as amostras foram trituradas mecanicamente, peneiradas em peneira de 60 micrômetros e pulverizadas em gral de ágata.

O procedimento de extração descrito a seguir foi baseado no método oficial recomendado pela Agência Americana dos Estados Unidos, US-EPA (Fig 5). A etapa de extração se deu pela adição de 80 mL de uma mistura extratora de n-hexano e diclorometano (1:1) a 20 g de amostra do solo, previamente seca em estufa por  $50^\circ\text{C}$  por 2h, seguido de agitação constante da mistura por 30 min em banho ultrassônico. A mistura foi filtrada em funil com lã de vidro e concentrada até a secura em evaporador rotativo à temperatura de  $70^\circ\text{C}$ . A redissolução foi feita com 2mL de acetonitrila e o extrato foi em seguida, submetido a um processo de purificação em coluna de Florisil<sup>®</sup> contendo os seguintes componentes: 0,5 cm de lã de vidro, 2 cm  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, 3 cm de Florisil<sup>®</sup> (pré-tratado em estufa  $130^\circ\text{C}$  e 12 horas de resfriamento). A eluição foi feita adicionando-se 30 mL hexano, 25 mL de hexano/diclorometano (70:30) e 20 mL de diclorometano. O eluato recolhido, foi em seguida concentrado até a secura em evaporador rotativo à temperatura de  $65^\circ\text{C}$ , redissolvido com 2mL de hexano/diclorometano (1:1) e diluído 200 vezes com PBS (pH 7,2), antes do ensaio com o biossensor. O fator de diluição foi selecionado de forma a minimizar o efeito do solvente no extrato final sobre a atividade da enzima (WARNER e ANDREESCU, 2016).

**Figura 5-** Fluxograma das etapas de preparação das amostras de solo e extração dos compostos organofosforados



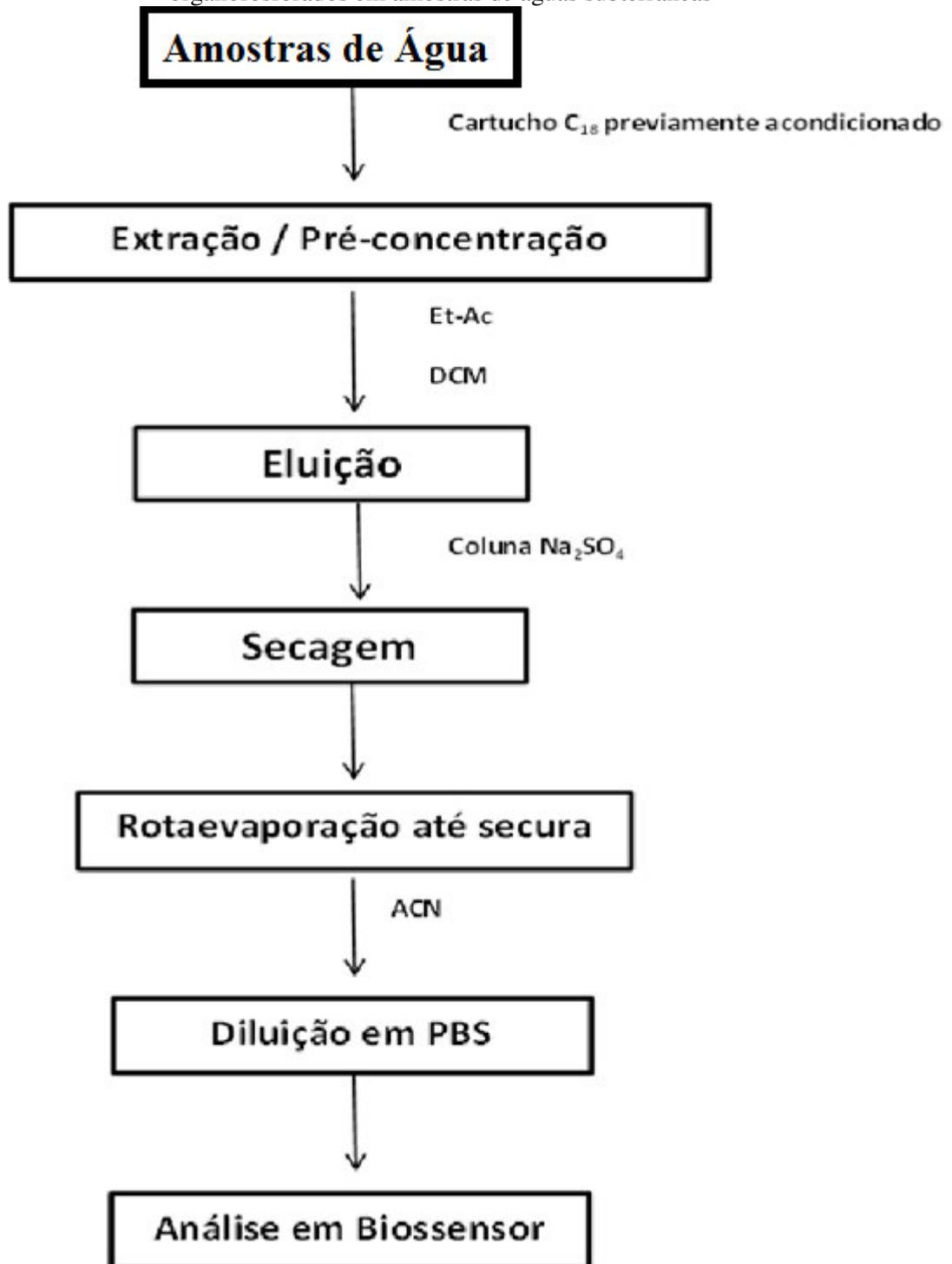
ACN= acetonitrila, n-hex= n-hexano, DCM= diclorometano.

Fonte: Autora.

#### 4.7 Extração dos OFs em Amostras de Águas Subterrâneas

Para a extração dos pesticidas, foi empregado o procedimento de extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*, SPE), utilizando cartuchos de extração e pré-concentração contendo, como material adsorvente, octadecil sílica (C<sub>18</sub>) (Fig. 6). Inicialmente, foi feito um pré-condicionamento do cartucho, mediante percolação de 10 mL de metanol, ao longo do cartucho (fluxo: 10 mL/min), seguida de percolação de 10 mL de água destilada (fluxo: 10 mL/min). Daí, um volume de 200 mL da amostra passou pelo cartucho (fluxo: 3 mL/min), tendo sido em seguida o cartucho lavado com 10 mL de água destilada (fluxo: 10 mL/min) e sequencialmente seco durante 10 min com a bomba de vácuo ligada, a fim de remover todos os vestígios de água presentes na fase adsorvente. A etapa de eluição dos compostos (que ficaram retidos no cartucho) foi realizada mediante passagem de 5 mL de acetato de etila (fluxo: 5 mL/min), e mais 5 mL de diclorometano, recolhendo ambos os eluatos diretamente em um balão de 50 mL de capacidade. O eluato combinado foi percolado em uma coluna de vidro contendo uma camada de aproximadamente 2 cm de sulfato de sódio anidro, e fechada nas extremidades com lã de vidro. O extrato foi então evaporado até *secura* em rotaevaporador a uma temperatura de 35°C, tendo sido em seguida o resíduo reconstituído com 2 mL de acetonitrila. O extrato final foi filtrado através de filtro Millex<sup>®</sup> (Millipore) e diluído 200 vezes com PBS (pH 7,2), antes das medidas eletroquímicas (WARNER e ANDREESCU, 2016).

**Figura 6-** Fluxograma das etapas de extração e pré-concentração dos compostos organofosforados em amostras de águas subterrâneas



ACN= acetonitrila, Et-Ac=acetato de etila, DCM= diclorometano, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>= sulfato de sódio.

Fonte: A autora.

#### 4.8 Caracterização Físico-Química das Amostras Ambientais

Os parâmetros empregados para caracterização dos solos foram: carbono orgânico total, pH em água, capacidade de troca catiônica (CTC), granulometria (percentagens de argila, silte, areia) e teores de óxidos de alumínio. As análises seguiram as metodologias analíticas definidas pela Embrapa (1997).

Para caracterização das águas subterrâneas, foram determinados os seguintes parâmetros: pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), salinidade, potencial de oxirredução e sólidos totais dissolvidos. As análises foram realizadas no momento da coleta, tendo sido empregado o analisador multiparâmetro (U22-Series, Horiba), previamente calibrado.

#### 4.9 Ensaio de Inibição Enzimática com os Biossensores: Detecção dos OFs

Amostras de águas subterrâneas *in natura* e também os seus extratos, bem como os extratos dos solos, ambos diluídos 200 vezes em PBS (pH 7,2), foram analisados pelo biossensor à base da enzima AChE (NUNES *et. al*, 2014), empregando-se o princípio da inibição da enzima pela presença dos organofosforados (KESTWAL, BAGAL- KESTWAL e CHIANG, 2015; NUNES *et. al*, 2014).

Para os ensaios de inibição, inicialmente o sinal de corrente (nA), obtido a partir da imersão do biossensor no substrato (solução de ATChCl  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi registrado ( $I_0$ ), sendo proporcional à atividade enzimática. Posteriormente, o mesmo biossensor foi lavado com PBS (pH 7,2) seco cuidadosamente, e então seguiu-se à incubação do biossensor com o inibidor, pela sua imersão na amostra durante 10 min. Este tempo tem sido empregado em diversos trabalhos como o ideal para o processo de incubação da enzima com o inibidor (MARQUES, 2001; NUNES *et. al*, 1999; SKLÁDAL, 1991). Após a incubação, o biossensor foi novamente lavado e seco, e uma nova medida de corrente ( $I$ ) registrada, a partir da imersão do biossensor no mesmo substrato. O decréscimo da intensidade de corrente serviu de base para o cálculo da inibição relativa percentual (IR, %) (NUNES *et. al*, 2014, KESIK *et. al*, 2014).

#### 4.10 Análise Estatística

Para os ensaios estatísticos utilizou-se o software *Statistica Analysis System* (SAS, versão 8, SAS Institute). Na análise de correlação todos os dados foram padronizados e em seguida avaliados os parâmetros físico-químicos que poderiam estar contribuindo no processo de inibição enzimática através da análise descritiva.

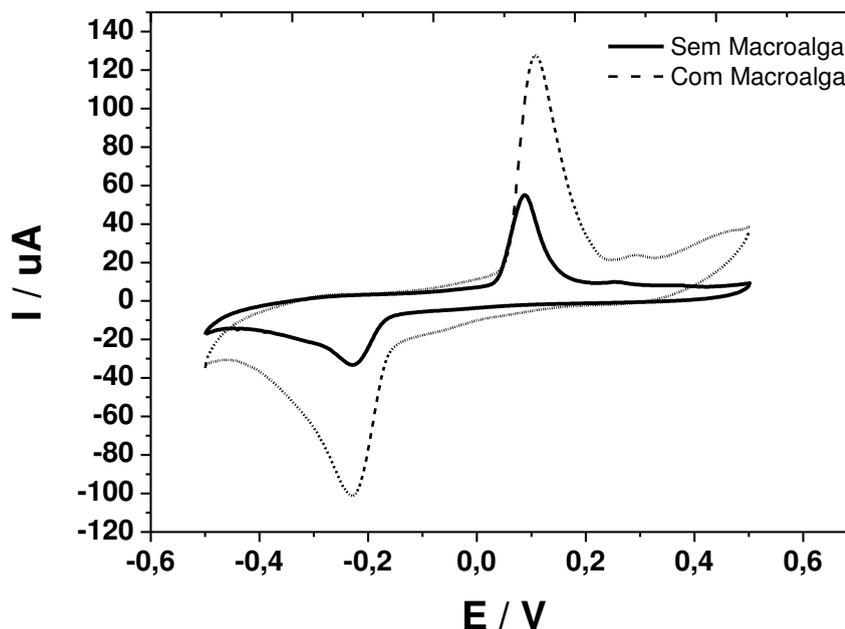
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do Biossensor

Biossensores à base da enzima AChE voltados para detecção de pesticidas OFs têm sido amplamente desenvolvidos e caracterizados (NUNES *et. al.*, 2014, KESIK *et. al.*, 2014, NUNES *et. al.*, 2001; MARQUES, 2001; NUNES *et. al.*, 2014). No presente trabalho para modificação do sensor, utilizou como transdutor eletroquímico o TCNQ, que possibilitou se trabalhar em um potencial de trabalho relativamente baixo (60 mV), eliminando assim interferências eletroquímicas. O uso desse mediador também tem sido explorado em outros trabalhos (NUNES *et. al.*, 2014; MARQUES, 2001), sendo uma estratégia tecnicamente viável, sobretudo quando se analisa amostras reais ou extratos que possam conter outras substâncias eletricamente ativas.

O biossensor apresentou uma inovação nunca antes explorada na construção desses protótipos voltados para detecção de agentes anticolinesterases: a presença de uma macroalga estuarina no eletrodo de trabalho, juntamente com a enzima AChE. A macroalga aparentemente possibilitou um microambiente mais favorável à reação de hidrólise do substrato acetiltiocolina a acetato e tiocolina, catalisada pela AChE. Esse fato foi evidenciado pelo aumento no valor da corrente durante o processo catalítico realizado pela enzima, como pode ser observado na Figura 7. Uma possível explicação para esse fenômeno pode estar baseada no elevado teor do aminoácido serina na macroalga, que potencializou a atividade catalítica da AChE (NUNES *et. al.*, 2014).

**Figura 7-** Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor à base da enzima acetilcolinesterase, AChE, na ausência e na presença da macroalga estuarina hidrolisada. Condições operacionais: mediador eletroquímico: TCNQ; Fonte de AChE: enguia elétrica (EE);  $[ATChCl] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$



Fonte: Autora.

O aumento no sinal eletroquímico possibilitou diminuir a concentração do substrato (ATChCl), de  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  para  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tornando o processo mais econômico. Também observou-se que, durante os ensaios de inibição, o tempo necessário para estabilização da corrente, por ocasião das medidas cronoamperométricas, passou de 60 para 35s.

Foi avaliada a repetibilidade e a reprodutibilidade do sinal eletroquímico, a fim de estabelecer a robustez do biossensor. Coeficientes de variação (CVs) médios de 8,3% ( $n=10$ ) e 9,0 % ( $n = 10$ ) foram obtidos para ensaios com o mesmo biossensor e com biossensores diferentes, respectivamente. Os biossensores mostraram-se estáveis em até 3 meses, tempo considerado relativamente bom, em comparação com outros trabalhos (KESTWAL, BAGAL-KESTWAL e CHIANG, 2015; LIU e WEIG, 2014).

## 5.2 Linearidade e Sensibilidade do Biossensor

Foram realizados ensaios de inibição com concentrações crescentes dos inseticidas OFs paration metílico, clorpirifós, clorpirifós-oxon e temefós, o que gerou as curvas analíticas para estes compostos apresentadas na Tabela 4. O biossensor otimizado apresentou faixas de trabalho variáveis, bem como limites de detecção em torno de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  para a maioria dos pesticidas estudados. Tal sensibilidade torna-o adequado para estudos envolvendo monitoramento ambiental.

**Tabela 4.** Curvas analíticas e sensibilidade do biossensor AChE (EE) para diferentes inseticidas OFs

PESTICIDA OF	CURVA ANALÍTICA	R <sup>2</sup>	FAIXA DE TRABALHO ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LD a 10 % de inibição ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Clorpirifós	$y = 3,287x + 15,53$	0,937	1 a 15	1,10	3,35	1,10
Clorpirifós-oxon	$y = 4,62x + 13,67$	0,996	1 a 7,5	1,15	1,44	1,15
Paration Metílico	$y = 4,216x + 13,72$	0,968	1 a 15	1,44	2,32	1,44
Temefós	$y = 3,934x + 43,53$	0,961	0,01 a 10	0,054	0,163	0,054

LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação. N=3.  
y= Inibição Relativa (%); x= concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Fonte: Autora.

## 5.3 Caracterização Físico-Química das Amostras Ambientais

As Tabelas 5 e 6 apresentam, respectivamente, os resultados das análises físico-químicas das amostras de solo e águas subterrâneas.

Em geral, os solos do Estado do Maranhão possuem pH moderadamente ácido, variando de 3,45 a 6,60. Em solos ácidos alguns pesticidas aumentam sua estabilidade, como por exemplo, o clorpirifós (de 23 para 63 dias) (RAMOS, 2014).

Tabela 5. Caracterização físico-química dos solos do Maranhão

AMOSTRA/ PONTOS	MO (g/Kg)	pH CaCl <sub>2</sub>	P (mg/dm <sup>3</sup> )									Na/ CTC (%)	Al*100/Al+BS	SB*100/ CTC
				K (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Ca	Mg	Na	BS	Al	H	CTC			
P1	33	4,4	3,5	1,45	25	7,5	2,6	36,55	4,5	53,5	94,45	2,75	10,96	38,7
P2	43,2	3,6	5,1	1,3	3,5	0	2,3	7,1	0	34,5	41,6	5,5	0	17
P3	16,7	3,8	4,4	1,4	0	3,0	2,6	7	0	38	45	5,7	0	15,5
P4	7,4	3,7	4,7	1,3	0	5,0	2,4	8,7	0	34,4	43,1	5,5	0	20,2
P5	11,7	3,75	7,8	1,4	0	9,5	3	13,9	2,5	35,5	51,9	5,7	18,3	26,7
P6	16,7	4,25	2,50	1,25	0,3	0,2	2,65	4,42	0	39,9	44,3	5,99	0	10,0
P7	27	3,7	2	1,5	3,0	8,5	2,45	15,45	10,5	37	62,65	3,9	39,4	24,6
P8	39,1	4,70	3,45	2,00	1,6	1,0	4,00	8,65	0	39,9	48,5	8,24	0	17,8
P9	25	3,9	2	1	1,5	6,5	1,8	10,8	9,5	28,5	48,8	3,75	46,9	22,1
P10	39	5,0	2	1,85	39	25,5	3,15	69,5	0	32	101,6	3,1	0	68,35
P11	26	3,9	3	0,8	2	2,5	2,5	6,75	20	72	98,35	1,5	74,55	6,85
P12	13,5	4,0	2	1,25	5	5	1,95	13,2	9	27	48,7	3,95	40,05	26,6
P13	29,6	4,96	3,90	1,55	1,2	0,8	3,60	7,15	0	25,6	32,8	10,9	0	21,8
P14	38,6	5,56	4,05	4,80	1,5	1,3	9,15	16,7	0	18,7	35,4	25,8	0	65,0
P15	11	5,0	2	2,45	12	7,5	4,1	26,05	0	20	46,15	8,85	0	56,25
P16	58,6	5,2	35,2	8,4	129	10,5	13,6	161,5	0	18,1	179,6	7,5	0	89,9
P17	13,6	4,3	4,6	1,4	8,0	12	2,5	23,9	0	27,6	51,5	4,8	0	46,4
P18	25,8	4,63	7,45	6,30	6,4	4,5	11,5	28,8	0	69,3	98,1	11,6	0	29,3
P19	10,7	4,1	5,6	2,7	9,5	10,5	5,2	27,9	0	30,7	58,6	8,9	0	47,6
P20	18	4,4	7	2,2	13	8	3,65	26,95	1	25	52,65	7	3,35	51,15
P21	18	3,45	2	1,05	3	7	1,8	12,85	11	36,5	60,3	2,95	45,65	21,3
P22	138,6	3,6	3,3	1,3	0	6,0	2,4	9,7	4,25	30,4	44,35	5,5	30,5	21,8
P23	69,3	3,7	1,8	1,3	0	9,0	2,4	12,7	0	25	37,7	6,3	0	33,7
P24	21,5	3,95	3	1,05	1,5	6,5	1,85	10,9	9	28	47,9	3,85	45,35	22,7
P25	8,5	3,7	6,5	1,05	7,5	8,0	2,2	23,7	23	27	73,15	3	48,8	32,3
P 26	17,5	4,2	6,1	1,7	0	7,5	3,4	12,6	0	25	37,6	9	0	33,5
P27	46,8	3,7	1,3	1,5	2,0	2,0	2,6	8,1	18	90,1	116,2	2,2	68,9	6,9
P28	26	4,0	2	1,15	6,5	3,5	1,95	13,2	20	69,5	102,4	1,9	60	12,85
P29	22,5	3,8	2	0,85	1,5	5,5	1,45	9,3	17	53	78,9	1,8	2	11,75

Tabela 5. Continuação

AMOSTRA/ PONTOS	MO (g/Kg)	pH CaCl <sub>2</sub>	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Ca	Mg	Na	BS	Al	H	CTC	Na/ CTC	Al*100/Al+BS	V
												(%)		
P30	12,4	3,45	5,9	1,8	5,0	8,5	3,3	18,6	Nd	27,7	46,3	7,1	Nd	40,1
P31	67,2	6,2	2,6	4	51,5	25	6,4	86,9	Nd	20,1	107	6	Nd	81,2
P32	15,4	3,6	2,2	1,6	nd	13	3,3	17,9	13,5	21,1	52,5	6,2	43	34,1
P33	29,9	4,7	9,7	7,5	53,5	36	12,2	109,2	Nd	25	134,2	9	Nd	81,3
P34	19,8	5,0	1,4	4,5	43	17,5	7,4	72,4	Nd	27,7	100,1	7,3	Nd	72,3
P35	43,3	3,55	2,5	1,6	2,5	4,5	3,2	11,8	9,0	79,4	100,2	3,1	43,2	11,7
P36	30,4	3,5	8,8	1,6	nd	5,5	3,2	10,3	5,0	66,6	81,9	3,7	32	12,5
P37	26	3,6	2,4	1,4	1,0	3,5	2,6	8,5	1,75	36,3	46,5	5,5	17	18,2
P38	18	4,7	2	3,25	19,5	9,5	5,4	37,7	Nd	33,5	71,2	7,65	Nd	52,95
P39	17,5	4,8	3	1,9	94,5	55,5	3,4	155,3	Nd	36	191,35	1,8	Nd	81,15
P40	25	3,7	2,5	0,95	12,5	6	1,8	21,3	7,5	38,5	67,05	2,65	25,2	31,75
P41	18,8	3,5	4,1	1,8	nd	5,5	3,2	10,5	5,0	37,3	52,8	6	32,2	19,8
P42	20,5	4,4	2	1,35	13,5	7,5	2,4	24,7	9	28,5	61,95	3,8	24,55	39,9
P43	14	4,4	2	1,25	17	7,5	2,4	28,15	3	29,5	60,45	4	8,9	46,6
P44	60,5	4,3	3	2,3	33,5	20,5	3,85	60,25	3,5	85	148,95	2,6	5,5	40,45
P45	26	3,6	3,5	0,95	2	3,5	1,75	8,15	21	58	87,2	1,95	72,25	9,3
P46	13,5	4,1	2,5	0,95	11	2,5	1,7	16,1	6	31,5	53,2	3,05	27,5	30,1
P47	9	5,05	14	2,8	44,5	26,5	5	78,8	Nd	24	102,8	4,8	Nd	76,55
P48	11	5,95	29	2,4	54,5	11,5	4,1	72,5	Nd	14	86,65	4,7	Nd	83,7
P49	46,2	6,6	1,0	5,3	97,5	243	9	354,8	11	16,7	382,5	2,3	3	92,7
P50	15	4,3	2	2,85	18	13	4,65	38,5	4	30	71,9	6,45	8,35	53,6

MO = matéria orgânica; P = fósforo; K = potássio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; Na = sódio; BS = bases solúveis; Al = alumínio; H = hidrogênio; CTC = capacidade de troca catiônica; V = valor de saturação de bases. Médias de duas repetições.  
nd= não detectado.

Fonte: Autora.

Outro parâmetro importante que serve para avaliar o solo é a sua capacidade de troca catiônica (CTC). Nesse estudo, percebeu-se grande variação nos valores de CTC (de 32,8 a 382,5). CTCs mais elevadas garantem ao solo alto potencial de retenção, e isso favorece não só a adsorção de substâncias nutrientes, mas também de alguns poluentes iônicos, diminuindo assim a possibilidade de contaminação das águas subterrâneas por meio destes compostos.

No Brasil, teores de matéria orgânica (MO) acima de  $25 \text{ g.dm}^{-3}$  são considerados altos (SANTOS e ZANELLO, 2016); logo, pode-se afirmar que a maioria dos solos maranhenses apresenta altos valores de MO (P3-Parque do Mirador, P4-Carolina, P5-Mirador, P6-PNLM, P12- Paulo Ramos, P15- Paulo Ramos, P17-São Raimundo das Mangabeiras, P19-Anajatuba, P20-Penalva, P21-Alcântara, P24-Ilha, P25-Boa Vista do Gurupi, P26-Sítio Novo, P29-Cana Brava, P30-Mirador, P32-Nova Iorque, P34-Carolina, P38-Chapadinha, P39-Pinheiro, P41-Carolina, P42-Carutapera, P43-Caxias, P46-Turiaçu, P47-Marajá do Sena, P48-Caxias, P50-Monção). Segundo Santos e Zanello (2016), a acidez limita a decomposição da matéria orgânica, acumulando-a no solo e esta contribui para os elevados valores de CTC. Oliveira (2004) afirma que compostos OFs podem interagir com a matéria orgânica dos solos minerais, persistindo assim por mais tempo nos ambientes terrestres.

Os resultados apresentados na Tabela 6, em geral, indicam que a água subterrânea do Estado do Maranhão apresenta boa qualidade ambiental (CONAMA n° 396 de 2008). No entanto, em relação ao pH, ao se comparar os resultados obtidos com a atual legislação brasileira em relação à saúde (PORTARIA n° 2914 de 2011), este parâmetro encontra-se fora do intervalo estabelecido, que é de 6-9,5. Assim pode-se afirmar que a maioria dos pontos (A1-São Luís, A3-Alcântara, A7-Bacuri, A11-Mirador, A13-Alto Parnaíba, A14- Alto Parnaíba, A15-Balsas, A16-Balsas, A18-Carolina, A20-São Benedito do Rio Preto, A21-Timbras, A23-Vilda de Atins, A24-Bom Jardim, A25-Centro do Guilherme e A26-Governador Edson Lobão) apresenta acidez nas águas subterrâneas. Essa acidez pode contribuir para a concentração de alguns metais, como cobre e chumbo (este último também inibidor da enzima AChE), (FERLEMI *et. al*, 2014), caso estes elementos entrem em contato com a água. Segundo Santos (2009) e Esteves (1998), quanto maior a disponibilidade de  $\text{H}^+$  na água, maior será a tendência de haver metais. Alguns autores (BURIDI e GEDALA, 2014; WHO, 2011) relatam que o pH das águas subterrâneas é influenciado principalmente pelo volume da água e tipo de solo, mas que o caráter ácido pode ser consequência da presença de dióxido de carbono dissolvido e de ácidos orgânicos.

Os valores de oxigênio dissolvido (OD) variaram entre 4,81 mg.L<sup>-1</sup> e 38,35 mg.L<sup>-1</sup>, com valor médio de 13,63. A legislação ambiental brasileira (CONAMA n° 396 de 2008) estabelece que o valor de OD não pode ser inferior a 5 mg/L; logo, apenas um ponto de coleta (A2- Juçatuba) encontrou-se um pouco fora do intervalo estabelecido.

A condutividade fornece uma avaliação da quantidade de íons presentes na água, na água analisada encontraram-se valores de 0,010 μS.cm<sup>-1</sup> a 1,58 μS.cm<sup>-1</sup>, sendo 0,298 o valor médio. Os valores demonstram elevada amplitude. Os pontos A2-Juçatuba e A10-Anajatuba encontram-se com valores de condutividade acima do valor máximo determinado pela atual legislação brasileira (CONAMA n° 396 de 2008), que é de 0,5 μS.cm<sup>-1</sup>. Comparando-se com que já determina a Organização Mundial de Saúde, a WHO (2011), que estabelece valor de 1,5 μS.cm<sup>-1</sup>, apenas o ponto A10 encontra-se um pouco acima do valor permitido.

Segundo Santos (2009) e Vidal *et. al* (2005), a salinidade tem grande influência da característica mineralógica da região. Sendo assim, a baixa salinidade encontrada nas águas subterrâneas do Maranhão (0 – 0,59 %, com valor médio de 0,01%) pode ser atribuída à característica geológica da região.

Em relação ao parâmetro SDT (sólidos dissolvidos totais), os valores variaram de 0,018 a 1,01, estando somente o ponto A10-Anajatuba um pouco acima do valor disposto na legislação brasileira e na WHO (2011) (limite de 1 g.L<sup>-1</sup>).

Já em relação ao potencial de oxirredução, os valores estiveram entre 110 mΩ e 436 mΩ, sendo que os valores mais altos indicam uma maior disponibilidade de oxigênio dissolvido nas águas, o que torna as águas mais propícias à oxidação. No Brasil, o valor máximo para esse parâmetro é de 500, logo os ambientes investigados encontram-se em conformidade com o estabelecido.

**Tabela 6.** Caracterização físico-química das águas subterrâneas do Estado do Maranhão

AMOSTRA	T (°C)	pH	O.D. (mg.L <sup>-1</sup> )	CONDUTIVIDADE ( μS.cm <sup>-1</sup> )	SDT (g.L <sup>-1</sup> )	SALINIDADE (%)	ORP (mΩ)
A1	30	4.6	23.24	0.245	0.123	0.11	124.5
A2	31.2	7.64	4.81	1.2	0.599	0.59	110
A3	27.65	4.97	20.10	0.052	0.034	0	374
A4	27.71	7.17	26.55	0.402	0.262	0.0	273
A5	30.10	7.50	16.15	0.275	0.179	0.01	240
A6	27.91	6.91	16.01	0.131	0.05	0.01	240
A7	29.23	5,65	13.83	0.046	0.030	0.00	343
A8	27.41	6.83	21.73	0.112	0.073	0.01	267
A9	26.92	6.75	6.82	0.622	0.398	0.03	252
A10	28.51	7.14	18.74	1.58	1.01	0.08	240
A11	25.83	4.87	12.97	0.178	0.116	0.01	305
A12	28.77	6.23	6.09	0.202	0.131	0.01	269
A13	23.16	5.87	8.85	0.191	0.124	0.01	212
A14	33.12	5.43	7.33	0.036	0.023	0.00	258
A15	25.81	5.1	6.54	0.028	0.018	0.00	267
A16	28.2	4.89	6.61	0.010	0.006	0.00	260
A17	30.6	6.86	9.93	0.261	0.169	0.01	264
A18	28.96	5.46	6.39	0.045	0.029	0.00	333
A19	33,01	7,18	38,35	0,929	0,595	0,05	442
A20	32,27	4,1	11,18	0,182	0,119	0,01	254
A21	28,5	4,1	6,63	0,154	0,023	0,01	329
A22	35,16	6,55	21,21	0,282	0,183	0,01	330
A23	32,11	4,57	21,54	0,185	0,12	0,01	250
A24	27,85	2,38	8,19	0,086	0,056	0	267
A25	25,92	2,32	6,43	0,235	0,153	0,01	436
A26	29,32	3,21	8,12	0,084	0,055	0	243

T = temperatura; pH = potencial hidrogeniônico; O.D = oxigênio dissolvido; SDT = sólidos dissolvidos totais ; ORP = potencial de oxirredução.

Fonte: Autora.

#### 5.4 Avaliação da Qualidade Ambiental dos Solos em Relação à Presença de OFs

Os resultados das análises empregando o biossensor enzimático (Tabela 7) permitiram demonstrar que os solos investigados, provenientes de áreas que ainda não sofreram interferência humana, no Estado do Maranhão, não apresentam traços de pesticidas OFs, não obstante a aplicação destes produtos em áreas agrícolas possam resultar em contaminação em outras áreas, até mesmo em áreas de conservação, devido à elevada mobilidade desses compostos nos compartimentos ambientais solo, água e ar. As baixíssimas inibições relativas (IRs) não caracterizam contaminação por OFs, já que estão abaixo de 10%, considerado valor limite por alguns autores (NUNES *et. al*, 2014; NUNES *et. al*, 2011). O biossensor aliado ao método de extração se mostrou capaz de fazer monitoramento e detecção dos compostos organofosforados.

A legislação brasileira em relação a qualidade da água discorre que tais substâncias não podem ultrapassar a concentração que inibe mais que 15 a 20% da enzima acetilcolinesterase (SILVA, 2006), estando os resultados portanto em concordância com as leis vigentes.

**Tabela 7.** Inibições relativas geradas pela imersão do biossensor nos extratos de solos

AMOSTRA	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25
INIBIÇÃO EXTRATO DILUÍDO (IR%)	3,25	5,27	2,88	3,37	2,57	3,38	2,27	9,35	3,62	1,48	2,11	6,69	1,37	10,00	1,33	8,6	3,22	4,17	4,38	6,62	4,95	6,41	4,29	7,92	5,20
AMOSTRA	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36	P37	P38	P39	P40	P41	P42	P43	P44	P45	P46	P47	P48	P49	P50
INIBIÇÃO EXTRATO DILUÍDO (IR%)	2,15	1,70	3,16	1,66	2,45	s/i	2,43	1,22	2,66	8,56	s/i	9,26	s/i	s/i	1,75	2,29	3,06	1,73	9,31	4,37	5,25	9,09	4,32	2,80	1,79

n=2.

IR= inibição relativa (da enzima AChE).

Fonte: Autora.

## 5.5 Avaliação da Qualidade da Água Subterrânea Através do Biossensor

Nas amostras de águas subterrâneas, foram observados predominantemente valores de IR abaixo de 10% (Tabela 8), com exceção dos pontos A9-Colinas, A12-Alto Parnaíba, A13-Alto Parnaíba, A16-Balsas A17-Carolina, A18-Carolina e A20-São Benedito do Rio Preto, o que também evidencia a ausência de OFs na maioria das amostras, pois as IRs estão bem abaixo do limite de detecção do biossensor desenvolvido e também muito abaixo das legislações nacionais (CONAMA n° 396 de 2008; PORTARIA n° 2914 de 2011) e internacionais (WHO, 2011). Os pontos A9, A12, A13, A16 e A20 embora não indiquem indícios de inibição da AChE, necessitaram de um estudo mais detalhado para estabelecer a origem desta inibição.

Observou-se também através da Tabela 8 que as inibições diminuíram com o processo de extração, o que confirma a ausência de organofosforados na água analisada e indica que a inibição relativa feita antes do processo de extração pode ser oriunda de inibidores naturais, como alguns metais ou mesmo algum outro parâmetro físico-químico da água, como o pH.

Já existem outros estudos relatados no Brasil envolvendo esse tipo de monitoramento baseado na inibição da AChE. Por exemplo, em uma investigação reportada por Veiga *et. al* (2006), foi avaliada a qualidade de águas superficiais e subterrâneas de uma pequena comunidade rural do sudeste do Brasil, tendo sido observada uma contaminação detectável (acima do LD do protótipo). Mesmo tendo sido abaixo do permitido pela legislação, que é de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , em equivalente de Metil Paration (PORTARIA n° 2914 de 2011), também durante a triagem de contaminantes emergentes em águas subterrâneas em um aquífero vulcânico na Espanha, Estevez *et. al* (2012) empregaram biossensores à base de AChE, e detectaram resíduos de OFs, com posterior confirmação cromatográfica da presença do inseticida etilclorpirifós em concentração acima do limite da legislação europeia, que é de  $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$  (DIRECTIVE, 2008).

Os resultados aqui apresentados mostram o quão importante pode ser o uso de biossensores para a realização de estudos e monitoramentos ambientais de compostos inibidores de enzima colinesterase em ecossistemas aquáticos e terrestres. No presente estudo, foi possível verificar que na maioria dos solos maranhenses onde a interferência humana é desprezível, não foi detectada a presença desses compostos. Essa é uma informação valiosa, pois mostra que, mesmo em áreas protegidas, mas que possam receber correntes de ar carregadas de pesticidas e vindas de regiões agrícolas, resíduos de pesticidas OFs não foram

detectados. Isso facilita sobremaneira o trabalho dos analistas, no tocante à investigação mais aprofundada da contaminação, que será feita somente para pesticidas de outras classes (organoclorados, piretróides, etc.). Facilita também o trabalho dos gestores ambientais, que poderão inferir, pelo menos momentaneamente, sobre a situação das áreas investigadas em relação à presença ou não de resíduos de agentes poluentes anticolinesterásicos.

**Tabela 8.** Inibições relativas geradas pela imersão do biossensor nas águas subterrâneas e nos seus extratos

AMOSTRA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26
<b>INIBIÇÃO DIRETA (IR%)</b>	5,23	5,19	4,38	4,78	3,79	5,08	6,17	5,29	16,69	8,72	4,27	13,62	17,43	1,505	5,24	13,06	10,35	27,39	5,63	14,37	3,75	7,6	0	0	0	0
<b>INIBIÇÃO EXTRATO DILUÍDO (IR%)</b>	4,59	4,85	2,06	1,42	2,02	1,28	3,59	0	4,39	6	0	10,97	12,71	0	3,34	7,05	8,73	6,21	3,54	9,55	0	2,93	0	0	0	0

n=2.

IR= inibição relativa (da enzima AChE).

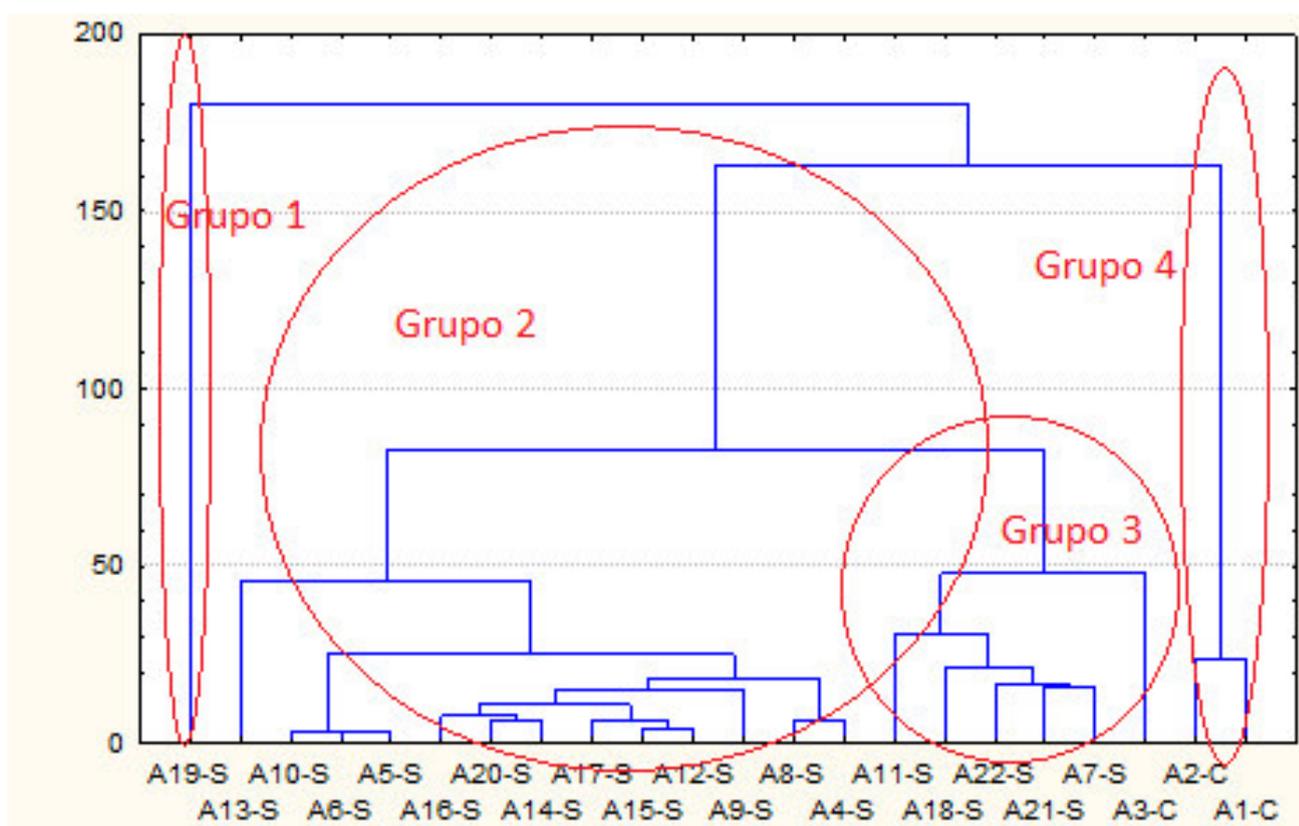
Fonte: Autora.

## 5.6 Análises Estatísticas de Correlação

Para avaliar a contribuição de cada parâmetro físico-químico sobre os resultados de inibição da AChE, foi realizado um estudo estatístico aplicando métodos multivariados. Assim, foram empregados os seguintes parâmetros: Temperatura, pH, Condutividade, Salinidade, Oxigênio Dissolvido, Sólidos Totais Dissolvidos, Potencial de Oxirredução e Inibição.

Inicialmente, tornou-se necessário comparar as amostras, para isso foi utilizada a Análise de Cluster, com o objetivo de identificar quais amostras de água apresentavam maiores similaridades entre si (Figura 8) no tocante aos resultados analíticos.

**Figura 8.** Dendograma da Análise de Cluster para as amostras de água



Fonte: Autora.

Através da Figura 8 é possível visualizar quatro agrupamentos. O grupo 2 se divide em dois subgrupos bem definidos, assim como o grupo 3. A amostra A19 (Santa Quitéria) se distingue das demais pelos seus valores de oxigênio dissolvido mais elevado. As amostras A2

e A1 formam o grupo 4, se diferenciando dos demais por apresentarem maiores valores de salinidade.

Após obter os agrupamentos do dendograma anterior, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Para tal, tornou-se necessário obter a matriz de correlação dos parâmetros. A Tabela 9 exibe as correlações existentes entre os 8 parâmetros. Neste trabalho, as baixas correlações entre as variáveis observadas podem ser em virtude da natural variabilidade dos parâmetros na água ( FRANÇA, 2009 ).

Através da matriz de correlação (Tabela 9) pode-se estimar o número de componentes principais. Inicialmente, foram calculados os autovetores e autovalores da matriz de correlação. Segundo França (2009), os autovalores em ordem decrescente estimam a importância das componentes principais. Os autovalores designam a variância explicada por cada uma das componentes principais. A Tabela 10 apresenta os valores encontrados.

Tabela 9. Matriz de correlação para os parâmetros físico-químicos

Variáveis	Correlações							
	T (°C)	pH	O.D (mg.L <sup>-1</sup> )	Condutividade (µS)	TDS (g.L <sup>-1</sup> )	Salinidade (%)	ORP(mΩ)	Inibição (%)
T (°C)	1,00000	0,142119	0,296973	0,181819	0,170042	0,196152	0,140119	-0,171675
pH	0,142119	1,00000	0,290822	<b>0,577140</b>	<b>0,586182</b>	0,336392	-0,120058	-0,114934
O.D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,296973	0,290822	1,00000	0,262691	0,315539	-0,136435	0,384342	-0,273840
Condutividade (µS)	0,181819	<b>0,577140</b>	0,262691	1,00000	<b>0,989170</b>	<b>0,590027</b>	-0,200587	-0,194396
TDS (g.L <sup>-1</sup> )	0,170042	<b>0,586182</b>	0,315539	<b>0,989170</b>	1,00000	<b>0,479009</b>	-0,133497	-0,169252
Salinidade (%)	0,196152	0,336392	-0,136435	<b>0,590027</b>	<b>0,479009</b>	1,00000	-0,556548	-0,235790
ORP(mΩ)	0,140119	-0,120058	0,384342	-0,200587	-0,133497	-0,556548	1,00000	0,220755
Inibição (%)	-0,171675	-0,114934	-0,273840	-0,194396	-0,169252	-0,235790	0,220755	1,00000

\*Valores em negrito representam as maiores correlações

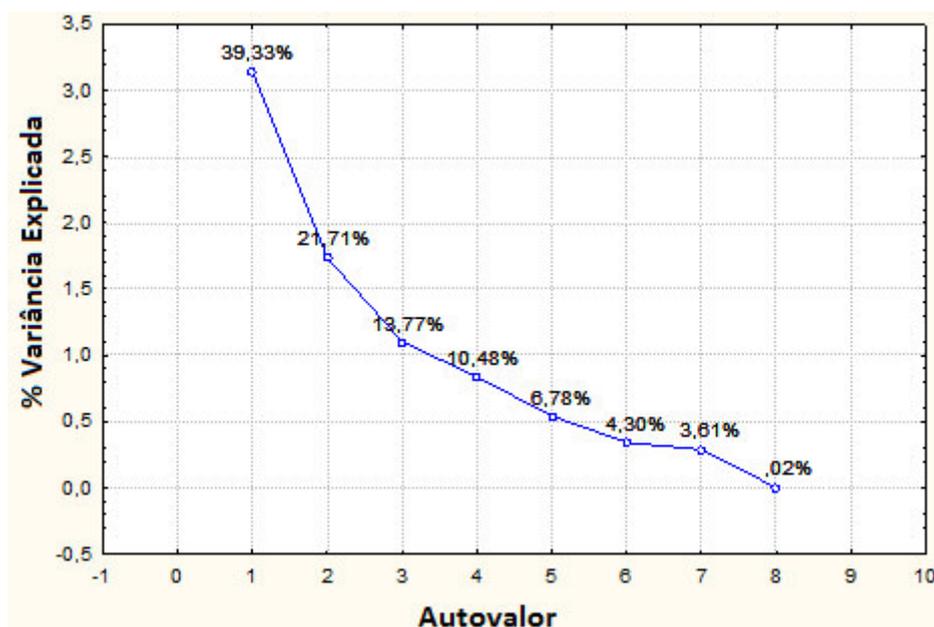
Fonte: Autora.

**Tabela 10.** Autovalores e variância total dos dados de análises físico-químicas das águas

	<b>Autovalor</b>	<b>% Da Variância Explicada</b>	<b>Autovalor Acumulado</b>	<b>% De Variância Acumulada</b>
<b>1</b>	3,146358	39,32942	3,146358	39,3295
<b>2</b>	1,737018	21,71273	4,883376	61,0422
<b>3</b>	1,101812	13,7765	5,985188	74,8149
<b>4</b>	0,838318	10,47897	6,823506	85,2938
<b>5</b>	0,542202	6,77753	7,365708	92,0714
<b>6</b>	0,343717	4,29639	7,709419	96,3677
<b>7</b>	0,288654	3,60817	7,998073	99,9759
<b>8</b>	0,001927	0,02409	8,000000	100,0000

Fonte: Autora.

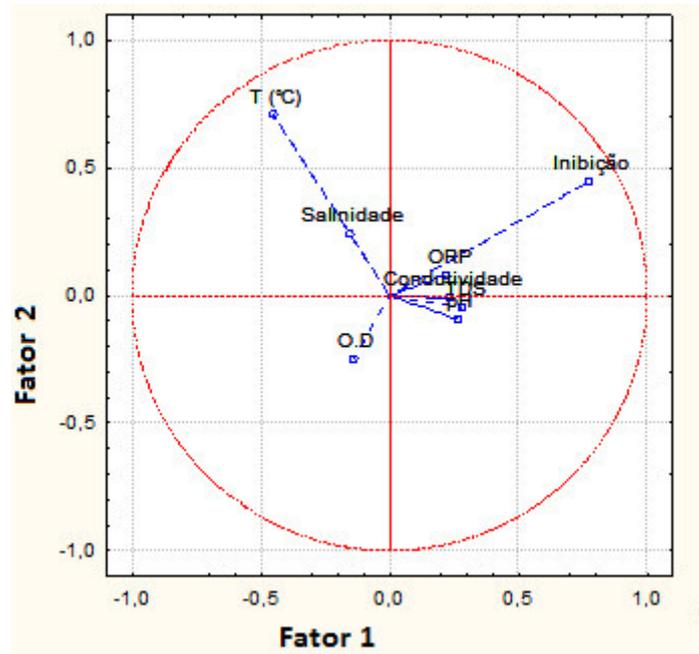
Para a escolha do número de componentes foi adotado o critério Kaiser (KAISER, 1958), onde o número de componentes principais é igual ao número de autovalores maiores que 1. Portanto, foram encontrados 3 componentes principais com porcentagem de variância de 74,814%. A Figura 9 apresenta os autovalores de Kaiser.

**Figura 9-** Variação da variância explicada em função dos autovalores de Kaiser

Fonte: Autora.

A projeção das variáveis em relação a dois componentes principais é apresentada na Figura 10.

**Figura 10-** Gráfico das cargas de dois Componentes Principais (CP1 x CP2)

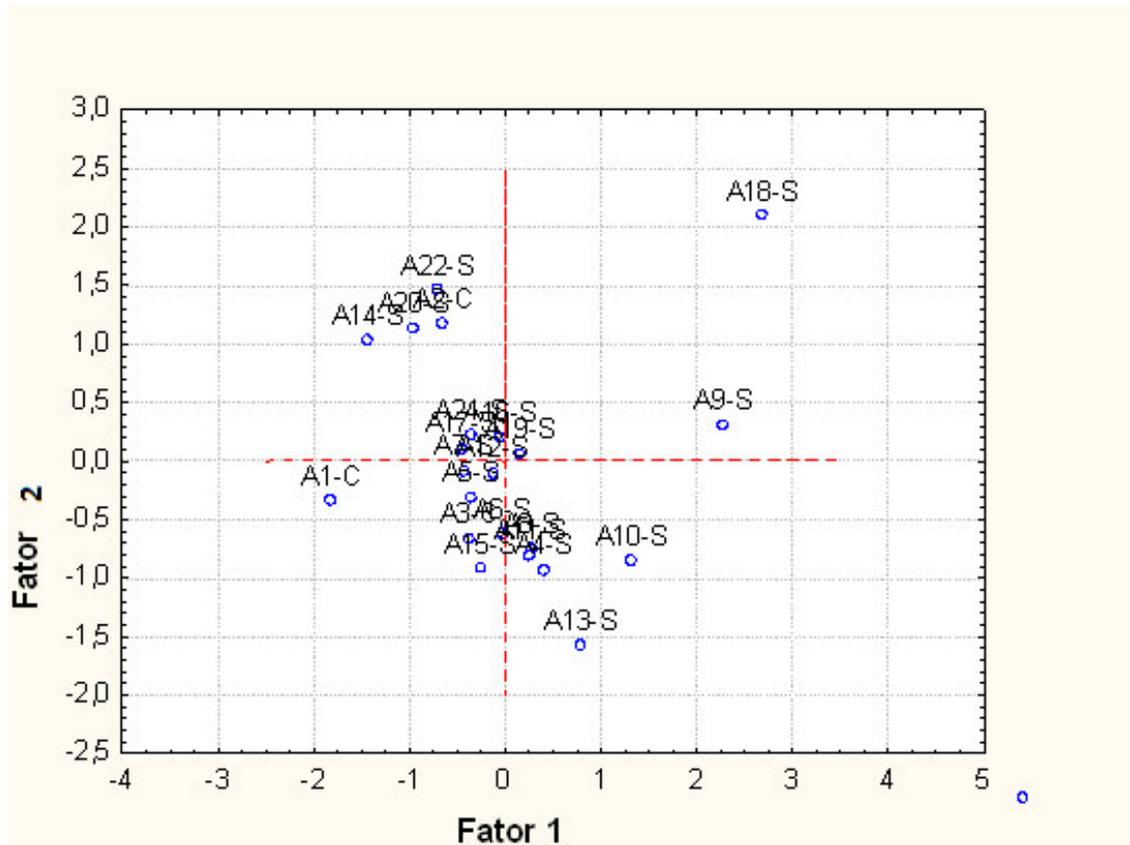


Fonte: Autora.

Pela sobreposição de variáveis, observou-se que um grande número de variáveis está relacionada negativamente com o CP1, enquanto outras estão relacionadas positivamente com o CP2. Entre todas as variáveis que contribuem fortemente para o CP2, e somente o parâmetro OD relaciona-se negativamente, como é possível visualizar na Figura 10.

Para se estabelecer uma localização das amostras no espaço das componentes principais, foi feito um diagrama dos escores das componentes principais, onde observou-se que para a maior parte das amostras analisadas as componentes 1 e 2 apresentam pouca interferência, no entanto apresenta grande influência na amostra A18 (Figura 11).

**Figura 11-** Projeção das amostras analisadas no plano dos Componentes Principais, por agrupamento



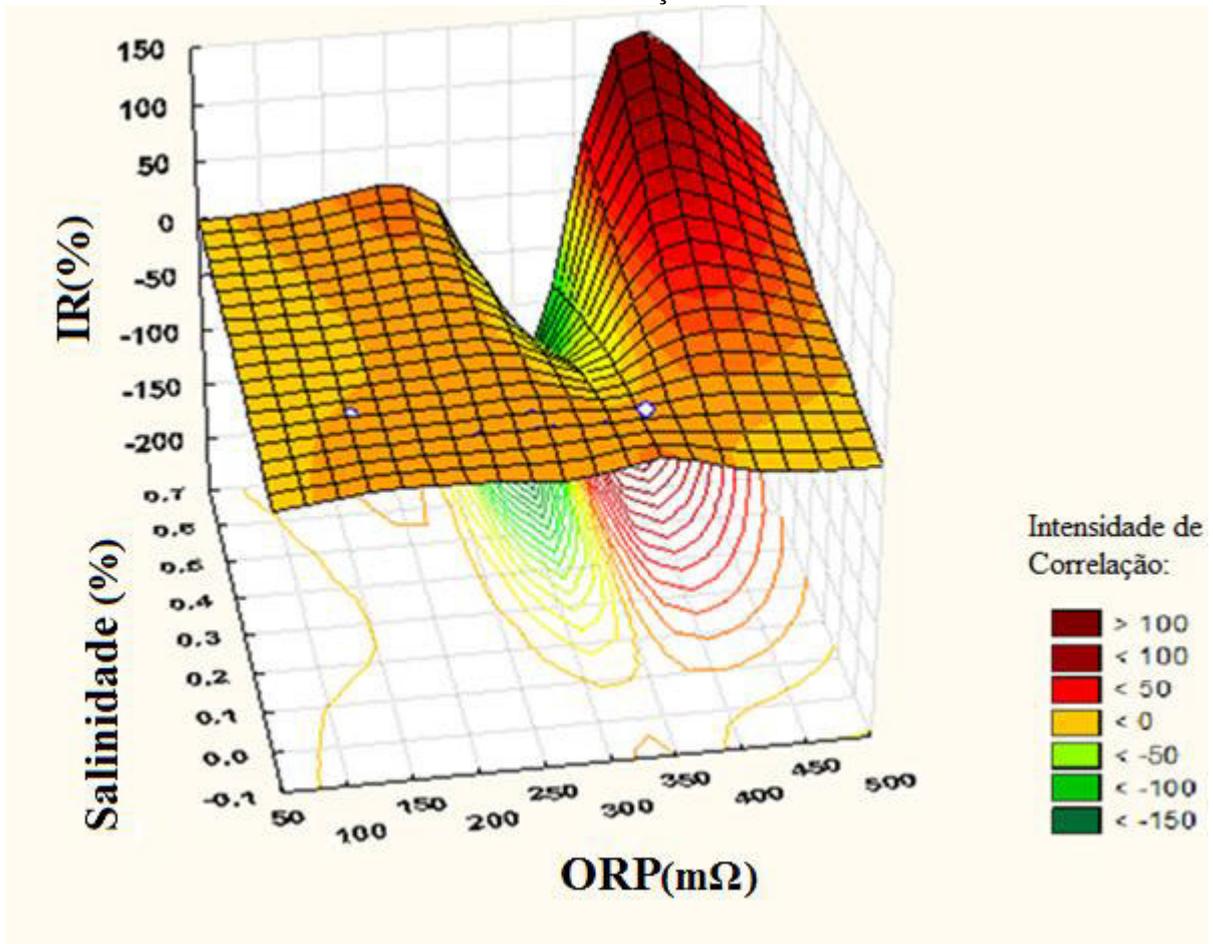
Fonte: Autora.

Através das projeções das Figuras 9 e 10, observa-se que a inibição está correlacionada positivamente com o potencial de oxirredução e negativamente com os parâmetros oxigênio dissolvido e salinidade, como também pode ser observada na matriz de correlação (Tabela 9).

Para observar melhor a correlação entre tais parâmetros foram feitos gráficos de superfície de resposta (Figuras 12 e 13).

É interessante mencionar que a enzima AChE tem melhor atuação em soluções com salinidade próxima à da lágrima humana (salinidade de 0,9%). Nessas condições, a influência de pequena quantidade de inibidores pode não afetar significativamente sua atividade enzimática, o que reduz a possibilidade de haver inibição. Já em relação ao potencial de oxirredução, o aumento desse parâmetro pode alterar a estrutura da enzima, de tal forma a diminuir sua atividade, o que poderia resultar em uma pequena inibição.

**Figura 12-** Superfície de resposta em 3Dimensões –Potencial de Oxirredução (ORP) *versus* Salinidade *versus* Inibição

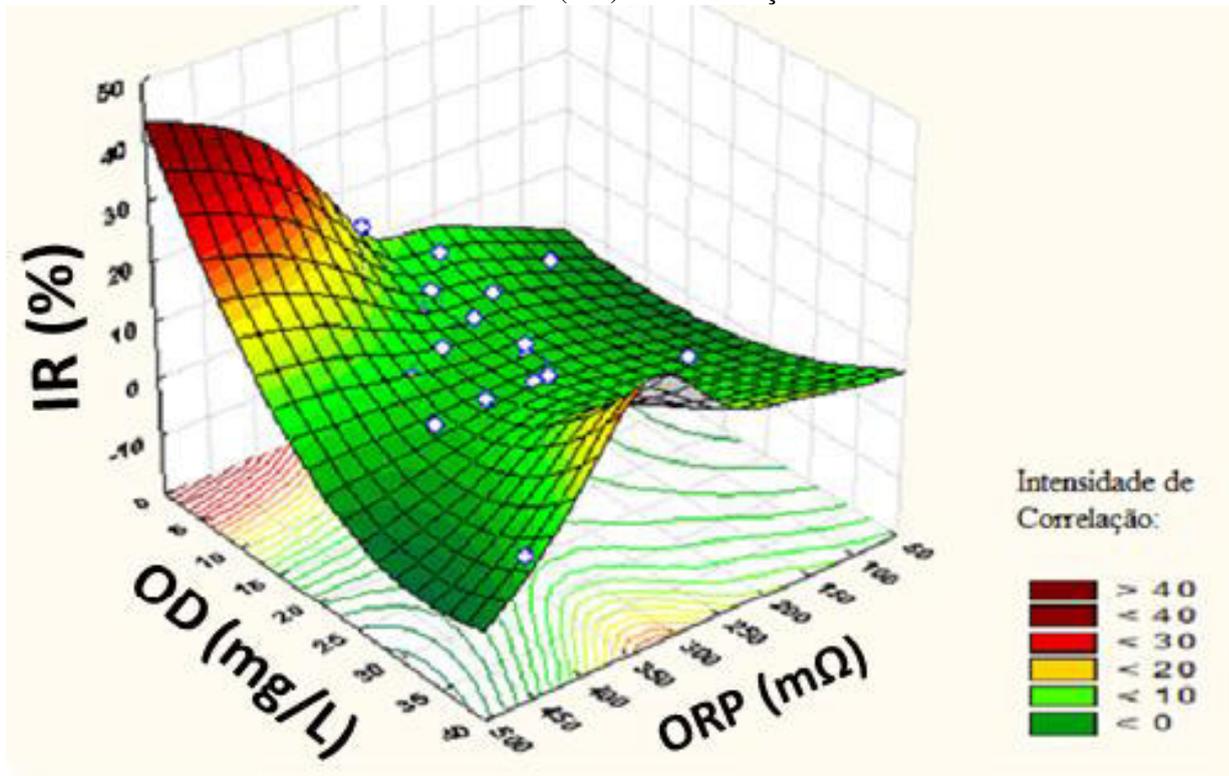


IR= inibição relativa; ORP= potencial de oxirredução.

Fonte: Autora.

A Figura 12 mostra que em locais com baixos teores de salinidade (0,6%), a inibição está fortemente correlacionada com o parâmetro ORP, observando-se quando este parâmetro atinge 250 mΩ as águas começam a gerar uma inibição natural da enzima, sendo esta inibição mais forte quando o parâmetro ORP apresenta 400 mΩ. Tais características foram observadas nas amostras que apresentaram inibição acima de 10% em águas diretamente analisadas com o biossensor.

**Figura 13-** Superfície de resposta em 3Dimensões –Potencial de Oxirredução (ORP) *versus* Oxigênio Dissolvido (OD) *versus* Inibição



IR= inibição relativa; OD= oxigênio dissolvido; ORP= potencial de oxirredução.

Fonte: Autora.

Da Figura 13 observa-se que, independente do valor de oxigênio dissolvido e com valores de potencial de oxirredução acima de 150 mΩ, há uma inibição natural. Portanto, o estudo estatístico desenvolvido demonstra que os parâmetros potencial de oxirredução e salinidade foram os que mais contribuíram para o processo de inibição, podendo ser estes a causa da inibição observada em algumas amostras. Isso vem demonstrar que nas amostras que apresentaram inibição fraca, esta foi natural, e não devido à presença de poluentes.

Como o presente estudo foi conduzido em locais onde a atividade humana é praticamente inexistente, os resultados encontrados corroboram com o esperado, ou seja, as inibições relativas abaixo de 10% indicaram a ausência de resíduo de OFs nas águas subterrâneas do Estado do Maranhão. No entanto, ressalta-se a necessidade desse monitoramento ser feito constantemente, a fim de se alimentar o banco de dados e garantir a qualidade ambiental nas áreas.

Os biossensores demonstraram, assim, serem eficazes para a realização deste tipo de estudo.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo objetivou conhecer aspectos da qualidade ambiental de áreas não antropizadas do Estado do Maranhão, tendo sido analisadas amostras de solos e de águas subterrâneas em 50 e 26 pontos amostrais, respectivamente. Em relação aos parâmetros físico-químicos de qualidade, não foram observadas alterações que pudessem comprometer a qualidade dos ecossistemas. O mesmo se deu em relação à presença de resíduos de inseticidas organofosforados, que não foi evidenciada em nenhuma das amostras, indicando que, apesar do uso contínuo e até mesmo descontrolado desses produtos nas áreas agrícolas do Estado, a contaminação provocada por esses compostos ainda não atingiu os compartimentos ambientais de áreas consideradas preservadas. Contudo, o presente estudo ressalta a necessidade de monitoramento ambiental constante no Estado do Maranhão e também no Brasil, afim de que se mantenha a qualidade de solos e das reservas de águas subterrâneas do país.

Um aspecto técnico importante que necessita ser destacado na presente pesquisa é o biossensor amperométrico construído à base da enzima acetilcolinesterase. O biossensor apresentou, como caráter inovador, uma macroalga estuarina atuando, juntamente com a AChE, como elemento modificador do eletrodo de trabalho. Isso conferiu ao protótipo um excelente desempenho, no que tange à sensibilidade e à velocidade das respostas cronoamperométricas, além de adequadas estabilidade e reprodutibilidade. Assim, a performance de tais biossensores evidenciou que estes podem ser utilizados em estudos para controle e monitoramento de compostos OFs, pois permitem a sua triagem em matrizes ambientais as mais variadas, sejam eles solos, sedimentos e águas.

## REFERÊNCIAS

- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, 2008, 25, 5, 835-841.
- ANDREA, M. M. Contaminação do solo por pesticidas. **O Biológico**, 1998, 60, 2, 63-65.
- BATISTA, S. Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral. Tese de Doutorado, ISA, 2003.
- BOLAN, N. S.; NAIDUR, R.; SYERS, J. K.; TILLMAN, R. W. Surface charge and solute interactions in soils. **Advances in Agronomy**, 1999, New York, 67, 87-140.
- BRASIL. Ministério da saúde. Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 39.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Conselho Nacional do Meio Ambiente*. Resolução conama nº 396, de 3 de abril de 2008, Seção 1, 64-68.
- BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral - DNPM. Mapa Geológico do Estado do Maranhão. DNPM: 1986.
- BURIDI, K. R.; GEDALA, R. K. Study on Determination of Physicochemical Parameters of Ground Water in Industrial Area of Pydibheemavaram, Vizianagaram District, Andhrapradesh, India. **Austin J Public Health Epidemiol**. 2014, 1, 2.
- CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco da contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. **Química Nova**, 2008, 31, 1982-1986.
- CETESB–Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. 248 p. São Paulo, 2001. Disponível em: <[http://www.cati.sp.gov.br/novacati/microbacias/documentos/qualidade\\_agua/aguas\\_final.pdf](http://www.cati.sp.gov.br/novacati/microbacias/documentos/qualidade_agua/aguas_final.pdf)>. Acesso em: 30 Abril. 2015.
- DE CIRNE E PATACAS, R. Desenvolvimento, Caracterização e Otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, 2007.

DIRECTIVE 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.

DU, D.; WANG, M.; CAI, J.; TAO, Y.; TU, H.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing. **Analyst**, 2008, 133, 1790-1795.

DVIRA, H.; SILMANB, I.; HARELA, M.; ROSENBERRYC, T.L.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, 2010, 187, 10-22.

ELLMAN, G. L. COURTNEY, K.P.; ANDRES, V.; FEARSTHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase active. **Biochem. Pharmacol.**, 1961, 7, 2, 88-95.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). *Manual de métodos de análise de solo* / Centro Nacional de Pesquisa de Solos. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, **1997**, 212.

ESKENAZI, B.; MAIZLISH, N. A. Effects of Occupational Exposure to Chemicals on Neurobehavioral Functioning, In: R. E. TARTER, D. H. V. THIEL AND K. L. EDWARDS, Eds., *Medical Neuropsychology: The Impact of Disease on Behavior*, New York, 1988, 409-419.

ESTEVEZ, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998.

ESTEVEZ, E.; CABRERA, M. C.; MOLINA-DÍAS, A.; ROBLES-MOLINA, J.; PALACIOS-DÍAS, M. P. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). **Science of the Total Environment**. 2012, 433, 538-546.

FERLEMI, A. V.; AVGOUSTATOS, D.; KOKKOSIS, A. G.; PROTONOTARIOS, V.; CONSTANTINOU, C.; MARGARITY M. Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain. **Physiology & Behavior**, 2014, 131, 115-122.

FERREIRA, L. F. Biossensor amperométrico à base de tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais. Dissertação de Mestrado, Uberlândia, 2005.

FRANÇA, M. S. Análise estatística multivariada dos dados de monitoramento de qualidade de água da bacia do alto Iguaçu: uma ferramenta para a gestão de recursos hídricos. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2009.

GERALDES, A. L. V. R. Ocorrência e Prevenção do Risco de Pesticidas em Águas Superficiais e Subterrâneas Potencialmente Usadas para Consumo Humano. Dissertação de Mestrado, Lisboa, 2012.

HANSEN, B. Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HASSETT, P. T.; LEE, F. G. Modeling of pesticides in aqueous environment. In: HAQUE, R.; FREED, W. H., eds. **Environmental Dynamics of Pesticide**, 1975, New York, Plenum Press., 173-184.

HIGARASHI, M. M. Processos Oxidativos Avançados aplicados à remediação de solos brasileiros contaminados com pesticidas. Tese de Doutorado, Unicamp, 1999.

IBGE, <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=21&search=maranhao>. Acesso em 20 de Setembro de 2014

KAISER, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, 1958, 23, 187- 200.

KAVRUK, M.; ÖZALP, V. C.; ÖKTEM, H. A. Portable Bioactive Paper-Based Sensor for Quantification of Pesticides. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2013, 8.

KESIK, M.; KANIK, F. E.; TURAN, J.; KOLB, M.; TIMUR, S.; BAHADIR, M.; TOPPARE, L. An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides. **Sensors and Actuators B**, 2014, 205, 39–49.

KESTWAL, R. M.; BAGAL- KESTWAL, D.; CHIANG, B-H. Fenugreek hydrogel agarose composite entrapped gold nanoparticles for acetylcholinesterase based biosensor for carbamates detection. **Analytica Chimica Acta**. 2015, 886, 143–150.

LEITE, C. M. Desenvolvimento de biossensores amperométricos à base de enzimas acetilcolinesterase geneticamente modificadas contendo uma macroalga estuarina para a detecção do inseticida paration metílico. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

LIU, Y.; WEI, M. Development of acetylcholinesterase biosensor based on platinum–carbon aerogels composite for determination of organophosphorus pesticides. **Food Control**. 2014, 36, 49–54.

LOKKA, K.; Skandamis, P.; Kintzios, S. Screening of Total Organophosphate Pesticides in Agricultural Products with a Cellular Biosensor. *CellBio*, 2013, 2, 131-137.

LUCHINI, L. C. Degradação do inseticida paration etílico em diversas matrizes ambientais por meio de radiação ionizante gama do Cobalto-60. Tese de Doutorado, São Carlos, 1995.

MARION, L. F. Avaliação da qualidade do solo em propriedades agrícolas familiares em sistema de cultivo convencional e de bases ecológicas, Santa Cruz Do Sul, RS, Brasil. Dissertação de Mestrado, Santa Cruz do Sul, 2011.

MARQUES, P. R. B. O. Metodologias analíticas envolvendo cromatografia gasosa e biossensores enzimáticos para controle de resíduos de pesticidas em amostras ambientais. Dissertação de Mestrado, São Luís, 2001.

MARTINEZ, M. T. Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para detecção de pesticidas da classe de carbamatos. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MARTINS, G. L. Determinação de resíduos de pesticidas em solos de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS. Dissertação de Mestrado, Santa Maria, 2010.

MENDONÇA, C. D. Construção de biossensores amperométricos à base da enzima acetilcolinesterase contendo uma macroalga de ambiente estuarino para detecção de agentes anticolinesterase. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

METHOD 3620C - Environmental Protection Agency. Disponível em: [www3.epa.gov/epawaste/hazard/.../pdfs/3620c.pdf](http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/.../pdfs/3620c.pdf). Acesso em: 19 de fevereiro. 2016.

METHOD 8270D - Environmental Protection Agency. Disponível em: [www3.epa.gov/epawaste/hazard/.../pdfs/8270d.pdf](http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/.../pdfs/8270d.pdf)Epa. Acesso em: 19 de fevereiro. 2016.

NAKSEN, W.; PRAPAMONTOL, T.; MANGKLABRUKS, A.; CHANTARA, S.; THAVORNYUTIKARN, P.; SRINUAL, N.; PANUWET, P.; RYAN, P.B.; RIEDERER, A. M.; BARR, D.B. Associations of maternal organophosphate pesticide exposure and PON1 activity with birth outcomes in SAWASDEE birth cohort, Thailand. **Thailand Environmental Researc**. 2015, 142, 288.

NOGUEIROL, R. C. Extração sequencial e especiação de metais pesados, e emissão de gases do efeito estufa em neossolo litólico contaminado com resíduo rico em Ba, Cu, Ni, Pb e Zn. Dissertação de Mestrado, Piracicaba, 2008.

NUNES, G.S.; LINS, J.A.P.; SILVA, F.G.S.; ARAUJO, L.C.; SILVA, F.E.P.S.; MENDONÇA, C.D.; BADEA, M.; HAYAT, A.; MARTY, J.-L. Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. **Chemosphere**, 2014, 111, 623–630.

NUNES, G. S.; SANTOS, C. L.; SILVA, H. S. V. P.; ANDRADE, G. V. Avaliação da contaminação de corpos d'água adjacentes a áreas agrícolas da ilha de São Luís (MA) por agrotóxicos. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, 2012, 22, 85-95.

NUNES, G.S.; MONTESINOS, T.; MARQUES, P.B.O.; FOURNIER, D.; MARTY, J. L. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. **Anal. Chim. Acta**, 2001, 434, 1, 1-8, Apr.

NUNES, G. S. et al. Evaluation of highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterases charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Anal. Chim. Acta**, 1999, 399, 1-2, 37-49.

OLIVEIRA, R. T. Quantificação de pesticidas utilizando técnicas eletroanalíticas. **Revista Nucleus**. 2004, 2, 1, abr./out, 85-97.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Treds in Analytical Chemistry**, 2002, 21, 96-114.

PEREIRA, N. M. Desenvolvimento e aplicação de um biossensor à base da enzima acetilcolinesterase empregando NTCPM/CoTSPc para a determinação de pesticidas organofosforados. Dissertação de Mestrado, Diamantina, 2013.

PERES, T. B. Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do <sup>14</sup>C-paration metílico. Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2000.

RAGHU, P.; REDDY, T. M.; REDDAIAH, K.; SWAMY, B.E. K.; SREEDHAR, M. Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of Malathion and Acephate in food samples: A voltammetric study. **Food Chemistry**, 2014, 142, 188–196.

RAMOS, S. M. S. Isolamento e seleção de fungos de solo para a biodegradação do pesticida organofosforado clorpirifós. Dissertação de Mestrado, Recife, 2014.

RAO, P. S. C.; MANSELL, R. S.; BALDWIN, L. B.; LAURENT, M. F. Pesticides and their behaviour in soil and water. **Soil Science Fact Sheet**, 1983, 40.

RIBEIRO, A. C. A.; DORES, E. F. G. C.; AMORIM, R. S. S.; LOURENCETTI, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. **Química Nova**, 2013, 284-290.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKENE, S.; OLIVEIRA, L.C. Pesticidas: Usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS Environment**, 2008, 8, 53-71.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Quim. Nova**. 2007, 30, 3, 688-694.

ROCHA, C. I. O. Qualidade da água subterrânea utilizada para consumo humano no entorno do cemitério do campo santo em Salvador/BA. Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2014.

SANTOS, E. S.; ZANELLO, S. Análises físico-químicas das águas e de solos do rio canguiri. [www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-8.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-8.pdf). Acesso em fevereiro de 2016

SANTOS, A. G. S. Qualidade da água subterrânea utilizada para consumo humano no entorno do cemitério do Campo Santo em Salvador/BA. Dissertação de Mestrado, Salvador, 2014.

SANTOS, J. M. M. Índice de qualidade de água subterrânea aplicado em área de aquíferos cristalinos com uso agrícola: Bacia do Rio São Domingos – RJ. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, 2009.

SASSOLAS, A.; PRIETO-SIMON, B.; MARTY, J-L. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American. Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 3, 210-232.

SKLÁDAL, P. Determination of organophosphate and carbamates pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 252, 1-2, 11-15.

SHAMAGSUMOVA, R.V.; SHURPIK, D. N.; PADNYA, D. L.; STOIKOV, I. I.; EVTUGYN, G. A. Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar[5]arene. *Talanta*. 2015, 144, 559.

SILVA, F. G. S. Biossensores seletivos para detecção de pesticidas anticolinesterases em águas e alimentos. Monografia de conclusão de curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2014.

SILVA, D. D.; MIGLIORINI, R. B.; SILVA, R. C.; LIMA, Z. M.; MOURA, I. B. Falta de saneamento básico e as águas subterrâneas em aquífero freático: região do Bairro Pedra Noventa, Cuiabá (MT). *Eng Sanit Ambient*. 2014, 19, 1, jan/mar, 43-52.

SILVA, F. V. Avaliação da contaminação das águas subterrâneas por atividade cemiterial na cidade de Maceió. Dissertação de Mestrado, Maceió, 2012;

SILVA, M. P. Determinação de pesticidas organofosforados através do método enzimático. Tese de Doutorado, Campinas, 2011.

SILVA, A. A. *et. al.* Herbicidas: Comportamento no Solo. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, Viçosa: Ed. UFV, Cap 5, 189-248, 2007.

SILVA, I. L. A. Monitoração de pesticidas em ambientes de intensa atividade agrícola na região do norte fluminense. Monografia de conclusão de curso, Rio de Janeiro, 2006.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. *Biosens. and Bioelectron*, 2001, 16, 121.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2006, 22, 2391-2399.

VIDAL, L, CANALS, A. KALOGERAKIS, N. PSILLAKIS, E. *J. Chromatogr. A* 2005, 1089, 25–30.

WANG, J.; YOKOKAWA, M.; SATAKE, T.; SUZUKI, H. A micro IrO<sub>x</sub> potentiometric sensor for direct determination of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, 220, 859–863.

WARNER, J.; ANDREESCU S. An acetylcholinesterase (AChE) biosensor with enhanced solvent resistance based on chitosan for the detection of pesticides. *Talanta*. 2016, 146, 279–284.

WEI, M.; WANG, J. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, 211, 290–296.

WILSON, B. W. Cholinesterase inhibition, in *Encyclopedia of Toxicology*, P.Wexler, Ed., Elsevier, New York, NY, USA, 2nd edition, p. 588–599, 2005.

WHO. Guidelines for drinking-water quality world health organization, IV edn. WHO, Geneva, 2011.

YU, G.; WU, W.; ZHAO, Q.; WEI, X.; LU, Q. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 15 June 2015, 68, 288–294.

ZAMBRONE, F. A. D. *Ciência hoje*. Revista SBPC, v. 4, n. 22, p. 44-56, 1986.