

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a
acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como
biomarcador da exposição ocupacional

AMANDA GUEDES LINHARES

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a
acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como
biomarcador da exposição ocupacional

AMANDA GUEDES LINHARES

Prof. Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR
Orientador

RECIFE
2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Linhares, Amanda Guedes

Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional / Amanda Guedes Linhares. – Recife: O Autor, 2014.

81 f.: il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Pesticidas I. Carvalho Júnior , Luiz Bezerra de (orient.) II. Título.

632.95

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-126

AMANDA GUEDES LINHARES

Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos na
acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como
biomarcador da exposição ocupacional

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE, como requisito final exigido para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas.

Data de aprovação: ____ / ____ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. PhD. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
UFPE – Laboratório de Enzimologia
Departamento de Bioquímica

Dra. Elba Verônica M. Maciel de Carvalho
UFPE – Laboratório de Glicoproteínas
Departamento de Bioquímica

Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis
UFPE – Laboratório de Enzimologia
Departamento de Bioquímica

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força e perseverança para alcançar mais esse objetivo.

Aos meus pais, José e Catarina e irmãos, André e Artur, por estarem sempre ao meu lado e por sempre me apoiarem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr., pela confiança em mim e nesse trabalho.

Ao colega Caio Rodrigo Dias de Assis, pelo apoio.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa trajetória.

RESUMO

Apesar do aumento na produtividade agrícola proporcionado pelos pesticidas, o uso inadequado dessas substâncias traz impactos negativos à saúde humana e ambiental. Estimativas de eficiência de aplicação relatam que apenas cerca de 0,1% dos pesticidas aplicados atingem as pragas-alvo, enquanto o restante se espalha pelo ambiente. Além disso, os recursos financeiros economizados ao se evitar o ataque de pragas terminam sendo gastos na recuperação dos danos à saúde pública e ao meio ambiente causados pelos próprios pesticidas. Diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas utilizando as enzimas colinesterases como biomarcadores de pesticidas organofosforados e carbamatos, tendo em vista sua alta especificidade em relação a esses compostos. Para utilização dessas biomoléculas como biomarcadores de pesticidas, estudos preliminares são realizados analisando-se as alterações provenientes de sua interação. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método para extração e determinação da atividade da AChE eritrocitária humana e avaliar a precisão do método na detecção de pesticidas, comparando os resultados de inibição com a legislação nacional e internacional vigente. Dessa forma, membranas de eritrócitos livres de hemoglobina foram extraídas e utilizadas na análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) ancorada nessas células. A evidência da atividade da enzima foi comprovada através da inibição seletiva utilizando dibrometo de 1,5-bis (4-alil-dimetilamônio-fenil) pentan-3-ona (BW284c51), tetraisopropil pirofosforamidato (Iso-OMPA) e brometo de neostigmina. As amostras de sangue foram expostas a treze concentrações de três pesticidas organofosforados (diclorvós, clorpirifós e diazinon) e dois carbamatos (carbaril e carbofuran). As concentrações dos pesticidas capazes de inibir a atividade da enzima em 50% (CI₅₀) foram 10,66 µM (diclorvós), 21,42 µM (clorpirifós), 109,98 µM (carbaril) e 5,44 µM (carbofuran). O diazinon não atingiu 50% de inibição da atividade enzimática na faixa de concentração utilizada. Os resultados relativos a 20% de inibição da atividade enzimática (CI₂₀ - nível utilizado na estimativa dos limites mínimos de resíduos de compostos anticolinesterásicos) foram inferiores aos valores de ingestão diária aceitável (IDA) para cada pesticida recomendados pela ANVISA, OMS, FAO, ATSDR, EFSA e USEPA com exceção do organofosforado diazinon. Sendo assim, o *cut-off* de 20% de inibição da atividade da AChE eritrocitária foi escolhido para avaliar a sensibilidade e a especificidade, parâmetros de confiabilidade do método, capazes de minimizar a influência de falsos positivos e falsos negativos na análise. Os valores de sensibilidade para os pesticidas investigados situaram-se acima de 80%, exceto para o diazinon, enquanto que os valores de especificidade para todos os pesticidas estiveram acima de 60%. Estes resultados sugerem que os métodos de extração da AChE eritrocitária e de determinação de sua atividade propostos podem ser ferramentas adequadas para o monitoramento da exposição ocupacional aos agrotóxicos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Eritrócito. Biomarcador. Organofosforados. Carbamatos.

ABSTRACT

Regardless the increase in agricultural productivity supported by pesticides, improper use of these substances brings negative impacts to human health and the environment. Application efficiency estimates report that only about 0.1 % of the applied pesticides reach the target pest while remaining material spreads in the environment. Moreover, financial resources saved through avoiding pest attack end up being spent on the recovery of damage to public health and the environment caused by such pesticides. Several methodologies have been developed using the enzymes cholinesterases as biomarkers of organophosphate and carbamate pesticides due to its high specificity towards these compounds. The present work aimed to develop a method for the extraction and assay of human erythrocyte AChE activity and to evaluate the accuracy of the method for detection of pesticides besides comparing the inhibition results to national and international regulations. Thus, free-hemoglobin erythrocyte membranes were extracted and used in the analysis of the activity of acetylcholinesterase (AChE) bound to these cells. Evidence of this enzyme activity was confirmed by selective inhibition using 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), tetraisopropyl pyrophosphoramidate (Iso-OMPA) and neostigmine bromide. Blood samples were exposed to thirteen concentrations of three organophosphorus (dichlorvos, diazinon and chlorpyrifos) and two carbamate pesticides (carbaryl and carbofuran). The concentrations of pesticides that can inhibit the enzyme activity by 50% (IC_{50}) were 10.66 μ M (dichlorvos), 21.42 μ M (chlorpyrifos), 109.98 μ M (carbaryl) and 5.44 μ M (carbofuran). Diazinon did not reach 50% inhibition of AChE activity in the concentration ranged used. The results for 20 % inhibition of enzyme activity (CI_{20} - level used in the estimation of thresholds limits for anticholinesterase compounds) were lower than the acceptable daily intake (ADI) for each pesticide recommended by ANVISA, WHO, FAO, ATSDR, EFSA and USEPA excepting the organophosphate diazinon. Thus, the cut-off of 20 % inhibition of erythrocyte AChE activity was chosen to evaluate the sensitivity and specificity, parameters capable of minimizing the influence of false positives and false negatives in the analysis. Sensitivity values for pesticides investigated were above 80 %, except for diazinon, whereas specificity values for all pesticides were above 60 %. These results suggest that the proposed methods for extraction and assay of erythrocyte AChE activity may be adequate tools for monitoring occupational exposure to pesticides.

Keywords: Acetylcholinesterase. Erythrocyte. Biomarker. Organophosphorus. Carbamate pesticides.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFIA

Figura 1 – Antigo uso do inseticida organoclorado DDT no combate ao piolho, na década de 1950. Foto do Museu norueguês da infância <i>Norsk Barnemuseum</i> , Stavanger, Noruega (WHO, 2008).....	4
Figura 2 – Fórmula estrutural geral dos organofosforados.....	8
Figura 3 – Metabolismo e ativação do OP diazinon em fígado humano adaptado de Kappers et al. (2001).....	10
Figura 4 – Metabolismo e ativação do OP clorpirifós em fígado humano adaptado de Wessels et al. (2003).....	10
Figura 5 – Fórmula estrutural geral dos carbamatos.....	11
Figura 6 – Formas das colinesterases encontradas em vertebrados. Splicing alternativo do RNA mensageiro pode originar isoformas hidrofílicas e anfifílicas da enzima (adaptado de Chatonnet e Lockridge, 1989).....	14
Figura 7 – Estrutura tridimensional da AChE da arraia elétrica <i>Torpedo californica</i> . A estrutura é apresentada como um diagrama de fitas, com o N-terminal abaixo à esquerda e o C-terminal acima à direita. A entrada da cavidade do sítio ativo situa-se no topo e a superfície da cavidade é delineada em rosa. Triptofano 84, o resíduo-chave no sub-sítio aniônico do sítio ativo, está representado em roxo enquanto o triptofano 279, o resíduo-chave do sítio aniônico periférico está, em azul, na entrada da cavidade. O resíduo-chave do sub-sítio esterásico do sítio ativo, serina 200, é mostrado em vermelho enquanto os resíduos fenilalanina 288 e fenilalanina 290, que delineam a bolsa acil, são mostrados em preto (Silman e Sussman, 2005).....	16
Figura 8 – Desenho esquemático do ciclo da acetilcolina onde é possível observar o papel da acetilcolinesterase desativando o excesso desse neurotransmissor. Colina e acetato são liberados na fenda sináptica e a colina é reabsorvida pelo neurônio, onde a acetilcolina é resintetizada pela ação da enzima Colina acetil-transferase. O acetato atravessa a barreira hemato-encefálica e é metabolizado em outros tecidos.....	17
Figura 9 – Desenho esquemático da hidrólise da acetilcolina, catalizada pela AChE, na qual observa-se a ação dos sítios aniônico (atração e posicionamento do substrato) e esterásico (quebra da ligação éster) (fonte: Fukuto, 1990).....	18
Figura 10 - Hidrólise de ésteres pela AChE. Acima, observa-se a acilação do sítio ativo da enzima e abaixo a desacilação. O esquema inicia-se com a formação do complexo	

enzima-substrato reversível e os intermediários tetraédricos similares ao estado de transição são mostrados entre colchetes (Fonte: Tōugu, 2001).....	18
Figura 11 – Representação da AChE eritrocitária na qual observa-se o dímero unido por pontes dissulfeto e ligado à membrana eritrocitária através de âncoras de fosfatidilinositol (fonte: Taylor, 1991).....	20
Figura 12 – Representação esquemática da interação entre o inibidor (clorpirifós-oxon) e o sítio ativo da AChE. A tríade catalítica situa-se próximo à base de uma cavidade estreita e profunda que alcança o centro da estrutura globular da proteína. O alinhamento aromático nas paredes da cavidade direciona a molécula servindo como mecanismo-guia para posicionar o inibidor. Adaptado de Casida e Quistad (2004).....	21
Figura 13 – Estado de transição na interação entre enzima e organofosforado. No detalhe, as ligações envolvidas. Adaptado de ATSDR (2007).....	22
Figura 14 – Representação esquemática entre as duas possibilidades de ocorrência durante a duração do complexo enzima-OP: reativação espontânea ou aging. Adaptado de ATSDR (2007).....	22
Figura 15 – Antes de sofrer “aging”, R2 estava atraindo os elétrons do “P”. Após a remoção de R2, esses elétrons são compartilhados com “O”-Serina, fortalecendo a ligação, que não pode ser hidrolisada nem mesmo com a presença de oximas (ATSDR, 2007).....	22
Figura 16 – Ação de uma oxima sobre a ligação fosfoéster entre a enzima e o organofosforado. Adaptado de ATSDR (2007).....	23

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 – Effect of (A) BW284c51, (B) Iso-OMPA and (C) neostigmine bromide from 0.001 to 10 mM on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase; Iso-OMPA: tetraisopropyl pyrophosphoramidate; BW284c51: 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide..... 47

Figure 2 – Effect of (A) dichlorvos, (B) diazinon and (C) chlorpyrifos from 0.01 to 100 µg/mL on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase..... 48

Figure 3 - Effect of (A) carbaryl and (B) carbofuran from 0.01 to 100 µg/mL on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase..... 49

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Classes de inseticidas mais vendidos no mundo e sua participação no mercado mundial (Nauen e Bretschneider, 2002; Jeschke et al., 2011 ^a ; University of York, 2013 ^b).....	7
Tabela 2 - Exemplos de inseticidas organofosforados de acordo com os grupamentos éster ligados ao átomo de fósforo (Paudyal, 2008; Assis et al., 2011).....	9
Tabela 3 - Exemplos de inseticidas organofosforados de acordo com a lipofilicidade (Assis et al., 2011).....	9
Tabela 4 - Sinais e sintomas das intoxicações por inseticidas organofosforados.....	12
Tabela 5 – Fatores causadores de variação da atividade das colinesterases do sangue.....	26

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – ADI, IC₂₀ and IC₅₀ for human RBC AChE referring to pesticides under study..... 53

Table 2 – Sensitivity and Specificity^a of the human erythrocyte AChE and pesticide inhibition method in relation to pesticides under study..... 54

LISTA DE ABREVIACÕES

Abreviação	Descrição
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BChE	Butirilcolinesterase
CB	Carbamato
ChE	Colinesterase
CI ₂₀	Concentração capaz de inibir a enzima em 20% de sua atividade
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir a enzima em 50% de sua atividade
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5,5'Ditiobis(2-nitrobenzóico)
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	Food and Agriculture Organization
HCl	Ácido clorídrico
IDA	Ingestão Diária Aceitável
OMPA	Octametil-pirofosforamida
OMS	Organização Mundial da saúde
OP	Organofosforado
PC	Peso Corporal
SNC	Sistema Nervoso Central
TEPP	Tetraetil-pirofosfato
Tris	Tris-hidróximetil-aminometano
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	IV
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	VI
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	VII
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Uso de agrotóxicos e problemas de saúde pública.....	3
2.2. Pesticidas.....	5
- <i>Organofosforados e Carbamatos</i>	6
2.3. Enzimas colinesterases.....	13
- <i>Acetilcolinesterase</i>	16
- <i>Acetilcolinesterase eritrocitária</i>	19
2.4. Interação entre a AChE e os pesticidas.....	20
2.5. Monitoramento da exposição ocupacional.....	24
- <i>AChE eritrocitária no monitoramento da exposição ocupacional</i>	24
3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
4. CAPÍTULO II – DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EXTRACTION AND ASSAY OF HUMAN ERYTHROCYTE ACETYLCHOLINESTERASE AND PESTICIDE INHIBITION	39
5. CONCLUSÃO	60
6. ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

As políticas de crédito agrícola implementadas na década de 70 impulsionaram a utilização e produção de agrotóxicos, alterando o padrão de consumo dessas substâncias ao oferecer subsídios à sua aquisição. Embora a utilização dos agrotóxicos tenha proporcionado o aumento da produtividade agrícola, possibilitando a produção de alimentos a um custo menor, o uso indiscriminado desses produtos pode trazer prejuízos à saúde humana e animal e ao meio ambiente (DOMINGUES et al., 2004).

Os trabalhadores agrícolas estão expostos a grandes riscos de intoxicação, devido ao contato intenso com agrotóxicos. Esses compostos são potencialmente tóxicos aos humanos, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígenos, entre outros efeitos.

Em geral, as conseqüências do uso indiscriminado de agrotóxicos são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

Entre os pesticidas mais utilizados e causadores de intoxicações ocupacionais estão os organofosforados e os carbamatos, pertencentes à classe dos inibidores das enzimas colinesterases (ChEs). Seu mecanismo de ação se dá através da fosforilação do sítio ativo dessas enzimas, no caso dos organofosforados e carbamilação, no caso dos carbamatos, causando a inibição da atividade enzimática (Fukuto, 1990).

As enzimas colinesterases são hidrolases do grupo das serino-esterases, com afinidade por ésteres de colina. Existem dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8). A primeira ocorre no cérebro, gânglios do sistema nervoso autônomo e placas motoras onde sua função é modular os impulsos nervosos na fenda sináptica através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Ela também pode ser encontrada na membrana dos eritrócitos (onde sua função ainda não foi elucidada) sendo sintetizada durante a hematopoiese, com meia-vida de aproximadamente 120 dias. A BChE é sintetizada no fígado e predomina no plasma, células gliais, pâncreas e na parede do trato digestivo, apresentando meia-vida de 7 a 14 dias. É apontada como uma enzima

detoxificadora/ativadora de compostos xenobióticos (CHATONNET E LOCKRIDGE, 1989; ÇOKUGRAS, 2003).

Os organofosforados e carbamatos são absorvidos por via oral, respiratória e cutânea, sendo esta última a causa mais comum de intoxicações ocupacionais. Dependendo da quantidade da substância tóxica absorvida, do tempo de exposição e de outros fatores, à exemplo da idade e das condições de saúde, essa intoxicação pode acarretar danos irreversíveis, como infertilidade (ou problemas relacionados à fertilidade), indução de efeitos teratogênicos e genéticos e câncer conforme revisto por Matos e colaboradores (1988). Também são relatados efeitos deletérios sobre os sistemas nervoso, respiratório, cardiovascular, genito-urinário, gastro-intestinal, pele, olhos, além de alterações hematológicas e reações alérgicas a estas substâncias. Essa condição encontrada no meio rural representa a necessidade do monitoramento e da prevenção da exposição ocupacional.

O monitoramento de pesticidas através de métodos baseados na inibição de colinesterases geralmente requer amostras de sangue frescas, para evitar a hemólise e devido à baixa estabilidade térmica das enzimas mesmo sob resfriamento. Tais técnicas apresentam outras desvantagens, como: 1) a não diferenciação entre as atividades da AChE eritrocitária e da BChE plasmática (a inibição da AChE eritrocitária correlaciona-se melhor com a inibição da AChE no SNC), quando se utiliza a atividade das colinesterases totais; 2) a baixa precisão causada pela interferência da hemoglobina, quando se utiliza somente a atividade da AChE eritrocitária sem a completa lise e lavagem da hemoglobina por centrifugação.

Assim, o trabalho teve por objetivo desenvolver um método para a extração e análise da AChE eritrocitária humana no qual, não apenas fosse utilizada somente a atividade dessa enzima, como também fosse permitido o congelamento de amostras para análises em laboratórios distantes dos locais de coleta e sem interações colorimétricas indesejáveis como ocorre com a hemoglobina. Também foi objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade do método para mensurar a exposição aos pesticidas, comparando os resultados de inibição com os regulamentos nacionais e internacionais vigentes.

2. CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de agrotóxicos e problemas de saúde pública

No Brasil, os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate aos vetores de doenças e controle de parasitas (Fig. 1), passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960. A utilização em larga escala deu-se quando os pesticidas foram incluídos, compulsoriamente, nos financiamentos agrícolas, assim como os adubos e fertilizantes químicos. Em 1975, com o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos (TRAPÉ, 1993), o produtor rural brasileiro passou a ter acesso ao crédito agrícola, decorrente do movimento globalizante conhecido como “*Revolução verde*”, que instituiu a obrigatoriedade do uso de agrotóxicos para todos os financiamentos sob o discurso tecnológico de garantir a produção livre de pragas e como símbolo da “agricultura moderna” mais produtiva (SOBREIRA, 2004). Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou um enorme incremento e disseminação da utilização dos agrotóxicos, conseqüentemente, a indústria de agrotóxicos tem registrado lucros crescentes e os países latino-americanos, principalmente o Brasil, foram se situando entre os maiores consumidores mundiais.

Nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93% enquanto o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Na safra que envolveu o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de venda de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos, sendo 833 mil toneladas produzidas no País, e 246 mil toneladas importadas (ANVISA/UFPR, 2012). Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor. Existe uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas

respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% (ANVISA/UFPR, 2012; CARNEIRO et al., 2012).

Na safra de 2011 no Brasil, foram plantados 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde a cerca de 853 milhões de litros (produtos formulados) de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas, representando média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (CARNEIRO et al., 2012).



Figura 1 – Antigo uso do inseticida organoclorado DDT no combate ao piolho, na década de 1950. Foto do Museu norueguês da infância *Norsk Barnemuseum*, Stavanger, Noruega (WHO, 2008).

O uso de pesticidas é ainda atualmente a principal estratégia na agricultura para o combate e a prevenção de pragas agrícolas. Todavia, em consequência à disseminação de seu uso no mundo atual, principalmente nos países em desenvolvimento, é observado um grande número de ocorrências de intoxicações humanas, quer intoxicações agudas (principalmente ingestão acidental, em crianças, e tentativa de suicídio, em adultos), quer intoxicações crônicas ocupacionais (WHO, 1990; KOH e JEYARATNAM, 1996; KONRADSEN et al., 2003).

No Brasil, que é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, os casos de intoxicação aguda e crônica são pouco registrados (FARIA et al., 2007; CARNEIRO et al., 2012). Apesar disso, o Censo Agropecuário, divulgado no ano de 2009, conseguiu

identificar, pelo menos, 25.008 casos de intoxicação, número que é 300% superior ao das notificações oficiais. Em 2006, ano de início da coleta de dados do Censo, o Sistema Nacional de Informações Tóxico- Farmacológicas (SINITOX), da Fundação Oswaldo Cruz, registrou 6.297 notificações. Em 2007, ano final da coleta de dados, foram 6.260, a maioria ligada ao trabalho. Em 2007, 209 pessoas morreram intoxicadas por agrotóxicos. Os herbicidas, fungicidas e inseticidas foram usados em cerca de 1,4 milhões de estabelecimentos agrícolas - valor 53% superior ao de 1996, quando foi realizado o Censo Agropecuário anterior (O GLOBO, 2009). Portanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos constitui um sério problema de saúde pública, no que diz respeito à saúde das populações, à segurança alimentar e, também, à sustentabilidade ambiental (FLORES et al., 2002; PERES et al., 2003a; MANSOUR, 2004). No nordeste brasileiro, em decorrência das condições sócio-econômicas e ambientais adversas, essa situação é mais grave (AUGUSTO, 2003). Países desenvolvidos têm proibido o uso de alguns grupos químicos de agrotóxicos, pelos efeitos negativos observados sobre a saúde e o meio ambiente (PERES et al, 2003b).

Os agrotóxicos podem ser absorvidos pela pele, por ingestão e inalação. As intoxicações agudas por agrotóxicos têm sido estudadas encontrando-se na literatura como manifestações mais frequentes convulsões, náuseas, vômitos e dificuldade respiratória. Contudo, os efeitos das intoxicações crônicas que surgem após um intervalo de tempo variável podem estar associados a alterações cromossômicas, à teratogênese, infertilidade masculina, carcinogênese, neurotoxicidade, doenças hepáticas, respiratórias, renais e dermatológicas (PERES et al, 2003a). Entretanto, ainda requerem aprofundamentos considerando-se grupos humanos e ecossistemas diversos (FRANCO NETTO, 1998; KOIFMAN et al, 1998; PERES et al, 2003b; MANSOUR, 2004).

2.2 Pesticidas

De acordo com a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89 os agrotóxicos, genericamente denominados de pesticidas, podem ser definidos como: os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da

fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento. O termo “Agrotóxico”, ao invés de “Defensivo Agrícola”, passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos ao meio ambiente e à saúde humana (LARINI, 1999). De acordo com a espécie que se pretende eliminar, esses compostos são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, moluscicidas e outros (ANWAR, 1997). Um parâmetro de classificação, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO/UNEP/ILO/IPCS, 2006), considera o grau de toxicidade exibido por esses compostos e são baseados na toxicidade aguda oral e dérmica verificada em algumas espécies. De acordo com essa classificação os pesticidas podem ser descritos como extremamente tóxicos (classe Ia), altamente tóxicos (classe Ib), moderadamente tóxicos (classe II) e discretamente tóxicos (classe III). Outra forma de classificação seria a classe química desses compostos, sendo os mesmos agrupados por classe química como, por exemplo, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (HE, 1993).

- Organofosforados e carbamatos

Organofosforados (OP) e carbamatos (CB) estão entre as classes de inseticidas mais utilizadas em todo mundo. Até 1987, juntos respondiam por mais de 71% do que era comercializado. Em 1999, essa participação havia caído para 52% e até os últimos relatos de 2008 (com divergências entre autores) estava entre 24,4 e 33% (Tabela 1). Todavia, em 2007, somente os organofosforados responderam por 35% de todos os inseticidas utilizados nos EUA (NAUEN E BRETENSCHNEIDER, 2002; ATSDR, 2005; USEPA, 2011; JESCHKE et al., 2011; UNIVERSITY of YORK, 2013). São largamente utilizados nos países em desenvolvimento, de economia predominantemente agrícola, para o controle de pragas e em campanhas de combate a vetores de doenças (WHO, 1986a; 1989; USDA, 1997). Entretanto, alguns representantes da classe dos organofosforados constituem o princípio ativo de armas químicas como os gases neurotóxicos tabun, sarin, soman e VX (RILEY, 2003; KELLAR, 2006).

Esses pesticidas são inibidores típicos das enzimas colinesterases (ALDRIDGE, 1950; ALDRIDGE e DAVIDSON, 1952; WHO, 1986a; 1986b). Alguns são utilizados

como medicamento no tratamento de doenças como *miastenia gravis*, glaucoma e mal de Alzheimer (FRANCIS et al., 1999; VIEGAS Jr. et al, 2004; CASIDA e QUISTAD, 2005; POPE et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006). Seu mecanismo de ação se dá através da ligação com o sítio ativo da acetilcolinesterase, com fosforilação para organofosforados e carbamilação no caso dos carbamatos, produzindo a inibição da enzima (QUINN, 1987). A inibição por carbamatos é reversível e a regeneração da enzima pode levar de alguns minutos a horas. Já a inibição por organofosforados tende à irreversibilidade se não houver tratamento. Contudo, existe uma taxa de regeneração da enzima, que varia de composto para composto, enquanto a fração restante da enzima sofre o processo chamado de “envelhecimento” e não mais se regenera, podendo resultar em um efeito cumulativo ante exposições seguidas a esses compostos. A diferenciação entre as inibições promovidas por diferentes compostos se dá não apenas pela intensidade de inibição, mas também pela taxa de regeneração (WHO, 1986a; 1986b).

Esses pesticidas tiveram seu uso intensificado depois da proibição de utilização da maioria dos compostos organoclorados (ECOBICHON, 1996; USDA, 2002; MUKHERJEE e GOPAL, 2002), os quais são menos tóxicos, porém com maior bioacumulação no meio ambiente, entrando por isso na lista dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (NUNES e TAJARA, 1998; USDA, 2002; FLORES et al., 2004).

Tabela 1 – Classes de inseticidas mais vendidos no mundo e sua participação no mercado mundial (Nauen e Bretschneider, 2002; Jeschke et al., 2011^a; University of York, 2013^b).

Classe	1999 %	2008 %	Mudança %
Organofosforados	43	13,6 ^a a 22 ^b	- 23 a - 29,4
Carbamatos	16	10,8 ^a a 11 ^b	- 5,2 a 5
Piretróides	18	16 ^{a,b}	- 2
Neonicotinóides	12	15 ^b a 24 ^a	+ 3 a + 12
Organoclorados	8,3	< 3 ^b	≈ - 5,3

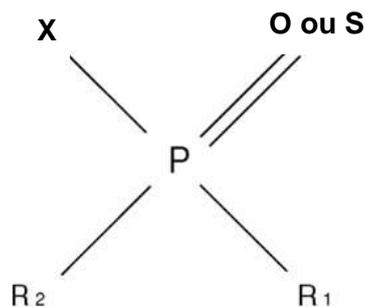


Figura 2 – Fórmula estrutural geral dos organofosforados.

Os OPs são ésteres, amidas ou derivados tióis dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico ou fosfonotióico (Fig. 2). Apresentam baixa solubilidade em água e são, em geral, facilmente hidrolizáveis em ambientes alcalinos. Na figura 2, R1 e R2 são usualmente radicais alquil ou aril e ambos podem estar ligados diretamente ao fósforo (nos fosfinatos) ou ligados via O- ou S- (nos fosfatos) ou ainda R1 pode estar ligado diretamente e R2 ligado por meio de um dos grupos acima (fosfonatos). Nos fosforamidatos, o carbono está ligado ao fósforo através de um grupamento –NH. O grupo X pode ser qualquer grupamento alifático (ramificado ou não), aromático ou heterocíclico ligado ao fósforo de forma lábil (através de O- ou S-substituição) sendo o grupo de partida. Em relação ao átomo em ligação dupla com o fósforo, os OPs dividem-se em dois grupos: os fosfatos (forma oxon; P=O) e os fosforotioatos (forma tion; P=S) (VALE, 1998). Os primeiros são mais tóxicos devido à maior eletronegatividade do oxigênio em relação ao enxofre ao interagir com o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, seu alvo primário nos organismos. O segundo grupo é menos reativo, porém sua meia-vida no ambiente é mais longa proporcionando maior poder residual ao inseticida. Por essa razão, a maior parte dos OPs é comercializada na forma tion (WHO, 1986a; FUKUTO, 1990; VALE, 1998). Além disso, os OPs apresentam outras duas características que acentuam ou atenuam sua ação tóxica: 1) radicais ligados ao átomo de fósforo e 2) lipofilicidade da molécula. Na primeira, R1 e R2 podem ser uma dupla de radicais metila, etila ou ainda isopropila, segundo sejam dimetil, dietil ou diisopropil-OPs, respectivamente (Tabela 2). Os diisopropil-OPs são os mais tóxicos devido à maior interação com os resíduos do sítio ativo da enzima dada a sua maior ramificação (SHAFFERMAN et al., 1996; VALE, 1998; PAUDYAL, 2008). Na segunda característica, os OPs classificados como fosfatos são os menos lipofílicos ao

passo que os fosforotioatos são os mais lipofílicos. Na tabela 3, são apresentados alguns exemplos de maior e menor lipofilicidade.

Tabela 2 - Exemplos de inseticidas organofosforados de acordo com os grupamentos éster ligados ao átomo de fósforo (Paudyal, 2008; Assis et al., 2011).

Dimetil-OP	Dietil-OP	Diisopropil-OP
diclorvós	diazinon	diisopropil fluorofosfato (DFP)
temefós	clorpirifós	diisopropil metilfosfonato (DIMP)
metil-paration	tetraetil pirofosfato (TEPP)	
malation	paration	
fention	cumafós	
dimetoato	sulfotepp	
metamidofós	etion	

Tabela 3 - Exemplos de inseticidas organofosforados de acordo com a lipofilicidade (Assis et al., 2011).

Mais lipofílicos	Menos lipofílicos
clorpirifós, diazinon, temefós, malation, paration, metil-paration, fention, cumafós, dimetoato, etion, sulfotepp	tetraetil pirofosfato (TEPP), triclorfon, diclorvós, metamidofós, fenamifós, fosfamidon, monocrotofós

Em geral, os OPs necessitam de biotransformação (dessulfuração por ação de isoformas do complexo citocromo P450, N-oxidação, S-oxidação e enzimas monoxigenases que contém flavina, além de fatores físicos como luz, pH e temperatura) para se tornarem toxicologicamente ativos, passando da forma tion para a forma oxon (DAUTERMAN, 1971; WHO, 1986a). Tais biotransformações não ocorrem apenas no fígado (Figs. 3), mas também nos rins, pulmões e cérebro (MESNIL et al., 1984; CUNHA BASTOS et al., 1999; SARASQUETE e SEGNER, 2000; KAPPERS et al., 2001; MONSERRAT, 2007). Além disso, algumas isoformas presentes no complexo P450 não apenas bioativam os OPs, mas também detoxificam esses pesticidas juntamente com as enzimas oxonases (também conhecidos por fosfotriesterases; EC 3.1.1.2) e são responsáveis pelos metabólitos excretados na urina, como o dietilfosfato, pirimidinol, tricloropiridinol e derivados que aparecem nas Figuras 3 e 4 (LI et al., 1993; LI et al., 1995; KAPPERS et al., 2001; WESSELS et al., 2003; MANTHRIPRAGADA et al., 2010).

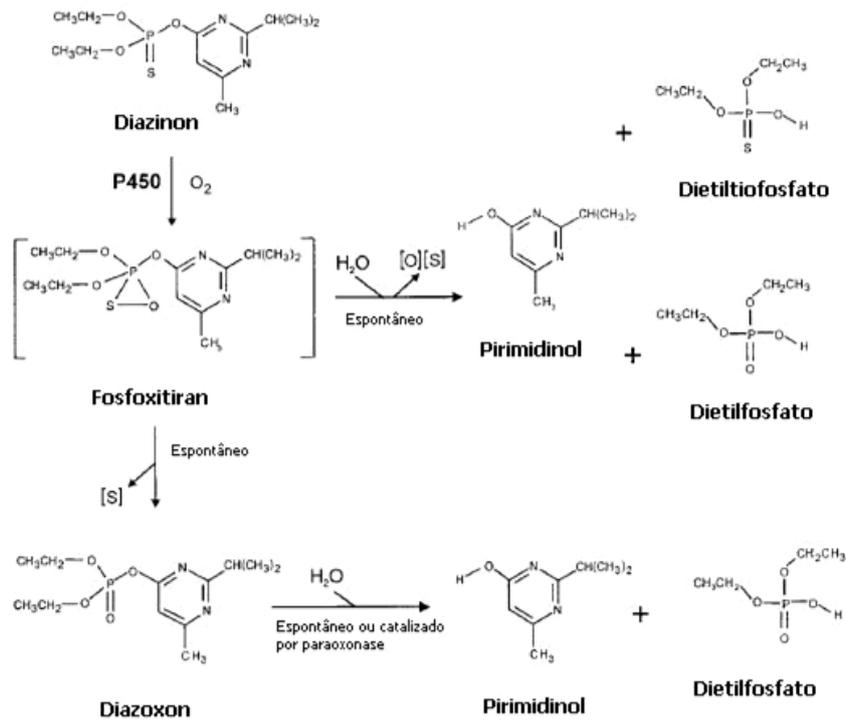


Figura 3 – Metabolismo e ativação do OP diazinon em fígado humano adaptado de Kappers et al. (2001)

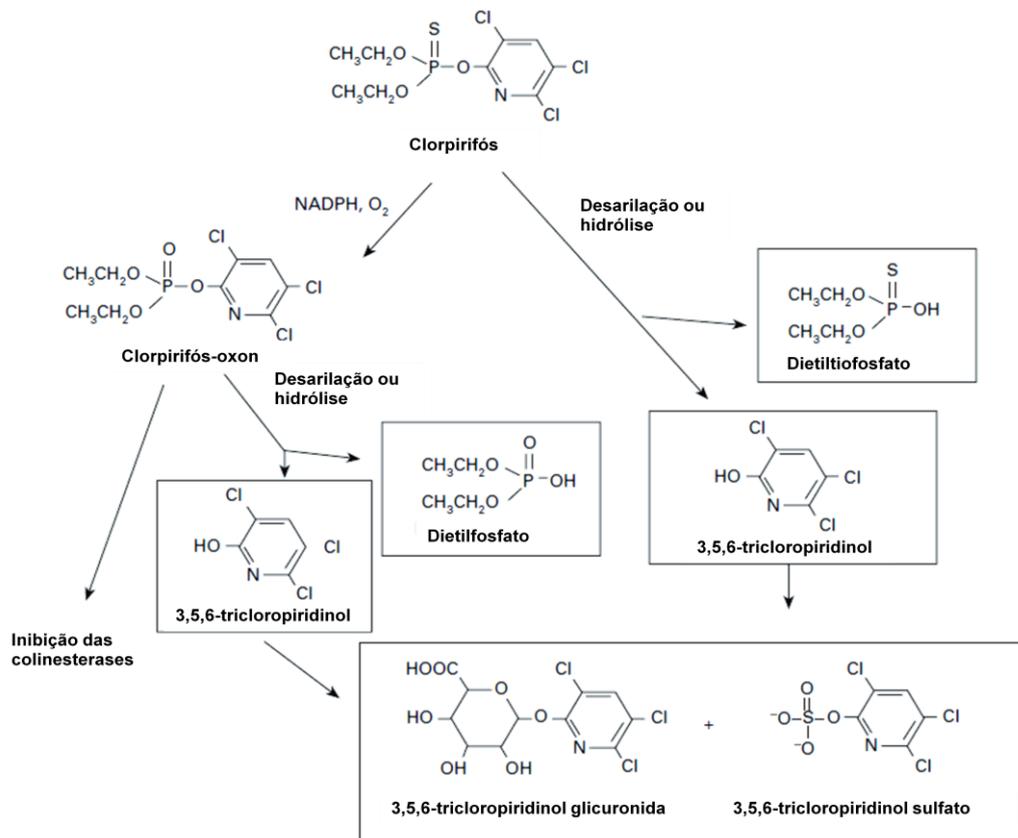


Figura 4 – Metabolismo e ativação do OP clorpirifós em fígado humano adaptado de Wessels et al. (2003).

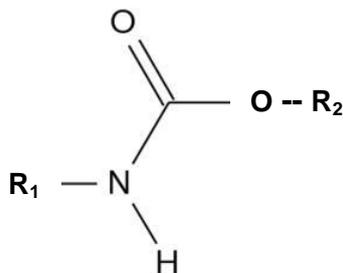


Figura 5 – Fórmula estrutural geral dos carbamatos.

Os carbamatos são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico. Na figura 5, R2 pode conter radicais alquil ou aril. Os carbamatos inseticidas possuem um grupamento metil em R1 enquanto os herbicidas possuem um radical aromático. Já os CBs fungicidas contêm um grupamento benzimidazol em R1. Dentre esses, apenas os CBs inseticidas apresentam atividade anticolinesterásica (WHO, 1986b). Os CBs são inseticidas efetivos em virtude de inibirem a acetilcolinesterase no sistema nervoso, sem necessitar de biotransformação. O motivo que torna os CBs menos perigosos que os OPs é o fato de que a diferença entre a dose requerida para produzir efeitos mínimos e a dose letal é substancialmente maior nos CBs. Os CBs são instáveis e prontamente hidrolisáveis em ambiente alcalino, assim como os OPs, porém são mais solúveis em água (WHO, 1986b).

Os organofosforados e carbamatos são absorvidos pelo organismo por via oral, respiratória e cutânea levando a um conjunto de sintomas característicos (Tabela 4). A via oral é a maior causa de internações hospitalares de emergência e a cutânea, a causa mais comum nas intoxicações ocupacionais (UFF/CCIn, 2000).

Diversos pesticidas organofosforados e alguns carbamatos, incluindo alguns de seus metabólitos, são capazes de provocar malformações congênitas, afetar a fertilidade e produzir efeitos genéticos tóxicos, inclusive câncer (WHO, 1986a; 1986b). Casos de câncer foram evidenciados em 1992, em adultos jovens indígenas na Amazônia. Nestes jovens foram encontrados níveis elevados de organofosforados no sangue (MATOS et al., 1988; KOIFMAN et al., 1998). Os efeitos teratogênicos dos agrotóxicos podem resultar da exposição intra-uterina do indivíduo em formação e mediante a ação mutagênica nos gametas dos progenitores nas primeiras etapas da gestação. Das malformações congênitas de fácil diagnóstico clínico, as que se destacaram pela influência de agrotóxicos em estudo realizado no Chile foram a síndrome de down, espinha bífida e hidrocefalia (ROJAS et al., 2000).

Tabela 4 - Sinais e sintomas das intoxicações por inseticidas organofosforados (Larini, 1999)

Local	Sinais e sintomas
Sistema Nervoso Central	Distúrbios do sono, dificuldades de concentração, comprometimento da memória, ansiedade, agitação, convulsões, tremores, depressão respiratória, coma.
Sistema Nervoso Autônomo (efeitos muscarínicos)	No aparelho digestivo: perda de apetite, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, defecação involuntária. No aparelho respiratório: secreção bronquiolar, edema pulmonar. No sistema circulatório: bradicardia, bloqueio aurículo-ventricular. No sistema ocular: visão enfraquecida, pupilas puntiformes. No aparelho urinário: diurese freqüente e involuntária. Glândulas exócrinas: transpiração excessiva.
Sistema somático (efeitos nicotínicos)	Contração involuntária dos músculos, câibras, enfraquecimento muscular generalizado.

Com relação aos alvos principais dos organofosforados, três síndromes são descritas na literatura. Para os carbamatos em geral, apenas a primeira é descrita (WHO, 1986b). Todavia, a terceira síndrome já foi descrita para os carbamatos carbaril e carbofuran (UFF/CCIn, 2000):

a) Síndrome colinérgica aguda

Sintomatologia múltipla, efeito da superestimulação colinérgica

- fibras nervosas pós-ganglionares parassimpáticas (muscarínicos)
- fibras pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas (nicotínicos I)
- nervos motores somáticos (nicotínicos II)
- receptores de acetilcolina

b) Síndrome intermediária

Efeito da hiperestimulação de longo período – 24 a 96 h após a síndrome aguda

- diminuição da força dos músculos proximais

c) Síndrome da neuropatia tardia

Atinge a NTE, ‘esterase-alvo’, antiga ‘esterase neurotóxica’ causando degeneração dos neurônios do sistema nervoso central - 4 semanas após exposição.

2.3 Enzimas colinesterases

As colinesterases (ChEs) são enzimas hidrolases pertencentes ao grupo das serino-esterases, com especificidade por ésteres de colina, mas são de uma família que difere das serino-proteases, apresentando mais identidade com outras esterases como as carboxilesterases, esterase microssomal de coelhos, esterase-6 da *Drosophyla* e proteínas com propriedades de adesão, entre outras propriedades, que provavelmente perderam a função catalítica ao longo da evolução como as neuroliginas, neurotactinas, gliotactinas e tiroglobulina (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; PEZZEMENTI e CHATONNET, 2010). As ChEs são classificadas como proteínas globulares (G) ou assimétricas (A) (Fig. 6). As formas globulares apresentam-se como monômeros, dímeros e tetrâmeros (G1, G2 e G4, respectivamente) que podem estar solúveis (formas hidrofílicas) no plasma, linfa e outros tecidos aos quais chegam através da circulação. Podem estar também ancoradas à membrana celular (formas anfifílicas) por meio de glicofosfolípídeos, lipídeos ou proteína transmembranar de ancoragem rica em prolina (PRiMA) no coração, eritrócitos e linfócitos, no fígado e órgão elétrico de arraias do gênero *Torpedo* ou às membranas dos neurônios nas sinapses cerebrais (no caso da PRiMA) (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; TAYLOR, 1991; ZHANG e McCAMMON, 2005). As formas assimétricas são associadas a uma cauda de colágeno Q (ColQ) podendo conter 1, 2 ou 3 tetrâmeros (A4, A8 e A12, respectivamente) em sua extremidade. Fixam-se à lâmina basal por meio de dois domínios de ligação à heparina que interagem com o heparan sulfato presente nas junções neuro-musculares. São encontradas também no órgão elétrico de peixes *Gymnotidae*, como o poraquê (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; DEPRez et al., 2000).

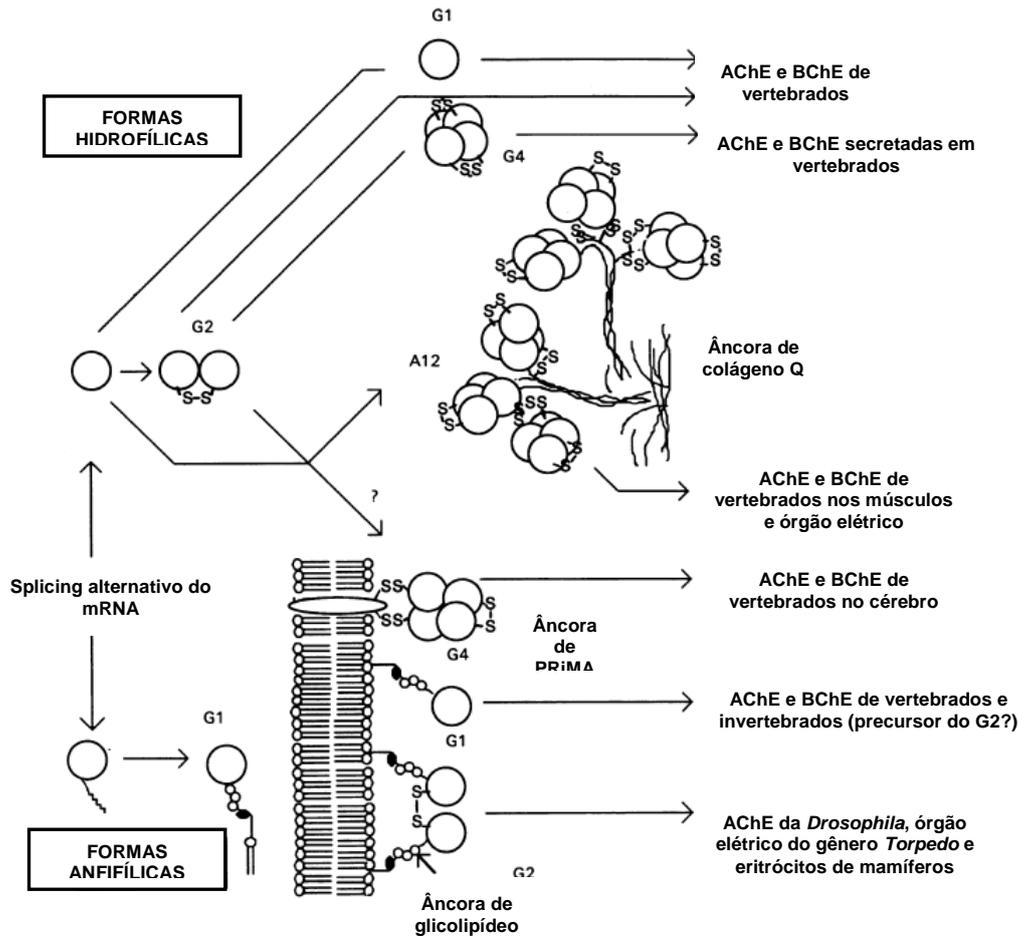


Figura 6 – Formas das colinesterases encontradas em vertebrados. Splicing alternativo do RNA mensageiro pode originar isoformas hidrofílicas e anfifílicas da enzima (adaptado de Chatonnet e Lockridge, 1989).

Existe ainda uma forma monomérica (G1) associada à albumina (similarmente ao que ocorre com a paraoxonase associada à HDL), fazendo com que alguns trabalhos atribuíssem atividade esterásica à albumina (FURLONG et al., 1988; LI et al., 2005; SALLES et al., 2006; MASSON e ROCHU, 2009). As ChEs são consideradas enzimas alostéricas, possuindo além do sítio ativo (o sítio catalítico propriamente dito), vários sítios periféricos que influem em sua conformação e atividade (ROUFOGALIS e QUIST, 1972; TOMLINSON et al., 1980; OLSON et al., 1990; RADIC et al., 1995; JOHNSON e MOORE, 2006).

Atualmente, são aceitos dois tipos de colinesterases, a acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira (AChE; EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica (BChE; EC 3.1.1.8). A primeira, sintetizada no tecido nervoso e durante a eritropoiese, é encontrada nas fibras pré-ganglionares do SNA, fibras parassimpáticas pós-ganglionares e parte das fibras

simpáticas pós-ganglionares e das sinapses interneurais do SNC, além do músculo esquelético e membrana dos eritrócitos, linfócitos e plaquetas, hidrolisa preferencialmente acetilcolina, enquanto a segunda é sintetizada pelo tecido hepático, continuamente exportada para a corrente sanguínea e, além de estar presente no fígado e plasma, é encontrada também no músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, coração e *substantia alba* do cérebro. Hidrolisa butirilcolina com mais eficiência do que acetilcolina (WESCOE et al., 1947; ROSENBERRY, 1975; MASSOULIÉ et al., 1993; UFF/CCin, 2000; COUSIN et al., 2005; AL-JAFARI, 2011; MARTINS et al., 2012).

A principal e clássica função da AChE é a modulação dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação neuronal através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, enquanto que as prováveis funções da BChE são a detoxificação (succinildicolina, pesticidas organofosforados e carbamatos, cocaína, aspirina, benactizina e drofenina) e a bioativação (bambuterol, heroína, irinotecan) de compostos exógenos (QUINN, 1987; CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; TÕUGU, 2001; ÇOKUGRAS, 2003). Eventualmente, a BChE pode substituir a AChE na hidrólise da acetilcolina, conforme foi observado em camundongos nulzigotos para AChE os quais apresentaram atividade BChE nas sinapses colinérgicas no cérebro e que não houve danos estruturais ao sistema nervoso (MESULAM et al., 2002).

Evidências também apontam para um possível papel dessas enzimas em atividades não colinérgicas, como no crescimento e diferenciação neuronal, modulação da adesão celular e tumorigênese, abertura do canal de potássio na *substantia nigra*, as quais são funcionalidades não dependentes da atividade catalítica normal, porém dependentes do sítio aniônico periférico da enzima e de um resíduo de 14 peptídeos próximos de sua extremidade C-terminal (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; TAYLOR, 1991; WEBB e GREENFIELD, 1992; STERNFELD et al., 1998; BIGBEE et al., 1999; BRIMIJOIN e KOENIGSBERGER, 1999; JOHNSON e MOORE, 2000; EMMET e GREENFIELD, 2004; BRIMIJOIN, 2005; SILMAN e SUSSMAN, 2005).

As ChEs são também glicoproteínas apresentando, em algumas formas, carboidratos em cerca de 10 a 15% de sua estrutura, os quais podem diferir quanto ao tipo e quantidade nos diferentes tecidos. A ausência de tais cadeias, induzida por mutação, afetou fortemente a secreção da enzima e um dos mutantes teve sua termoestabilidade prejudicada, mas a atividade esterásica das moléculas secretadas e as propriedades do sítio aniônico periférico não foram alteradas (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; MASSOULIÉ et al., 1993; VELAN et al., 1993).

- Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (Fig. 7) age na desativação do principal neurotransmissor do sistema nervoso, na maioria das espécies: a acetilcolina. A AChE hidrolisa rapidamente esse neurotransmissor, nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares, encerrando sua ação e garantindo a intermitência dos impulsos nervosos (Fig. 8) (QUINN, 1987; FUKUTO, 1990; TÕUGU, 2001; SILMAN e SUSSMAN, 2005). A AChE é freqüentemente descrita como uma ‘enzima perfeita’ porque suas propriedades catalíticas se combinam para aproximar sua atividade do limite máximo de velocidade permitido pela própria difusão do substrato (QUINN, 1987; TÕUGU, 2001; MILLER e WOLFENDEN, 2002; SILMAN e SUSSMAN, 2005; RAMOS e TECHERT, 2005).

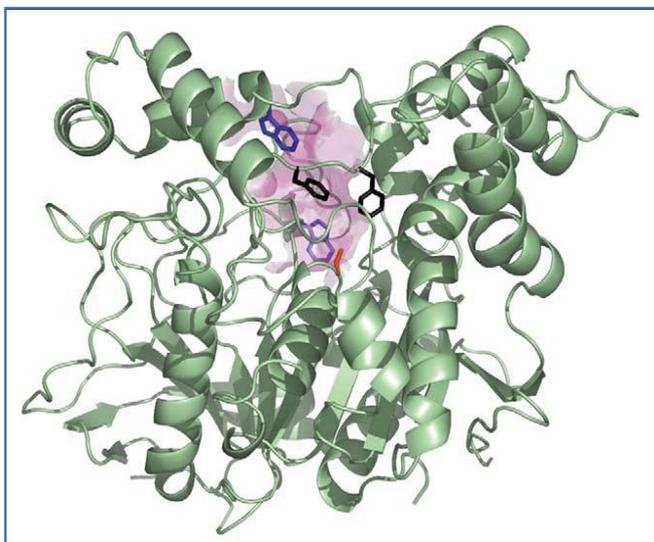
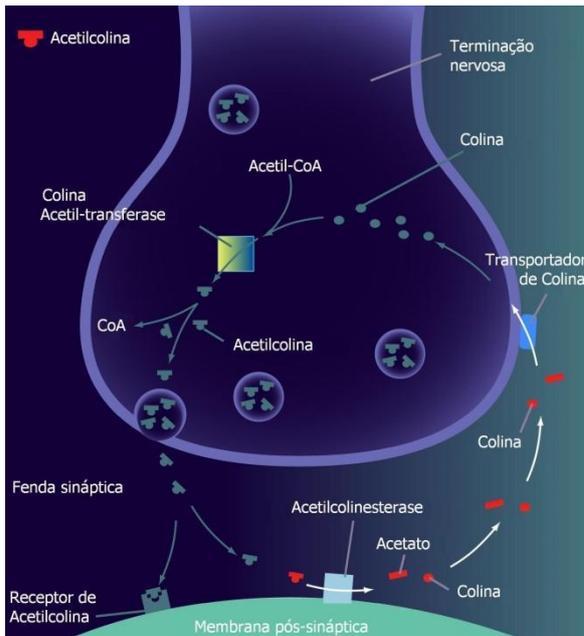


Figura 7 – Estrutura tridimensional da AChE da arraia elétrica *Torpedo californica*. A estrutura é apresentada como um diagrama de fitas, com o N-terminal abaixo à esquerda e o C-terminal acima à direita. A entrada da cavidade do sítio ativo situa-se no topo e a superfície da cavidade é delineada em rosa. Triptofano 84, o resíduo-chave no sub-sítio aniônico do sítio ativo, está representado em roxo enquanto o triptofano 279, o resíduo-chave do sítio aniônico periférico está, em azul, na entrada da cavidade. O resíduo-chave do sub-sítio esterásico do sítio ativo, serina 200, é mostrado em vermelho enquanto os resíduos fenilalanina 288 e fenilalanina 290, que delineam a bolsa acil, são mostrados em preto (Silman e Sussman, 2005).



Adaptado de: CNSforum.com

Figura 8 – Desenho esquemático do ciclo da acetilcolina onde é possível observar o papel da acetilcolinesterase desativando o excesso desse neurotransmissor. Colina e acetato são liberados na fenda sináptica e a colina é reabsorvida pelo neurônio, onde a acetilcolina é ressintetizada pela ação da enzima Colina acetil-transferase. O acetato atravessa a barreira hemato-encefálica e é metabolizado em outros tecidos.

A acetilcolinesterase contém dois sub-sítios catalíticos: o sub-sítio esterásico e o sub-sítio aniônico. O sub-sítio esterásico da acetilcolinesterase situa-se no fundo de uma cavidade estreita (*active site gorge*) e é constituído de uma tríade catalítica formada pelos resíduos dos aminoácidos serina 200, histidina 440 e glutamato 327 (podendo variar ligeiramente essas posições, interespecificamente). Na catálise (representada nas Figs. 9 e 10), o sub-sítio aniônico (também chamado de sítio de ligação à colina), situado mais próximo à entrada do sítio ativo, atrai fortemente o nitrogênio quaternário, carregado positivamente, da acetilcolina. Uma vez dentro da cavidade catalítica, a acetilcolina sofre o ataque nucleofílico da serina (na figura 9, representada por O), desprotonada pelo resíduo histidina (representado por B), ao seu carbono carbonílico, criando um intermediário tetraédrico estabilizado por pontes de hidrogênio e pelo resíduo glutamato (representado por A), que num primeiro momento, forma serina acetilada e libera colina. Ao final do processo de clivagem da ligação éster, o grupo acetila é desligado pelo ataque nucleofílico da água, assistido pelo resíduo histidina, com formação de um segundo intermediário tetraédrico liberando ácido acético e regenerando o sítio catalítico (FUKUTO, 1990; TAYLOR et al., 1995; TÕUGU, 2001; VIEGAS Jr et al., 2004).

Na reação inicial mencionada acima, a ocorrência de pontes de hidrogênio entre o grupo carboxilato do glutamato e o N-1 do imidazol da histidina aumentam a habilidade do N-3 da histidina de atuar como uma base e extrair o H^+ do grupo hidroxila da serina.

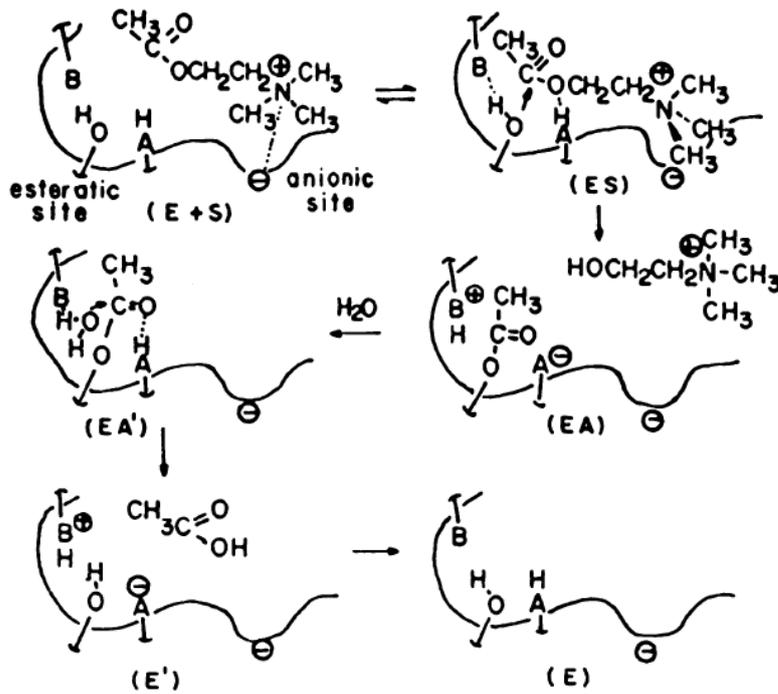


Figura 9 – Desenho esquemático da hidrólise da acetilcolina, catalizada pela AChE, na qual observa-se a ação dos sítios aniônico (atração e posicionamento do substrato) e esterásico (quebra da ligação éster) (fonte: Fukuto, 1990).

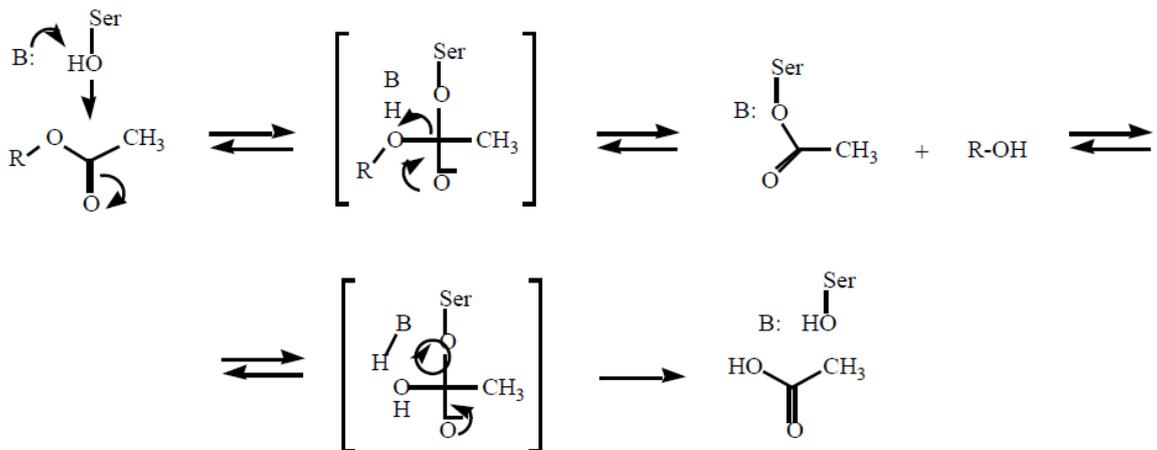


Figura 10 - Hidrólise de ésteres pela AChE. Acima, observa-se a acilação do sítio ativo da enzima e abaixo a desacilação. O esquema inicia-se com a formação do complexo enzima-substrato reversível e os intermediários tetraédricos similares ao estado de transição são mostrados entre colchetes (Fonte: Tōugu, 2001).

Esta cooperação torna o oxigênio da serina um nucleófilo forte, que ataca facilmente o carbono da carbonila da acetilcolina (TAYLOR e BROWN, 1994). Tudo isso ocorre num intervalo de tempo entre 62,5 a 138 microsegundos (AUGUSTINSSON, 1971; FUXREITER e WARSHEL, 1998).

Tentativas de explicar tal eficiência passaram por diversas teorias, desde a entrada alternativa para o sítio ativo (*putative back-door*), passando pela orientação eletrostática

dos resíduos aromáticos (cerca de 14) que margeiam a cavidade do sítio e seu estado de dessolvatação com dipolos pré-orientados, até uma possível mobilidade da histidina da tríade catalítica (QUINN, 1987; WARSHEL, 1998; MILLARD et al., 1999; TÕUGU, 2001). Tais características fariam com que o substrato se ligasse a uma área superficial da enzima e fosse guiado rapidamente ao interior do sítio ativo, onde a energia das próprias interações contribuíssem para se atingir o estado de transição, sendo a velocidade do processo limitada pelos efeitos da viscosidade do meio (QUINN, 1987). Além disso, Ramos e Techert (2005) observaram que uma menor quantidade de pontes de hidrogênio presentes no meio favoreciam o encontro entre enzima e substrato através da diminuição da concha de solvatação, aumentando a difusão do substrato por um aumento da mobilidade intramolecular da AChE.

A AChE apresenta inibição por excesso de substrato, através da ligação do mesmo a um sítio periférico formado por resíduos de aminoácidos que margeiam a entrada do sítio ativo central (MASSOULIÉ e BONN, 1982; EASTMAN et al., 1995).

- Acetilcolinesterase eritrocitária

Trata-se de um dímero formado por subunidades catalíticas de AChE ancoradas à membrana eritrocitária através do glicofosfolípídeo fosfatidil-inositol (Fig. 11) e de massa molecular aproximada de 140 a 160 kDa. Foi estimado que cada eritrócito possua de 700 a 800 dímeros (SIHOTANG, 1974; LAWSON e BARR, 1987; CHHAJLANI et al., 1989; RAO et al., 1993). Sua função nos eritrócitos ainda não foi elucidada, mas suspeita-se de que poderia participar de interações célula-célula uma vez que, sendo uma glicoproteína, transporta não apenas antígenos derivados de aminoácidos, mas também de carboidratos, apresentando seletividade a lectinas (BON et al., 1987; TAYLOR, 1991). Descobriu-se que a AChE eritrocitária é o antígeno Yt do grupo sanguíneo Cartwright e que sua expressão está vinculada à expressão da hemoglobina (GARRÈ et al., 1982; RAO et al., 1993; BARTELS et al., 1993).

A AChE eritrocitária apresenta alto grau de homologia com a AChE das junções neuromusculares e constitui-se na forma predominante encontrada no sangue humano. Os humanos e demais primatas apresentam os maiores níveis de atividade enzimática

eritrocitária em comparação com os demais mamíferos, os quais possuem mais AChE no plasma, leucócitos e plaquetas do que nos eritrócitos (FAMBROUGH et al., 1982; LAWSON e BARR, 1987; WOREK et al., 1999; WOREK et al., 2005; THIERMANN et al., 2007; HAJJAWI, 2012).

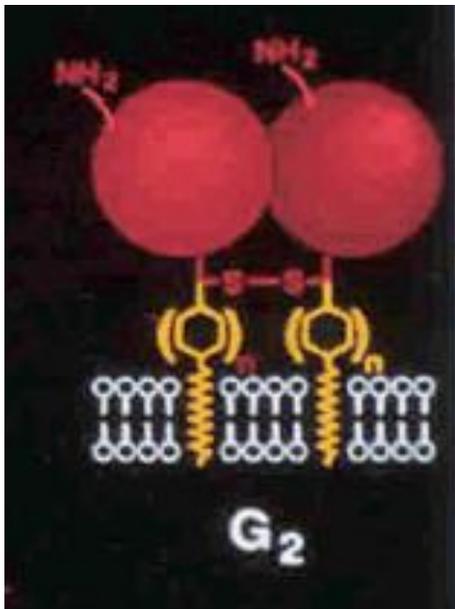


Figura 11 – Representação da AChE eritrocitária na qual observa-se o dímero unido por pontes dissulfeto e ligado à membrana eritrocitária através de âncoras de fosfatidil-inositol (fonte: Taylor, 1991).

2.4 Interação entre a AChE e os pesticidas

A interação entre a acetilcolinesterase e seus inibidores envolve principalmente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável (WIENER e HOFFMAN, 2004; ATSDR, 2007). A estabilidade do complexo formado está relacionada fundamentalmente com a estrutura química do composto organofosforado causando maior ou menor inibição da atividade enzimática. Essa inibição é uma reação específica, considerada o principal efeito da exposição aos pesticidas organofosforados (TAYLOR et al., 1995) e carbamatos (METCALF, 1971; MACHEMER e PICKEL, 1994). A ausência do mecanismo de atuação normal da enzima resulta no acúmulo do neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central, nas junções neuromusculares, nas terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas. Alta concentração de acetilcolina é então liberada aos seus receptores (TÕUGU, 2001).

No caso dos OPs, a tríade catalítica da AChE situa-se próximo à base de uma cavidade estreita e profunda que alcança o centro da estrutura globular da proteína. Apesar da formação da fosforil-enzima inativa ocorrer a partir da ligação com o resíduo serina, há o envolvimento (não em todos os casos) das porções imidazólica e ácida dos

resíduos histidina e glutamato, respectivamente, assim como na catálise normal (Figs. 12 e 13). O alinhamento aromático nas paredes da cavidade direciona o inibidor e serve como mecanismo guia para posicionar o átomo de fósforo (CASIDA e QUISTAD, 2004). Uma vez bloqueada pelo pesticida, a enzima pode hidrolisá-lo em processo lento de reativação espontânea. Porém, ela sofre mais frequentemente o processo de “aging” ou envelhecimento no qual a ligação entre a enzima e o pesticida torna-se covalente devido à perda de um radical alquila que atraía os elétrons compartilhados com o átomo de fósforo (Fig. 14 e 15), tornando a inibição irreversível (ATSDR, 2007).

O tempo de reativação espontânea da enzima fosforilada varia de 42 minutos para dimetil-OPs a 31 horas para dietil-OPs enquanto o tempo a partir do qual inicia-se o fenômeno de “aging” varia de 3 horas e 42 minutos para dimetil-OPs a 33 horas para dietil-OPs. Já Os complexos enzima-di-isopropil-OPs apresentam uma meia-vida não mensurável e suspeita-se de que sofram “aging” poucos minutos após o contato (WOREK et al., 1999; FAO, 2007; PAUDYAL, 2008; ASSIS et al., 2011).

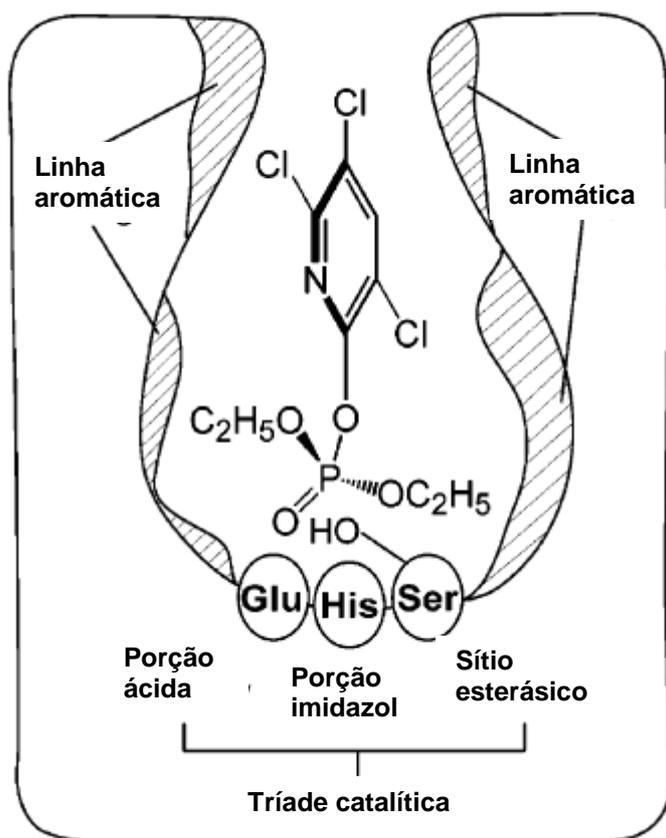


Figura 12 – Representação esquemática da interação entre o inibidor (clorpirifós-oxon) e o sítio ativo da AChE. A tríade catalítica situa-se próximo à base de uma cavidade estreita e profunda que alcança o centro da estrutura globular da proteína. O alinhamento aromático nas paredes da cavidade direciona a molécula servindo como mecanismo-guia para posicionar o inibidor. Adaptado de Casida e Quistad (2004).

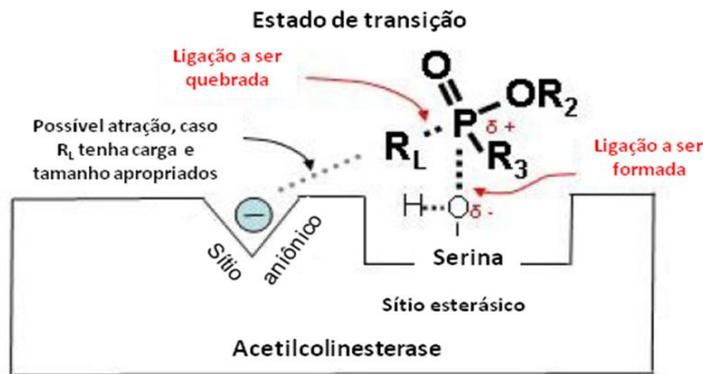


Figura 13 – Estado de transição na interação entre enzima e organofosforado. No detalhe, as ligações envolvidas. Adaptado de ATSDR (2007).

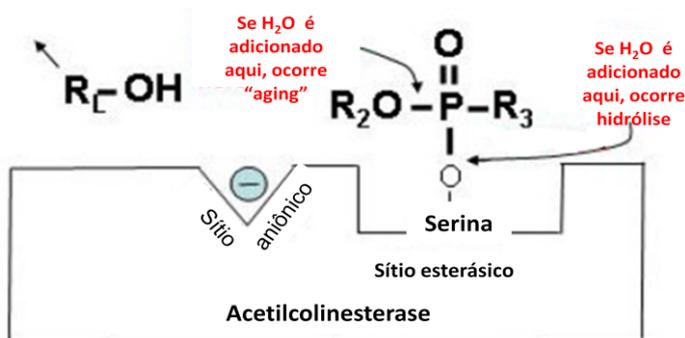


Figura 14 – Representação esquemática entre as duas possibilidades de ocorrência durante a duração do complexo enzima-OP: reativação espontânea ou aging. Adaptado de ATSDR (2007).

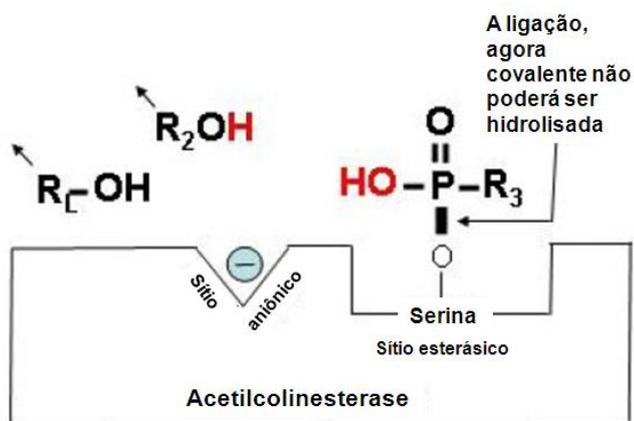


Figura 15 – Antes de sofrer "aging", R_2 estava atraindo os elétrons do "P". Após a remoção de R_2 , esses elétrons são compartilhados com "O"-Serina, fortalecendo a ligação, que não pode ser hidrolisada nem mesmo com a presença de oximas (ATSDR, 2007).

A inibição por OPs gera quadros de intoxicação aguda ou crônica, dependendo do grau de exposição à substância. Um indivíduo agudamente intoxicado por qualquer inibidor de acetilcolinesterase pode morrer, pela superestimulação de seu sistema nervoso, convulsões e parada respiratória (TÕUGU, 2001). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2007), uma inibição da atividade da AChE a partir de 20% caracteriza a ação de agentes anti-colinesterásicos, porém sinais clínicos geralmente aparecem após 50% de inibição e morte após 90%.

O tratamento mais freqüente de intoxicações por agentes anticolinesterásicos, sobretudo os organofosforados, é feito através do uso do alcalóide atropina em combinação com oximas (Fig. 16). O primeiro bloqueia os receptores muscarínicos, impedindo que os mesmos sejam superestimulados pelo excesso de acetilcolina na fenda sináptica e a segunda, aplicada o mais cedo possível, reativa as enzimas fosforiladas por ter maior afinidade com as moléculas do pesticida, impedindo a irreversibilidade da inibição (KELLAR, 2006; ATSDR, 2007).

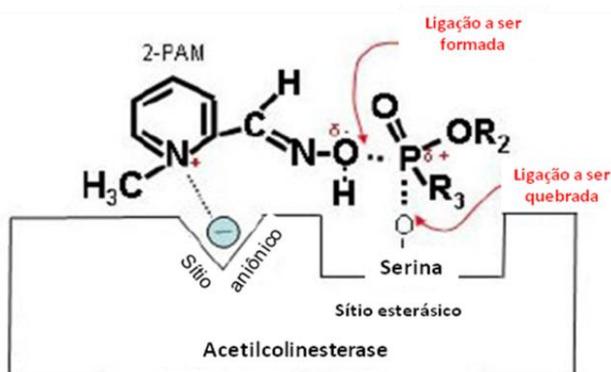


Figura 16 – Ação de uma oxima sobre a ligação fosfoéster entre a enzima e o organofosforado. Adaptado de ATSDR (2007).

Já a ligação dos CBs com a AChE é instável e a regeneração da enzima carbamilada é relativamente rápida em relação à da enzima fosforilada pelos OPs uma vez que os carbamatos interagem mais com o sub-sítio aniônico, assemelhando-se ao estado de transição do complexo enzima-substrato e aumentando a possibilidade de hidrólise (METCALF, 1971). A reativação espontânea das colinesterases carbamiladas, expressas como meia-vida a pH 7,0 e 25 °C variou entre 2 minutos e 4 horas para a AChE e entre 2 e 17 min para a BChE plasmática, mas esse período até a reativação pode ser bem maior para alguns compostos. Tal instabilidade da enzima carbamilada pode afetar a determinação do poder inibitório de alguns carbamatos (REINER, 1971; UFF/CCIn, 2000).

Alguns trabalhos consideram contra-indicado o uso de oximas na reativação de colinesterases inibidas por carbamatos, porém em publicação do governo americano tal noção é considerada equivocada, uma vez que as oximas só não contribuiriam para a regeneração das enzimas inibidas por um único carbamato: o carbaril (ATSDR, 2007).

A ação anticolinesterásica dos compostos OPs e CBs não está restrita à AChE do tecido nervoso central e periférico, ocorrendo de forma paralela a inibição da BChE plasmática, da AChE eritrocitária (MUTCH et al., 1992).

2.5 Monitoramento da exposição ocupacional

Os programas de monitoramento para avaliação de riscos ocupacionais de exposição a agentes anticolinesterásicos podem seguir duas vertentes: o monitoramento ambiental e o monitoramento biológico. O primeiro utiliza-se da detecção, da quantificação e, em alguns casos, da identificação do agente tóxico em amostras ambientais como água, ar, solo, poeira, etc, ou simplesmente por avaliação dos danos ambientais causados pelo próprio composto químico. O segundo pode detectar, quantificar e identificar o agente tóxico ou seus metabólitos em amostras biológicas de sangue, urina, fezes, etc. ou ainda avaliam as alterações fisiológicas induzidas por esses compostos no organismo, como é o caso da redução da atividade colinesterásica do sangue. Neste caso em particular, considerada como indicador biológico de efeito nos casos de exposições por pesticidas OPs e CBs (LEWALTER e KORALLUS, 1986).

Pelo fato do uso de agrotóxicos na agricultura ser intensivo e multiquímico e por várias pesquisas demonstrarem as intoxicações por agrotóxicos como um grave problema de saúde pública, o monitoramento ocupacional por meio de exames laboratoriais é de suma importância para evitar complicações futuras e para o tratamento adequado (FARIA et al., 2004). O monitoramento tem se mostrado a forma mais eficiente em prevenir e diagnosticar precocemente os episódios de intoxicação causados por agrotóxicos, em particular os provocados por compostos anticolinesterásicos. A forma de diagnóstico mais difundida e barata consiste na determinação da atividade colinesterásica (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; SOARES et al., 2003).

- AChE eritrocitária no monitoramento da exposição ocupacional

O monitoramento de pesticidas baseado na inibição das ChEs do sangue recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1967 e 1984) necessita de amostras frescas de ChEs totais do sangue utilizando os métodos de Edson (1958), Ellman e colaboradores (1961) (adaptado por WHO, 1984) ou AChE eritrocitária segundo George e Abernethy (1983). As desvantagens desses métodos são: a) não discriminar a atividade de ambas as ChEs no caso dos que usam ChEs totais; e b) a

menor precisão devido a interferência da hemoglobina para aqueles métodos que utilizam AChE eritrocitária sem completa lise e centrifugação. O método de extração proposto por Oliveira-Silva e colaboradores (2000) e utilizado no presente trabalho, com algumas modificações, não apenas utiliza unicamente a AChE eritrocitária como também permite o congelamento das amostras para análises posteriores em locais apropriados e é livre de interações colorimétricas com a hemoglobina.

A atividade específica da AChE eritrocitária costuma ser relativamente constante, com 90% dos valores oscilando entre 500 e 700 mU/ μ mol Hb(Fe), contrastando com a BChE plasmática que apresenta variação inter e intra-individual muito maior (NIGG e KNAAK, 2000; WOREK et al., 1999; WOREK et al., 2005; LEFKOWITZ et al., 2007). Além disso, a atividade da enzima eritrocitária apresenta maior correlação com a AChE do sistema nervoso do que as demais colinesterases periféricas (AChE linfocitária, plaquetária e BChE plasmática), o que a torna mais adequada para utilização na avaliação de exposição a agentes anticolinesterásicos (TINOCO-OJANGUREN e HALPERIN, 1998; THIERMANN et al., 2007). Segundo estudo de Oliveira-Silva e colaboradores (2000), a atividade da AChE eritrocitária em amostras congeladas se mantém estável até 7 dias enquanto a BChE se mantém estável por apenas 3 dias. Além disso, a regeneração espontânea da BChE frente a agentes anticolinesterásicos ocorre de forma mais rápida (de alguns dias a semanas) do que a regeneração da AChE (1 a 3 meses), reduzindo as chances de se detectar tais compostos após um intervalo de tempo maior das exposições (REIGART e ROBERTS, 1999; NIGG e KNAAK, 2000).

Para a execução de um programa de monitoramento bem-sucedido, deve-se levar em conta que algumas condições além da exposição aos pesticidas podem alterar a atividade das ChEs, prejudicando a avaliação e interpretação dos resultados dos estudos. A atividade BChE pode ser alterada em razão de doenças do fígado, desnutrição, alcoolismo, síndrome nefrítica, gravidez, pílulas contraceptivas, metoclopramida e outros fatores (Tabela 5). Enquanto a atividade da AChE eritrocitária é alterada pela gravidez, anemia, eventos hemorrágicos e reticulocitose. Outros fatores que podem resultar em interpretação errônea dos níveis de atividade ChE são coleta, processamento e transporte impróprios assim como erros nas análises laboratoriais (BOIKO et al., 2004; DEL PRADO-LU, 2007). Além disso, podem ser tomadas medidas para minimizar a variação intra-individual considerando cada pessoa como seu próprio controle, coletando amostras antes e depois dos períodos aplicação dos pesticidas.

Tabela 5 – Fatores causadores de variação da atividade das colinesterases do sangue (ATSDR, 2007).

	AChE eritrocitária	BChE plasmática
Baixos níveis	<ul style="list-style-type: none"> - drogas anti-malária - contraceptivos orais - anemias 	<ul style="list-style-type: none"> - desnutrição - gravidez - infecções agudas - contraceptivos orais - alcoolismo - anemias - cocaína - codeína - doença debilitante crônica - dissulfeto de carbono - ciguatoxinas - sais de benzalcônio - dermatomiosite - deficiência genética - doença parenquimal hepática - morfina - compostos organomercúricos - solaninas - succinilcolina - tubo de coleta de sangue tampa cinza (fluoreto de sódio + EDTA)
Altos níveis		<ul style="list-style-type: none"> - síndrome nefrítica

3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F. R.; ARACAVALA, Y.; FAWCETT, W. P.; OLIVEIRA, M.; RANDALL, W. R.; HAMILTON, T. A.; KAN, R. K.; ROMANO JR., J. A.; ADLER, M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 13220-13225, 2006.

ALDRIDGE, W. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. **Biochemical Journal**, v. 46, p. 117-124, 1950.

ALDRIDGE, W. N.; DAVISON, A. N. The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid: 1. diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and analogues. **Biochemical Journal**, v. 51, p. 62-70, 1952.

AL-JAFARI, A. A.; SHAKIL, S.; REALE, M.; KAMAL, M. A. Human platelet acetylcholinesterase inhibition by cyclophosphamide: a combined experimental and computational approach. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 10, 928-935, 2011.

ANVISA/UFPR. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ANWAR, W. A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 105, p. 801-806, 1997.

ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO Jr., L. B. 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Pesticides in modern world – Book 5. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia.

ATSDR. **Toxicologic information about insecticides used for eradicating mosquitoes (West Nile virus control)**. Atlanta, 2005.

ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Case studies in Environmental Medicine cholinesterase inhibitors: including pesticides and chemical warfare nerve agents. **Course WB1102**. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html>. Atlanta, 153 pp., 2007.

AUGUSTINSSON, K. B. Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, p. 81-89, 1971.

AUGUSTO, L. G. S. Uso dos agrotóxicos no semi-árido brasileiro. In: **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente** (org.: Frederico Peres e Josino Costa Moreira). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 59-73, 2003.

BARTELS, C. F.; ZELINSKI, T.; LOCKRIDGE, O. Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 928-936, 1993.

BIGBEE, J. W.; SHARMA, K. V.; GUPTA, J. J.; DUPREE, J. L. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 81-87, 1999.

BOIKO, P.; KEIFER, M.; FURMAN, J.; WEYRAUCH, K.; HANKS, C. 2004. **Cholinesterase monitoring for agricultural pesticide handlers: guidelines for health care providers in Washington State, USA.**

BON, S.; MEFLAH K.; MUSSET, F.; GRASSI, J.; MASSOULIÉ, J. An immunoglobulin M monoclonal antibody, recognizing a subset of acetylcholinesterase molecules from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*, belongs to the HNK-1 anti- carbohydrate family. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, p. 1720-1731, 1987.

BRIMIJOIN, S.; KOENIGSBERGER, C. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 59-64, 1999.

BRIMIJOIN, S. Can cholinesterase inhibitors affect neural development? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 429–432, 2005.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S. RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chemical Research in Toxicology**, 17, 983-998, 2004.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 157–158, p. 277–283, 2005.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, p. 625-634, 1989.

CHHAJLANI, V.; DERR, D.; EARLES, B.; SCHMELL, E.; AUGUST, T. Purification and partial amino acid sequence analysis of human erythrocyte acetylcholinesterase. **FEBS Letters**, v. 247, p. 279–82, 1989.

ÇOKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, 28, 54-61, 2003.

COUSIN, X.; STRÄHLE, U.; CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. **BioEssays**, 27, 189–200, 2005.

CUNHA BASTOS, V. L. F.; SILVA FILHO, M. V.; ROSSINI, A.; CUNHA BASTOS, J. The activation of parathion by brain and liver of a Brazilian suckermouth benthic fish shows comparable in vitro kinetics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 64, p. 149–156, 1999.

DAUTERMAN, W. C. Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compounds. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, p. 133-150, 1971.

DEL PRADO-LU, J. L. Pesticide exposure, risk factors and health problems among cutflower farmers: a cross sectional study. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, 2, 9, 2007.

DEPREZ, P.; DOSS-PEPE, E.; BRODSKY, B.; INESTROSA, N. C. Interaction of the collagen-like tail of asymmetric acetylcholinesterase with heparin depends on triple-helical conformation, sequence and stability. **Biochemical Journal**, v. 350, p. 283-290, 2000.

EASTMAN, J.; WILSON, E. J.; CERVEÑANSKY, C.; ROSENBERRY, T. L. Fasciculin 2 binds to peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. **Journal of Biological Chemistry**, 270, 19694-19701, 1995.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D., editores. **Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. Nova York: Mc Graw Hill; 1993. p. 565-622.

EDSON, E. F. Blood tests for users of OP insecticides. **World Crops**, v. 10, p. 49-51, 1958.

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

EMMET, S. R.; GREENFIELD, S. A. A peptide derived from the C-terminal region of acetylcholinesterase modulates extracellular concentrations of acetylcholinesterase in the rat substantia nigra. **Neuroscience Letters**, v. 358, p. 210-214, 2004.

FAMBROUGH, D. M.; ENGEL, A. G.; ROSENBERY, T. L. Acetylcholinesterase of human erythrocytes and neuromuscular junctions: homologies revealed by monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 79, p. 1078-1082, 1982.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Pesticides in food report 2007. **FAO plant production and protection paper 191**. Rome, 2007.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, I. A.; FASSA, A. G. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 20, p.1298-1308, 2004.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.

FLORES, P. G.; MARTINEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; HERNÁNDEZ, E. H. Presencia de resíduos y contaminantes en leche humana. **Revista Española de Salud Pública**, v. 76. p. 133- 147, 2002.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R.. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, p. 111-125, 2004.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FRANCO NETTO, G. On the need to assess cancer risk in populations environmentally and occupationally exposed to virus and chemical agents in developing countries. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 87-98, 1998.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 87, p. 245–254, 1990.

FURLONG, C. E.; RICHTER, R. J.; SEIDEL, S. L.; MOTULSKY, A. G. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. **American Journal of Human Genetics**, v. 43, p. 230-238, 1988.

FUXREITER, M.; WARSHEL, A. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: computer simulation studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 183-194, 1998.

GARRÉ, C.; RAVAZZOLO, R.; STRADA, P.; CAPPELLINI, M. D.; AJMAR, F. Foetaltype acetylcholinesterase in an anaemic patient with high HbF. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 28, p. 306-308, 1982.

GEORGE, P. M.; ABERNETHY, M. H. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. **Clinical Chemistry**, v. 29, p. 365-368, 1983.

HAJJAWI, O. S. Acetylcholinesterase in human red blood cells. **European Journal of Scientific Research**, v. 75, p. 510-522, 2012.

HE, F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. **International Archives of Occupational & Environmental Health**. v. 65, p. 569-576. 1993.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2897–2908, 2011.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. The Peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 217-225, 2006.

KAPPERS, W. A.; EDWARDS, R. J.; MURRAY, S.; BOOBIS, A. R. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 177, p. 68–76, 2001.

KELLAR, K. J. Overcoming inhibitions. **Proceedings of The National Academy of Sciences**. v. 103, p. 13263–13264, 2006.

KOH, D.; JEYARATNAM, J. Pesticide hazards in developing countries. **Science of the Total Environment**, v.188, p. 78-85, 1996.

KOIFMAN, R. J; KOIFMAN, S.; VIEIRA, R. J. da S. Familial aggregation of breast/ovarian cancer: age of onset along subsequent generations in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 181-185, 1998.

KONRADSEN, F.; VAN DER HOEK, W.; COLE, D. C.; HUTCHINSON, G.; DAISLEY, H.; SINGH, S.; EDDLESTON, M. Reducing acute poisoning in developing countries – options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology**. v. 192, p. 249-61, 2003.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Editora Manole, 1999.

LAWSON, A. A.; BARR, R. D. Acetylcholinesterase in red blood cells. **American Journal of Hematology**, v. 26, p. 101-112, 1987.

LEFKOWITZ, L. J.; KUPINA, J. M.; HIRTH, N. L.; HENRY, R. M.; NOLAND, G. Y.; BARBEE, J. Y.; ZHOU, J. Y.; WEESE, C. B. Intraindividual stability of human erythrocyte cholinesterase activity. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1358–1363, 2007.

LEWALTER, J.; KORALLUS, U. Erythrocyte protein conjugates as a principle of biological monitoring for pesticides. **Toxicology Letters**, v. 33, p. 153-65, 1986.

LI, W. F.; FURLONG, C. E.; COSTA, L. G. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 40, p. 337-346, 1993.

LI, W. F.; FURLONG, C. E.; COSTA, L. G. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. **Toxicology Letters**, v. 76, p. 219-226, 1995.

MACHEMER, L.H.; PICKEL, M. Carbamates Insecticides. **Toxicology**, v. 91, p. 29-36, 1994.

MANSOUR, S. A. Pesticide exposure – Egyptian Scene. **Toxicology**, v. 20, p. 91-115, 2004.

MANTHRIPRAGADA, A. D.; COSTELLO, S.; COCKBURN, M. G.; BRONSTEIN, J. M.; RITZ, B. Paraoxonase 1 (PON1), agricultural organophosphate exposure and Parkinson disease. **Epidemiology**, v. 21, p. 87–94, 2010.

MARTINS, D. B.; MAZZANTI, C. M.; COSTA, M. M.; FRANÇA, R.; PAGNONCELLI, M.; MACIEL, R. M.; SCHMATZ, R.; OLIVEIRA, L.; MORSCH, V.; FACCO, G.; VISENTINI, D.; MANN, T.; MAZZANTI, A.; LOPES, S. T. A. Complete blood count and acetylcholinesterase activity of lymphocytes of demyelinated and ovariectomized rats treated with resveratrol. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 2012 *In press*, doi:10.3109/08923973.2012.682581.

MASSON, P.; ROCHU, D. Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. **Acta Naturae**, v. 1, p. 68-78, 2009.

MASSOULIÉ, J.; BONN, S. The molecular forms of cholinesterase e acetilcolinesterase. **Annual Reviews in Neurosciences**, 5, 57-106, 1982.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BONN, S; KREJCI, E.; VALLETTE, F.-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MATOS, E. L.; LORIA, D. J.; ALBIANO, N.; SOBEL, N.; BUJÁN, E. C. Efectos de los plaguicidas en trabajadores de cultivos intensivos. Boletim de la **Oficina Sanitária Panamericana**, v. 104, n. 2, p. 160-170, 1988.

MESNIL, M.; TESTA, B.; JENNER, P. Xenobiotic metabolism by brain monooxygenases and other cerebral enzymes. **Advances in Drug Research**, v. 13, p. 95, 1984.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; e LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-39, 2002.

METCALF, R. L. Structure-activity relationships for insecticidal carbamates. **Bulletin of World Health Organization**, v. 4, p. 43-78, 1971.

MILLARD, C. B.; KOELLNER, G.; ORDENTLICH, A.; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, A.; SUSSMAN, J. L. Reaction products of acetylcholinesterase and VX reveal a mobile histidine in the catalytic triad. **Journal of American Chemical Society**, v. 121, p. 9883-9884, 1999.

MILLER, B. G.; WOLFENDEN, R. Catalytic Proficiency: The Unusual Case of OMP Decarboxylase. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 71, p. 847–885, 2002.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G.; PINHO, G. L. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology part C**, v. 146, p. 221–234, 2007.

MUKHERJEE, I.; GOPAL, M. Organochlorine insecticide residues in drinking and groundwater in and around Delhi. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 76, p. 185–193, 2002.

MUTCH, E.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. **Human & Experimental Toxicology**, v. 11, p. 109-116, 1992.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, 13, 241-245, 2002.

NIGG, H. N.; KNAAK, J. B. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. **Reviews in Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 29-111, 2000.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, p. 372-383, 1998.

O GLOBO. Site. <http://www.sinpaf.org.br/modules/smartsection/item.php?itemid=831>. Acesso em 02 de dez. 2009. O Globo, 25/10/2009.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INACIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C.; FERREIRA, M. F. A.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, p. 173-177, 2000.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PERES, F.; SARCINELLI, P. N.; COSTA MATTOS, R. C. O.; MOREIRA, J. C. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 130-135, 2001.

OLSON, C. E.; CHHAJLANI, V.; AUGUST, J. T.; SCHMELL, E. D. Novel allosteric sites on human erythrocyte acetylcholinesterase identified by two monoclonal antibodies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 277, p. 361-367, 1990.

PAUDYAL, B. P. Organophosphorus poisoning. **Journal of Nepal Medical Association**, v. 47, p. 251-258, 2008.

PERES, F. Os desafios da construção de uma abordagem metodológica de diagnóstico rápido da percepção de risco no trabalho. In: **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente** (org.: Frederico Peres e Josino Costa Moreira). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 251-279, 2003a.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente** (org.: Frederico Peres e Josino Costa Moreira). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 21-41, 2003b.

PEZZEMENTI, L.; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. **Chemico-Biological Interactions**, 187, 27–33, 2010.

POPE, C.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 433–446, 2005.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, p. 955-979, 1987.

RADIC, Z.; QUINN, D.; VELLOM, D. C.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 20391-20399, 1995.

RAMOS, A. S. F.; TECHERT, S. Influence of the water structure on the acetylcholinesterase efficiency. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 1990–2003, 2005.

- RAO, N.; WHITSETT, C. F.; OXENDINE, S. M.; TELEN, M. J. Human erythrocyte acetylcholinesterase bears the Yta blood group antigen and is reduced or absent in the Yt(a-b-) phenotype. **Blood**, v. 81, p. 815-819, 1993.
- REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. Recognition and management of pesticide poisoning. Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency. 1999.
- REINER, E. Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. **Bulletin of World Health Organization**, 44, 109-112, 1971.
- RILEY, B. The toxicology and treatment of injuries from chemical warfare agents. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 14, p. 149-154, 2003.
- ROJAS, R. A.; OJEDA, B. M. E.; BARRAZA, O., Ximena. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. **Revista Médica de Chile**, v. 128, n. 4, p. 399-404, 2000.
- ROSENBERRY, T. L. Acetylcholinesterase. **Advances in Enzymology and Related Areas Molecular Biology**. v. 43, p. 103-218, 1975.
- ROUFOGALIS, B. D.; QUIST, E. E. Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. **Molecular Pharmacology**, v. 8, p. 41-49, 1972.
- SALLES, J. B.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; SILVA FILHO, M. V.; MACHADO, O. L. T.; SALLES, C. M. C.; GIOVANNI DE SIMONE, S.; CUNHA BASTOS, J. A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a Neotropical fish. **Biochimie**, v. 88, p. 59-68, 2006.
- SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. **Science of The Total Environment**, 247, 313-332, 2000.
- SHAFFERMAN, A.; ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; STEIN, D.; ARIEL, N.; VELAN, B. Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. **Biochemical Journal**, v. 318, p. 833-840, 1996.
- SIHOTANG, K. Properties of human erythrocyte acetylcholinesterase. **Journal of Biochemistry**, v. 75, p. 939-941, 1974.
- SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293-302, 2005.

SOARES; W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1117-1127, 2003.

SOBREIRA, A. E. G. **Agrotóxicos: o fatalismo químico em questão estudo de caso de Boqueirão e Lagoa Seca – PB, 2003**. Dissertação (Mestrado em Geografia; área de concentração: Regionalização e Análise Regional). Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2004.

STERNFELD M.; MING, G. L.; SONG, H. J.; SELA, K.; TIMBERG, R.; POO, M. M.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C-termini. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 1240–1249, 1998.

TAYLOR, P. The cholinesterases. **Journal of Biological Chemistry**, 266, 4025-4028, 1991.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. 1994. Acetylcholine. In: **Basic Neurochemistry**. 5. ed. (SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; MOLINOFF, P. B., Eds.) pp. 231-260, Raven Press, Nova York.

TAYLOR, P.; RADIC, Z.; HOSEA, N. A.; CAMP, S.; MARCHOT, P. BERMAN, H. A. Structural basis for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 453-458. 1995.

THIERMANN, H.; WOREK, F.; EYER, P. Collecting and measuring cholinesterase samples: avoiding the pitfalls. Mesa redonda 12.12.2007. Apresentação IS007.

6th Annual Congress of APAMT. Disponível em:

<http://www.asiattox.org/6th%20APAMT%20pdf/Collecting%20and%20measuring%20cholinesterase%20samples%20avoiding%20the%20pitfalls..pdf>.

TINOCO-OJANGUREN, R.; HALPERIN, D. C. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. **Archives of Environmental Health**, v. 53, p. 29-35, 1998.

TOMLINSON, G.; MUTUS, B.; MCLENNAN, I. Modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral site ligands. **Molecular Pharmacology**, v. 18, p. 33-39, 1980.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents**, v. 1, p. 155-170, 2001.

TRAPÉ, A. Z. O caso dos agrotóxicos. In: ROCHA, et al. **Isto é trabalho de gente?: vida, doença e trabalho no Brasil**. Petrópolis, Vozes, 1993, p. 568-93).

UFF/CCIn. UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE/CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES. **Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides**, Niterói: UFF, 2000.

UNIVERSITY OF YORK. CIEC promoting science at the University of York. Disponível em: www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/crop-protection-chemicals.html. última atualização: 18 de março de 2013.

USDA. U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Toxicological Profile for Dichlorvos. **Toxicological Profile 88**, Atlanta, 1997.

USDA. U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD. **Toxicological Profile 35**, Atlanta, 2002.

USEPA. 2011. United States Environmental Protection Agency. **Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates**. U.S. Environmental Protection Agency: Washington DC, 2011. Disponível em: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicol Letters**, 102-103, 649-652, 1998.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos à fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

WEBB, C.P.; GREENFIELD, S. A. Non-cholinergic effects of acetylcholinesterase in the substantia nigra: a possible role for an ATP-sensitive potassium channel. **Experimental Brain Research**, v. 89, p. 49-58, 1992.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **American Journal of Physiology**, v. 149, p. 549-51, 1947.

WESSELS, D.; BARR, D. B.; MENDOLA, P. Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1939-1946, 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on the safe use of pesticides in public health. **Technical Report Series 356**; Geneva, Switzerland, 1967.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity. **WHO/VBC/84.888**; Geneva, Switzerland, 1984.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria 63**, Geneva, Switzerland. 1986a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Carbamate insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria 64**, Geneva, Switzerland. 1986b.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dichlorvos. **Environmental Health Criteria 79**, Geneva, Switzerland. 1989.

WHO. World Health Organization. **Public health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva; 1990.

WHO/UNEP/ILO/IPCS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard**. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO package for the health sector. Children's health and the environment. Disponível em: http://www.who.int/ceh/capacity/training_modules/en/index.html . 2008.

WIENER, S. W.; HOFFMAN, R. S. Nerve agents: a comprehensive review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 19, p. 22-37, 2004.

WOREK, F.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation and ageing kinetics. **Archives of Toxicology**, v. 73, p. 7-14, 1999.

WOREK, F.; KOLLER, M.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, 214, 182-9, 2005.

ZHANG, D.; MCCAMMON, J. A. The association of tetrameric acetylcholinesterase with ColQ tail: a block normal mode analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 1, p. 484-491, 2005.

**4. CAPÍTULO II – DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EXTRACTION
AND ASSAY OF HUMAN ERYTHROCYTE
ACETYLCHOLINESTERASE AND PESTICIDE INHIBITION**

ESTE ARTIGO FOI PUBLICADO NA REVISTA HUMAN & EXPERIMENTAL
TOXICOLOGY



Human & Experimental Toxicology Volume 32 Issue 8, August 2013 837-845

Development of a method for extraction and assay of human erythrocyte
acetylcholinesterase and pesticide inhibition

AG Linhares¹, CRD Assis¹, MT Siqueira², RS Bezerra¹, LB Carvalho Jr^{1*}

¹Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica and
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife-PE, Brazil; ²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco,
Recife-PE, Brazil.

***Correspondence:**

Luiz B. de Carvalho Jr.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário,

50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

Tel.: + 55 81 21268540;

Fax: + 55 81 21268576.

E-mail: lbcj@hotmail.com.br

Running header: Human erythrocyte acetylcholinesterase and pesticide inhibition

Abstract

A method to extract membranes from red blood cells (RBC) is described, which were in turn used to assay acetylcholinesterase (AChE) activity. The evidence for the enzyme activity was established by selective inhibition using BW284c51, Iso-OMPA and neostigmine. Blood samples were exposed to three organophosphorus (dichlorvos, chlorpyrifos, diazinon) and two carbamate (carbaryl and carbofuran) pesticides. Afterwards AChE activities in RBC membranes were determined. The concentrations capable to inhibit the enzyme activity by 50% (IC_{50}) for the pesticides were 10.66 μ M (dichlorvos), 21.42 μ M (chlorpyrifos), 109.98 μ M (carbaryl) and 5.44 μ M (carbofuran). The results related to 20% enzyme inhibition (level used in estimation of threshold limits for anticholinesterasic compounds) were below those Acceptable Daily Intakes (ADIs) values enacted by relevant national and international regulations. These results suggest that the proposed AChE extraction from RBC and assay could be a suitable method for monitoring occupational exposure to pesticides.

Key words: acetylcholinesterase, organophosphorus, carbamate, erythrocyte, biomarker

Introduction

Although the pesticides have provided an increase in agricultural productivity enabling high quality food at lower costs, the improper use of these chemicals can bring harm to human health and negative impact to environment¹. It is estimated that only 0.1% of the applied pesticides in fact reach the target animals, whereas the rest spreads throughout the environment. The financial costs saved by pest control are partially wasted through the environmental and public health problems caused by pesticides². Agricultural workers are exposed to high risks of poisoning due to intense contact with pesticides. Such compounds can cause adverse effects on central and peripheral nervous system, immune system and are carcinogenic. The most used classes of insecticides and source of occupational poisoning are the organophosphates (OPs) and carbamates (CBs). In 2007, organophosphates accounted for 35% of all insecticides used in the United States³.

OPs and CBs are typical inhibitors of the cholinesterases (ChEs), and there are two accepted types of these enzymes. First, the enzyme acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), that occurs in brain, ganglia of the autonomic nervous system and motor endplates, is produced by the neurons and it plays the primary function in the nerve impulse modulation at the synaptic clefts. Another form of AChE is observed in the plasma membrane of red blood cells (RBC), which is synthesized during the process of bone marrow haematopoiesis and has a half-life of approximately 120 days, the same as that of RBCs. Second, the butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is synthesized in liver and predominates in plasma, glial cells, pancreas and the walls of digestive tract and presents an in vivo half-life of 7 days⁴⁻⁶.

OPs and CBs are widely used in developing countries, predominantly in agriculture, for pest control and public health campaigns to eradicate disease vectors⁷⁻⁹. In the developing world, the negative consequences of pesticide usage are conditioned by factors closely related, such as the mishandling of these substances, the high toxicity of some products, the lack of protective equipment and the poor surveillance. This situation is aggravated by low cultural and socioeconomic status for most of these workers. Markedly in these countries, the monitoring of occupational exposure to such compounds presents problems in rural locations, especially the distance of testing laboratories where there is no appropriate infrastructure for the analysis¹⁰⁻¹². Here, we

developed a method for the extraction and assay of human RBC AChE and evaluated the sensitivity and the specificity of the method to measure the exposure to pesticides, comparing the results of inhibition with relevant national and international regulations in force.

Material and Methods

Reagents and Material

Acetylthiocholine iodide, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (Iso-OMPA), 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), neostigmine bromide, bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), tris (hydroxymethyl) aminomethane and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade dichlorvos (98.8%), diazinon (99.0%), chlorpyrifos (99.5%), carbofuran (99.9%) and carbaryl (99.8%) were obtained from Riedel-de-Haën, Pestanal[®] (Seelze, Germany). A Bio-Rad xMark (Hercules Ca, USA) microplate spectrophotometer was used.

Methods

Blood samples

The blood samples were collected (9 mL) from healthy students ($n = 22$), who were not exposed to pesticides by venepuncture and gentle hand shaking and the blood samples were homogenized with 10% EDTA (100 μ L). These individuals were previously interviewed regarding the occurrence of diseases that could interfere with the activity of the enzyme: pregnancy, anemia, haemorrhagic events and reticulocytosis. Furthermore they previously agreed to participate in this research approved by the Ethical Committee of The Health Science Centre of the Federal University of Pernambuco, Brazil (protocol number 0158.0.172.000-09).

Sample processing and enzyme extraction

Aliquots (1.8 mL) of whole blood were incubated for 60 min with 200 μ L solutions of each pesticide prepared with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.15 M sodium chloride (Tris-buffered saline (TBS) buffer). The pesticides used included the OPs (dichlorvos, diazinon and chlorpyrifos) and the CB (carbaryl and carbofuran). The pesticides were first dissolved in DMSO and diluted with distilled water to attain 13 solutions at final concentrations ranging from 0.01 to 100 μ g/mL in 2% (v/v) DMSO.

Modifying Oliveira-Silva et al.¹¹ method, the whole blood samples were also incubated with 200 μ L of TBS only and TBS + 2% DMSO instead the pesticides as controls. The samples were then centrifuged at 2,000g for 4 min to obtain plasma and erythrocyte fractions. They were separated and the aliquots of 500 μ L of RBC were resuspended in 4.5 ml of lysis buffer (0.01 M Tris-HCl pH 7.6 without salt). The samples were kept at -20°C for 24 hours for RBC lysis. After lysis, the RBC samples were centrifuged three times at 4,000g for 15 min, discarding the supernatant after each centrifugation. Afterwards the pellet (RBC membranes or "ghost" suspension) was resuspended in 500 μ L of enzymatic assay buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.4). Aliquots of the RBC membranes controls were also used to characterize RBC AChE selective inhibition.

Enzyme activity for selective inhibition

Samples of the RBC membranes from controls were exposed to selective inhibitors: BW284c51 for AChE, Iso-OMPA for BChE and neostigmine bromide as total ChEs inhibitor. The samples (10 μ L) were kept inside of microplate wells and exposed to each inhibitor (10 μ L) at five different concentrations ranging from 0.001 to 10 mM during 60 min. After incubation, enzyme activity was determined using Ellman method¹³ with modification by Assis.¹⁴ Briefly, 0.25 mM DTNB (200 μ L) prepared in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 was added to the incubated mixture and the reaction was started by the addition of 62 mM acetylthiocholine iodide (20 μ L). Enzyme activity was determined by reading the absorbance increase at 405 nm during 180 s. A unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of converting 1 μ M of substrate per minute. A blank was prepared with the assay buffer instead of ghost suspension sample. All these assays were carried out in quadruplicates

Enzyme activity in blood samples exposed to pesticides.

The activity of membrane RBC AChE extracted from whole blood samples incubated with pesticides and controls were determined by mixing 200 μL of DTNB with 20 μL of ghost samples and finally adding 20 μL of the substrate acetylthiocholine iodide. The reaction was carried out and followed spectrophotometrically, similarly as described in the section on selective inhibition. All these assays were carried out in quadruplicates.

Protein determination

Protein content in the RBC membrane preparations was estimated according to Sedmak and Grossberg¹⁵, using bovine serum albumin as a standard. All tests were performed at room temperature (25°C) in triplicates.

Estimation of IC₂₀, IC₅₀ and Ki

The enzymatic activity values obtained from selective inhibitors and pesticide exposition were plotted against selective inhibitor or insecticide concentration. From the curves generated by nonlinear regression fitting (using MicroCal™ Origin® Version 8.0), the IC₅₀ and IC₂₀ (concentrations capable of inhibiting the enzyme activity by 50% and 20%, respectively) were estimated for each selective inhibitor or pesticide. Their respective inhibition constants (Ki) were calculated using the Cheng and Prusoff equation.¹⁶

Comparative study of enzyme inhibition in accordance with current regulations

The IC₂₀ found for the pesticides was converted from microgram per milliliter to milligram per kilogram body weight per day (acceptable daily intake (ADI) unit) for comparison with the results reported by specialized agencies.

Sensitivity and specificity of the method

The ability to correctly detect whether samples were exposed to each pesticide was analyzed by measuring the sensitivity and specificity of the test according to Glaser¹⁷ and using 20% of enzymatic inhibition as a cutoff.¹⁸

Results

AChE present in the RBC membrane preparation was strongly inhibited (about 50%) by its specific inhibitor BW284c51 at 0.001 mM (Fig. 1A), whereas under Iso-OMPA exposure (BChE specific inhibitor) its activity was only 19% reduced at 1 mM (Fig. 1B).

On the other hand, neostigmine, a very potent inhibitor of total ChEs, abolished the enzyme activity even at 0.001 mM (Fig. 1(c)). These results show the ability of the enzyme extraction method in getting just the fraction of AChE from RBC. The IC_{50} and K_i values for BW284c51 and neostigmine were 0.92 μ M; 0.0054 μ M; 0.30 μ M and 0.0018 μ M, respectively. It was not possible to estimate these parameters for Iso-OMPA.

The effects of dichlorvos, diazinon and chlorpyrifos (OPs) as well as carbaryl and carbofuran (CBs) on RBC membrane AChE are displayed in Figures 2 and 3, respectively. The results showed that diazinon is a less effective inhibitor among the five investigated pesticides, whereas dichlorvos and carbofuran were the most powerful inhibitors. These findings are corroborated by their IC_{20} , IC_{50} and K_i (Table 1) estimated from the curves. The parameter IC_{20} converted to milligram per Kg body weight per day was confronted with the values of ADI found in national and international specific legislation in Table 1.

The results of sensitivity and specificity for each pesticide are listed in Table 2. Sensitivity ranged from 75 % (diazinon) to 100% (chlorpyrifos and carbaryl), and specificity from 63.6% (carbofuran) to 83.3% (dichlorvos).

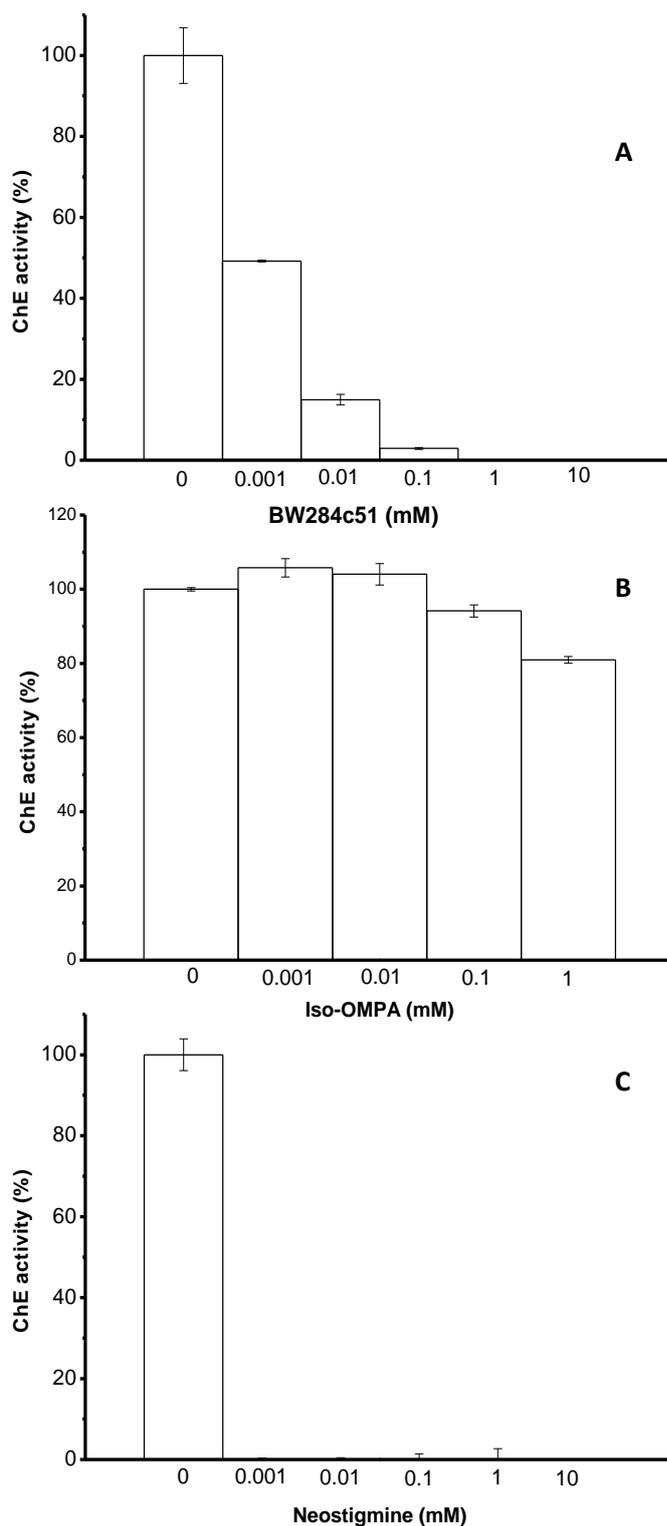


Figure 1 – Effect of (A) BW284c51, (B) Iso-OMPA and (C) neostigmine bromide from 0.001 to 10 mM on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase; Iso-OMPA: tetraisopropyl pyrophosphoramidate; BW284c51: 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide.

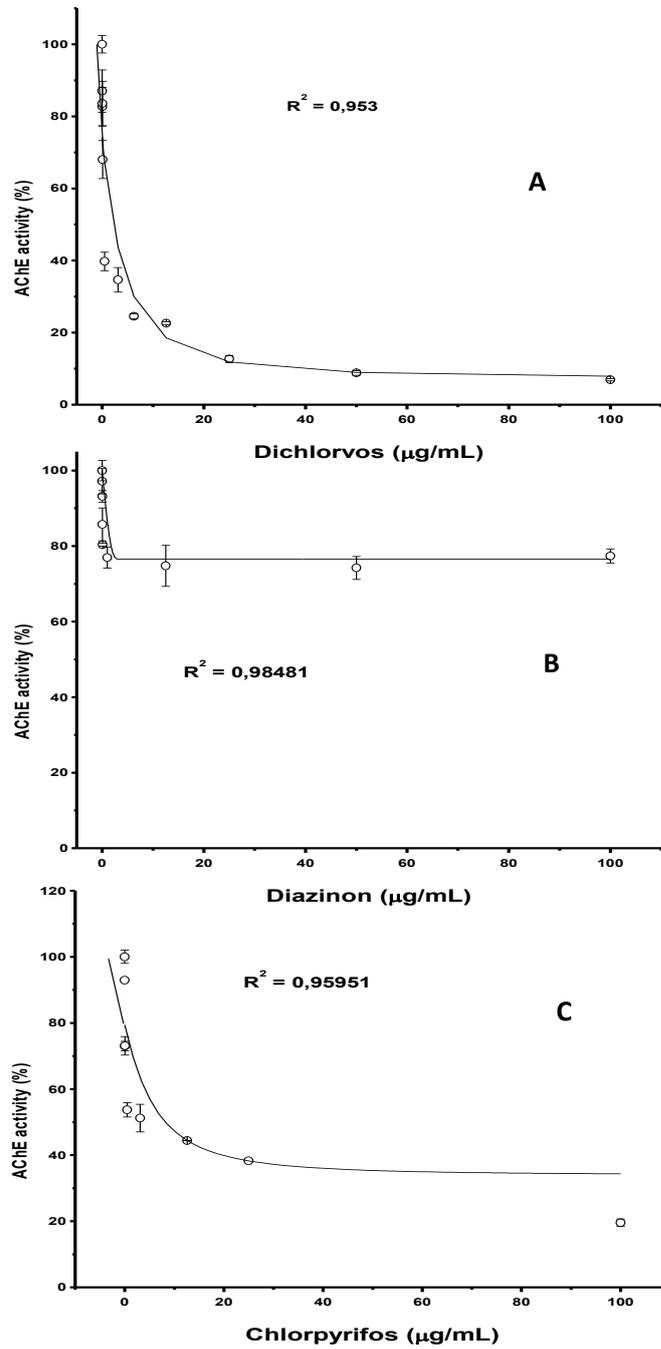


Figure 2 – Effect of (A) dichlorvos, (B) diazinon and (C) chlorpyrifos from 0.01 to 100 $\mu\text{g/mL}$ on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase.

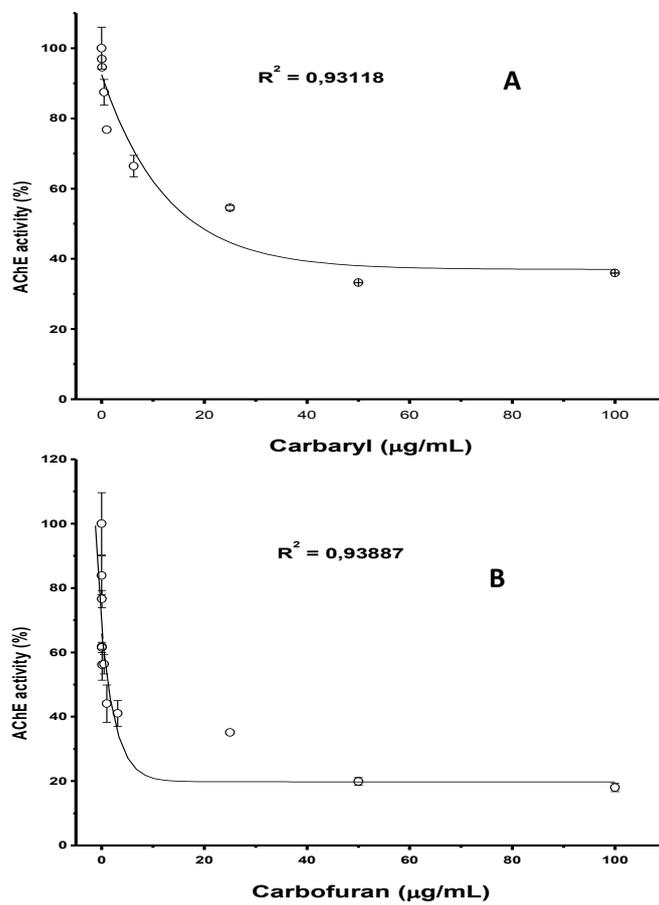


Figure 3 - Effect of (A) carbaryl and (B) carbofuran from 0.01 to 100 $\mu\text{g/mL}$ on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase.

Discussion

The mechanism of action of OPs and CBs occurs through binding to the esteratic site of enzymes with phosphorylation and carbamoylation, respectively.^{19,20} Inhibition by the organophosphorus compounds tends to be irreversible if untreated.⁷ The inhibition by CBs is reversible and the recovery of the enzyme may take several minutes to hours.⁸

The monitoring of pesticides based on blood ChE inhibition recommended by World Health Organization (WHO)^{21,22} requires fresh blood samples of total ChE using the methods of Edson²³ and Ellman¹³ (adapted by WHO)²² or RBC AChE by George and Abernethy²⁴. The disadvantages of these methods are the nondiscriminating use of both blood enzyme activities in case of using total ChE samples and the less accuracy by hemoglobin interference in the case of those which use RBC AChE samples without complete red cell lysis and centrifugation. The method proposed by Oliveira-Silva and co-workers¹¹ not only uses RBC AChE but also allows the freezing of samples for further analysis in an appropriate place without colorimetric interactions with hemoglobin.

Several works chose RBC AChE instead of BChE for many reasons, as follows: (1) determination of inter- and intraindividual variation in both ChE activities, which was considered critical for a blood esterase monitoring program. The class of AChEs is more homogeneous in terms of their primary structure than the class of BChEs,²⁵ and RBC AChE activity was pointed to be less variable than BChE^{26,27}; (2) the first one is more closely correlated with the AChE activity from nervous system²⁸; (3) more stability in frozen blood samples: 7days against 3 days for BChE¹¹; (4) BChE spontaneous recovery of inhibited forms are faster than AChE²⁶. In order to perform a successful monitoring program, it should be taken into account that some conditions other than pesticide exposure can change blood ChEs activities, hindering the evaluation and interpretation of results from studies. BChE activity can be decreased by liver diseases, malnutrition, alcoholism, nephritic syndrome, pregnancy, contraceptive pills and metoclopramide, whereas RBC AChE activity is altered by pregnancy, anemia, hemorrhagic events and reticulocytosis. Other factors that may result in misinterpretation of ChE levels are collection, improper processing and transportation of samples and laboratory errors.^{29,30} In addition, considering each person as his or her

own control, measures should be taken to minimize intra-individual variation by collecting samples in periods of growing seasons before and after pesticide applications.

The efficiency of the proposed method to extract the membrane RBC AChE was shown by selective inhibition by BW284c51, whereas Iso-OMPA (BChE specific inhibitor) did not impair significantly the activity at low concentrations. Also, regarding the inhibition effect of BW284c51 and neostigmine on membrane RBC AChE is worthwhile to register that the dissociation rate (K_i) of neostigmine was threefold slower than that of BW284c51. One of the more remarkable differences between AChE and BChE is the smaller cavity of AChE active site, lined by six aromatic amino acid residues that prevent the entrance of the selective BChE inhibitors and substrates³¹.

Once established that membrane RBC AChE was properly extracted the whole blood was exposed to pesticides, simulating intoxication by them in order to evaluate the enzyme activity reduction as measure of this contact. The results showed the highest inhibitory action on the enzyme by dichlorvos compared to diazinon and chlorpyrifos. Dichlorvos is already bioactive as an oxon, whereas the thion form (diazinon and chlorpyrifos form) needs biotransformation to enhance its toxic action^{7,32}. However, another feature that interferes in the toxicokinetic of OP pesticides and that was decisive in the results is their specific lipophilicity. The most lipophilic compounds are rapidly absorbed and accumulated in fat and this contributes to the reduction of the primary effects of these pesticides (ChEs inhibition) while increasing secondary effects in other biomolecules. Phosphorothioates (diazinon and chlorpyrifos) are more lipophilic than phosphates (dichlorvos)³². In addition, serum oxonases seems to be more effective in the hydrolysis of diazinon and chlorpyrifos³³⁻³⁵. Moreover, according to Rosenberry,²⁵ AChE is more sensitive to small acylchain size condition fulfilled by dichlorvos compared to diazinon and chlorpyrifos.

Between the investigated CBs, carbofuran showed to be more toxic to membrane RBC AChE than carbaryl. This difference may be attributed to the 2,2-dimethylbenzofuranyl ring (carbofuran) that is more reactive than the naphthyl ring (carbaryl) when interacting with residues in the AChE active center³⁶. The controls with and without DMSO did not present significant difference.

The IC_{20} is the threshold limit to consider the presence of an anticholinesterasic compound while the IC_{50} represents the point at which clinical signs and symptoms appear and death occurs after 90% inhibition¹⁸. Here, the IC_{20} values were converted into ADI unit that stands for the highest concentration causing no effect (no-observed-

adverse-effect-level) on the most susceptible species of mammal in long-term studies (chronic exposure).

To verify the possibility of using membrane RBC AChE extracted by the method proposed here as a biomarker for pesticides exposure, the IC₂₀ values of each one (Table 1) should be below their respective ADIs. Thus, the values of IC₂₀ for all studied pesticides were lower than those recommended by WHO^{42,46}, Food and Agriculture Organization^{38,48,50}, Agency for Toxic Substances and Disease Registry^{9,43,47}, European Food Safety Agency^{40,44,51,54} United States Environmental Protection Agency^{39,53}, and ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency)^{37,41,45,49,52} except diazinon. It is noteworthy to mention that carbofuran presented low IC₂₀ value and has been outlawed nowadays in the United States for use in food farming⁵⁵.

The cutoff of 20% inhibition of AChE activity was chosen to evaluate the sensitivity and specificity, according to several institution recommendations as mentioned above. Sensitivity values for the five investigated pesticides were above 80%, except for diazinon, whereas all the specificity values were above 60% (Table 2).

Higher values would be found if the used cutoff was 50% inhibition but at this point clinical signs of poisoning by anti-ChE agents appear¹⁸ and the present proposed procedure would lose its usefulness.

Table 1 – ADI, IC₂₀ and IC₅₀ for human RBC AChE referring to pesticides under study.

Pesticide	ADI (ref.) (mg/kg bw/day)Ref	IC ₂₀ (mg/kg bw/day)	IC ₂₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	Ki (µM)
dichlorvos	0.004 ³⁷ 0.004 ³⁸ 0.00 ³⁹ 0.0005 ³⁹ 0.0008 ⁴⁰	0.0019	0.135	10.66	0.131
diazinon	0.002 ⁴¹ 0.002 ⁴² 0.0007 ⁴³ 0.0002 ⁴⁴	0.0076	0.394	- ^a	-
chlorpyrifos	0.01 ⁴⁵ 0.01 ⁴⁶ 0.001 ⁴⁷ 0.01 ⁴⁸	0.002	0.085	21.42	0.262
carbaryl	0.003 ⁴⁹ 0.008 ⁵⁰ 0.008 ⁴² 0.0075 ⁵¹	0.0033	4.96	109.98	1.35
Carbofuran ^b	0.002 ⁵² 0.002 ⁴² 0.005 ⁵³ 0.001 ⁵⁴	0.0019	0.135	5.44	0.066

RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase; IC₂₀ and IC₅₀: concentrations capable to inhibit the enzyme activity by 20% and 50%, respectively; ADI: acceptable daily intake.

^aThe maximum concentration used in the assays did not inhibit beyond 50%.

^bIn the process of cancelation of all licenses for use in food production in the United States.

Table 2 – Sensitivity and Specificity^a of the human erythrocyte AChE and pesticide inhibition method in relation to pesticides under study.

Pesticide	Sensitivity (%)	Specificity (%)
dichlorvos	90.9	83.3
diazinon	75.0	80.0
chlorpyrifos	100.0	66.7
carbaryl	100.0	75.0
carbofuran	88.89	63.6

AChE: acetylcholinesterase

^a - According to Glaser (2001)¹⁷

Conclusions

The results of the extraction method can be ascribed to RBC AChE according to selective inhibition. The used enzymatic assay allowed relevant levels of inhibition to be achieved, and they were at pesticide concentrations below the majority of ADIs adopted for the analyzed OPs and CB insecticides in foods by national and international regulations. Regarding this, the method showed sufficient *in vitro* accuracy to be a promising tool in human monitoring programs for occupational exposure of such pesticides and can be useful for sample collections in locations far from the laboratories.

Acknowledgments — The authors would like to thank Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), Petróleo do Brasil S/A (PETROBRAS), Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP/PR), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq).

Funding

Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support (Grant number: IBPG-0523-2.08/11 FACEPE).

References

- 1 – Silva JM, Novato-Silva E, Faria HP, Pinheiro TMM. Pesticides and work: a dangerous combination for the Brazilian agricultural workers health. *Ciência e Saúde Coletiva* 2005; 10: 891-903.
- 2 - Hart KA, Pimentel D. Environmental and economic costs of pesticide use. In Pimentel D, ed, *Encyclopedia of Pest Management*. Marcel Dekker: New York, pp 237–239, 2002.
- 3 - USEPA. 2011. United States Environmental Protection Agency. Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency: Washington DC, 2011. Available at: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf . Accessed in: june 17, 2011.
- 4 - Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* 1989; 260: 625-634.
- 5 - Çokugras AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry* 2003; 28: 54-61.
- 6 - Taylor P. The cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 4025-4028.
- 7 - WHO. 1986a. World Health Organization. Organophosphorus insecticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 63; Geneva, Switzerland.
- 8 - WHO. 1986b. World Health Organization. Carbamate insecticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 64; Geneva, Switzerland.
- 9 - ATSDR. 1997a. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Dichlorvos. *Toxicological Profile* 88; Atlanta, USA.
- 10 - Magnotti Jr RA, Eberly JP, Quarm DE, McConnell RS. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clinical Chemistry* 1987; 33: 1731-1735.
- 11 - Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Inacio AF, Meyer A, Sarcinelli PN, Mattos RC, Ferreira MFA, Cunha JC, Moreira JC. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human & Experimental Toxicology* 2000; 19: 173-177.

- 12 – Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Peres F, Sarcinelli PN, Costa Mattos, RCO, Moreira JC. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Revista de Saude Publica* 2001; 35: 130-135.
- 13 - Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961; 7: 88-95.
- 14 - Assis CRD, Castro PF, Amaral IPG, Maciel Carvalho EVM, Carvalho Jr LB, Bezerra RS. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2010; 29: 2243–2248.
- 15 - Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry* 1977; 79: 544-552.
- 16 - Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 1973; 22: 3099–3108.
- 17 - Glaser AN. High-yield biostatistics. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001.
- 18 - FAO. 2007. Food and Agriculture Organization. Pesticides in food report 2007. FAO plant production and protection paper 191; Rome, Italy.
- 19 – Fukuto R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* 1990; 87: 245-254.
- 20 - Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* 1987; 87: 955-979.
- 21 - WHO. 1967. World Health Organization. Expert committee on the safe use of pesticides in public health. Technical Report Series 356; Geneva, Switzerland.
- 22 - WHO. 1984. World Health Organization. Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity. WHO/VBC/84.888; Geneva, Switzerland.
- 23 - Edson EF. Blood tests for users of OP insecticides. *World Crops* 1958; 10: 49-51.
- 24 - George PM, Abernethy MH. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clinical Chemistry* 1983; 29: 365-368.

- 25 - Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1975; 43: 103-218.
- 26 - Nigg HN, Knaak JB. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology* 2000; 163: 29-111.
- 27 - Lefkowitz LJ, Kupina JM, Hirth NL, Henry RM, Noland GY, Barbee JY, Zhou JY, Weese CB. Intraindividual stability of human erythrocyte cholinesterase activity. *Clinical Chemistry* 2007; 53: 1358–1363.
- 28 - Tinoco-Ojanguren R, Halperin DC. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Archives of Environmental Health* 1998; 53: 29-35.
- 29 – Furman J, Boiko P, Keifer M, Furman J, Weyrauch K, Hanks C. 2004. Cholinesterase monitoring for agricultural pesticide handlers: guidelines for health care providers in Washington State, USA.
- 30 - Del Prado-Lu JL. Pesticide exposure, risk factors and health problems among cutflower farmers: a cross sectional study. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2007; 2: 9.
- 31 - Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié J, Silman I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1992; 89: 10827-10831.
- 32 - Vale JA. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters* 1998; 102-103: 649-652.
- 33 - Li WF, Furlong CE, Costa LG. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1993; 40: 337-346.
- 34 - Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicology Letters* 1995; 76: 219-226.
- 35 - Manthripragada AD, Costello S, Cockburn MG, Bronstein JM, Ritz B. Paraoxonase 1 (PON1), agricultural organophosphate exposure and Parkinson disease. *Epidemiology* 2010; 21: 87–94.

- 36 - Metcalf RL. Structure-activity relationships for insecticidal carbamates. *Bulletin of World Health Organization* 1971; 4: 43-78.
- 37 - ANVISA. 2009a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico D13: dichlorvos. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0b1c568040c6e3988751e7ce64477fe7/d13.pdf?MOD=AJPERES>. updated in: aug 2009.
- 38 - Lu FC. A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by the World Health Organization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1995; 21: 351-364.
- 39 - USEPA. 1994. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System Database (IRIS), Washington, DC.
- 40 - EFSA. 2005a. European Food Safety Agency. Draft Assessment Report (DAR): Dichlorvos vol. 1; Rome, Italy.
- 41 - ANVISA. 2009b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico D10: diazinona. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/df3e8780411f2e31bee2bf5fb61213ea/D10++Diazinona.pdf?MOD=AJPERES>. updated in: aug 2009.
- 42 - FAO/WHO. 2004. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Pesticide Residues in Food 2003: Evaluations For Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. *JMPR* 2003; Rome, Italy.
- 43 - ATSDR. 2001. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Diazinon. Toxicological Profile 86; Atlanta, USA.
- 44 - EFSA. 2005b. European Food Safety Agency. Draft Assessment Report (DAR): Diazinon vol. 1; Lisbon, Portugal.
- 45 - ANVISA. 2009c. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico C20: clorpirifós. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c9d402004119dd3a9d83bdb6afdc46c4/C20++Clorpirif%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>. updated in: aug 2009.
- 46 - WHO/FAO. 1999. World Health Organization/Food and Agriculture Organization. Pesticide Residues in Food 1999: Evaluations For Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. *JMPR* 1999; Rome, Italy.

- 47 - ATSDR. 1997b. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Chlorpyrifos. Toxicological Profile 84; Atlanta, USA.
- 48 - FAO. 2006a. Food and Agriculture Organization. Specifications and evaluations for agricultural pesticides: Chlorpyrifos. Rome, Italy.
- 49 - ANVISA. 2009d. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico C03: Carbaril. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/93b39980405ac42ab5f7f7330f10004b/C03++Carbaril.pdf?MOD=AJPERES>. updated in: aug 2009.
- 50 - FAO. 2006b. Food and Agriculture Organization. Specifications and evaluations for agricultural pesticides: Carbaryl. Rome, Italy.
- 51 - EFSA. 2005c. European Food Safety Agency. Draft Assessment Report (DAR): Carbaryl vol. 1; Madrid, Spain.
- 52 - ANVISA. 2009e. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico C06: Carbofurano. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b5fd6a004119a559bbc1bf65e55ae87b/C06++Carbofurano.pdf?MOD=AJPERES>. Updated in: aug 2009.
- 53 - USEPA. 1984. United States Environmental Protection Agency. Chemical Fact Sheet number 24: Carbofuran. Insecticide/Rodenticide Branch. Registration Division (TS-767). Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- 54 - EFSA. 2004. European Food Safety Agency. Draft Assessment Report (DAR): Carbofuran vol. 1; Brussels, Belgium.
- 55 - USEPA. 2009. United States Environmental Protection Agency. Carbofuran; Final Tolerance Revocations; Final Rule. 40 CFR Part 180 [EPA-HQ-OPP-2005-0162; FRL-8413-3]. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. February 2009. Available at: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/carbofuran/carbofuran_noic.htm.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a análise da inibição seletiva, a atividade nos extratos de membranas eritrocitárias, obtidos pela metodologia desenvolvida, pode ser atribuída à AChE;

A determinação da sua atividade a partir de amostras congeladas não compromete sua sensibilidade aos pesticidas estudados e proporciona o armazenamento das amostras para análise em laboratórios distantes dos locais de coleta. Além disso, o ensaio utilizado permitiu que níveis relevantes de inibição enzimática fossem detectados em concentrações de pesticidas abaixo da maioria das Ingestões Diárias Aceitáveis (IDAs) adotadas para os mesmos em legislações nacionais e internacionais;

Tendo em vista esses resultados, a acetilcolinesterase eritrocitária humana extraída e determinada pelo método ora proposto constitui-se em ferramenta promissora para utilização em programas de monitoramento ambiental e ocupacional de pesticidas organofosforados e carbamatos.

6. ANEXOS

ANEXO A – Artigo publicado na revista *Human & Experimental Toxicology*

Article



Human and Experimental Toxicology
32(8) 837–845
© The Author(s) 2013
Reprints and permission:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0960327112468906
het.sagepub.com



Development of a method for extraction and assay of human erythrocyte acetylcholinesterase and pesticide inhibition

AG Linhares¹, CRD Assis¹, MT Siqueira²,
RS Bezerra¹ and LB Carvalho Jr¹

Abstract

A method of extracting membranes from red blood cells (RBCs) is described, which were in turn used to assay acetylcholinesterase (AChE) activity. The evidence for the enzyme activity was established by selective inhibition using 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide, tetraisopropyl pyrophosphoramidate and neostigmine. Blood samples were exposed to three organophosphorus (dichlorvos, chlorpyrifos and diazinon) and two carbamate (carbaryl and carbofuran) pesticides. Afterwards AChE activities in RBC membranes were determined. The concentrations capable to inhibit the enzyme activity by 50% (IC₅₀) for the pesticides were 10.66 μM (dichlorvos), 21.42 μM (chlorpyrifos), 109.98 μM (carbaryl) and 5.44 μM (carbofuran). The results related to 20% enzyme inhibition (level used in the estimation of threshold limits for anticholinesterase compounds) were below those acceptable daily intake values enacted by relevant national and international regulations. These results suggest that the proposed AChE extraction from RBC and assay could be a suitable method for monitoring occupational exposure to pesticides.

Keywords

Acetylcholinesterase; organophosphorus; carbamate; erythrocyte; biomarker

Introduction

Although pesticides have provided an increase in agricultural productivity, enabling high-quality food at lower costs, the improper use of these chemicals can bring harm to human health and negative impact to environment.¹ It is estimated that only 0.1% of the applied pesticides in fact reach the target animals, whereas the rest spreads throughout the environment. The financial costs saved by pest control are partially wasted through the environmental and public health problems caused by pesticides.² Agricultural workers are exposed to high risks of poisoning due to intense contact with pesticides. Such compounds can cause adverse effects on central and peripheral nervous system, immune system and are carcinogenic. The most used classes of insecticides and source of occupational poisoning are the organophosphates (OPs) and carbamates (CBs). In 2007, OPs accounted for 35% of all insecticides used in the United States.³

OPs and CBs are typical inhibitors of the cholinesterases (ChEs), and there are two accepted types of these enzymes. First, the enzyme acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), that occurs in brain, ganglia of the autonomic nervous system and motor end plates, is produced by the neurons and it plays the primary function in the nerve impulse modulation at the

¹ Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Corresponding author:

Luiz B. de Carvalho Jr, Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil.
Email: lbcj@hotmail.com.br

synaptic clefts. Another form of AChE is observed in the plasma membrane of red blood cells (RBCs), which is synthesized during the process of bone marrow hematopoiesis and has a half-life of approximately 120 days, the same as that of RBCs. Second, the enzyme butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is synthesized in liver and predominates in plasma, glial cells, pancreas and the walls of digestive tract and presents an *in vivo* half-life of 7 days.⁴⁻⁶

OPs and CBs are widely used in developing countries, predominantly in agriculture, for pest control and public health campaigns to eradicate disease vectors.⁷⁻⁹ In the developing world, the negative consequences of pesticide usage are conditioned by factors closely related, such as the mishandling of these substances, the high toxicity of some products, the lack of protective equipment and the poor surveillance. This situation is aggravated by low cultural and socioeconomic status for most of these workers. Markedly in these countries, the monitoring of occupational exposure to such compounds presents problems in rural locations, especially the distance of testing laboratories where there is no appropriate infrastructure for the analysis.¹⁰⁻¹² Here, we developed a method for the extraction and assay of human RBC AChE and evaluated the sensitivity and the specificity of the method to measure the exposure to pesticides, comparing the results of inhibition with relevant national and international regulations in force.

Materials and methods

Reagents and materials

Acetylthiocholine iodide, tetraisopropyl pyrophosphoramide (Iso-OMPA), 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), neostigmine bromide, bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), tris (hydroxymethyl) aminomethane and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade dichlorvos (98.8%), diazinon (99.0%), chlorpyrifos (99.5%), carbofuran (99.9%) and carbaryl (99.8%) were obtained from Riedel-de-Haën, Pestanal[®] (Seelze, Germany). A Bio-Rad xMark (Hercules, California, USA) microplate spectrophotometer was used.

Methods

Blood samples. The blood samples were collected (9 mL) from healthy students ($n = 22$), who were not exposed to pesticides by venepuncture and gentle hand shaking and the blood samples were homogenized with 10% EDTA (100 μ L). These individuals were previously interviewed regarding the occurrence of diseases that could interfere with the activity of the enzyme: pregnancy, anemia, hemorrhagic events and reticulocytosis. Furthermore, they previously agreed to participate in this research approved by the Ethical Committee of The Health Science Centre of the Federal University of Pernambuco, Brazil (protocol number 0158.0.172.000-09).

Sample processing and enzyme extraction. Aliquots (1.8 mL) of whole blood were incubated for 60 min with 200 μ L solutions of each pesticide prepared with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.15 M sodium chloride (Tris-buffered saline (TBS) buffer). The pesticides used included the OPs (dichlorvos, diazinon and chlorpyrifos) and the CB (carbaryl and carbofuran). The pesticides were first dissolved in DMSO and diluted with distilled water to attain 13 solutions at final concentrations ranging from 0.01 to 100 μ g/mL in 2% (v/v) DMSO.

Modifying Oliveira-Silva et al.¹¹ method, the whole blood samples were also incubated with 200 μ L of TBS only and TBS + 2% DMSO instead of the pesticides as controls. The samples were then centrifuged at 2,000g for 4 min to obtain plasma and erythrocyte fractions. They were separated and the aliquots of 500 μ L of RBC were resuspended in 4.5 mL of lysis buffer (0.01 M Tris-HCl pH 7.6 without salt). The samples were kept at -20°C for 24 h for RBC lysis. After lysis, the RBC samples were centrifuged three times at 4,000g for 15 min, discarding the supernatant after each centrifugation. Afterwards the pellet (RBC membranes or 'ghost' suspension) was resuspended in 500 μ L of enzymatic assay buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.4). Aliquots of the RBC membrane controls were also used to characterize RBC AChE selective inhibition.

Enzyme activity for selective inhibition. Samples of the RBC membranes from controls were exposed to selective inhibitors: BW284c51 for AChE, Iso-OMPA for BChE and neostigmine bromide as total ChEs inhibitor. The samples (10 μ L) were kept inside the microplate wells and exposed to each inhibitor (10 μ L) at five different concentrations ranging from 0.001 to

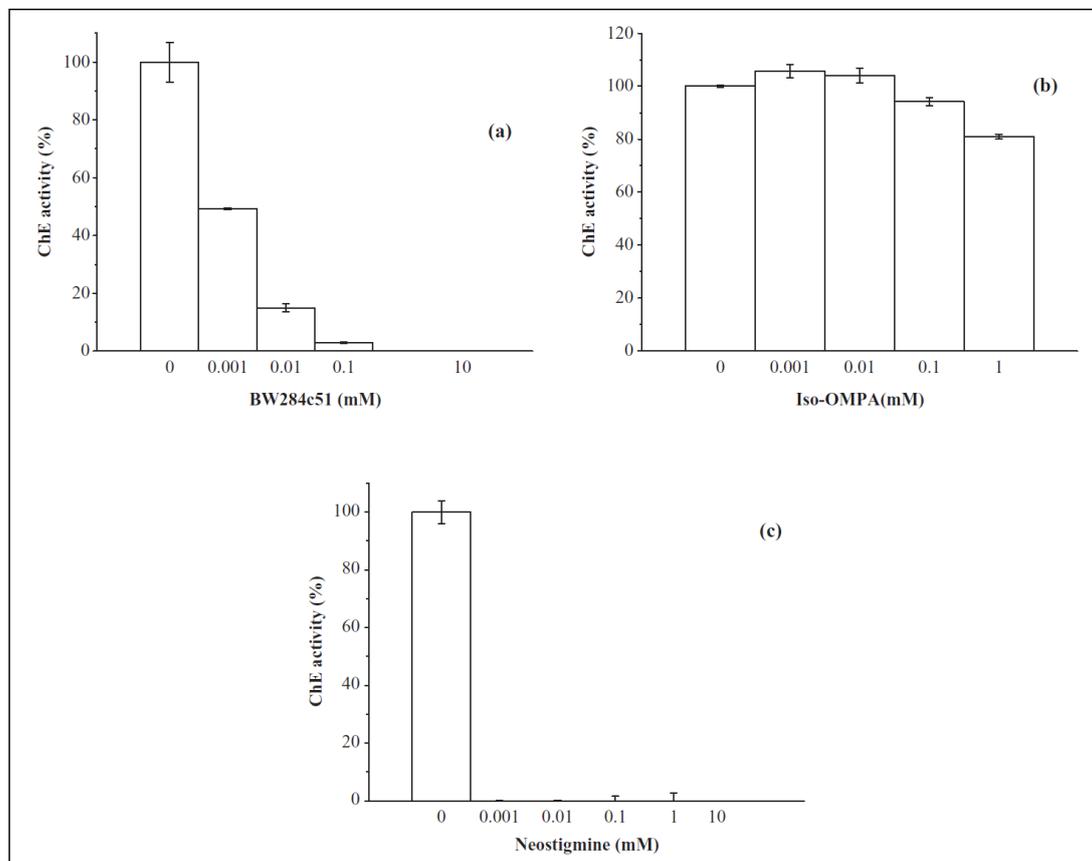


Figure 1. Effect of (a) BW284c51, (b) Iso-OMPA and (c) neostigmine bromide from 0.001 to 10 mM in frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase; Iso-OMPA: tetraisopropyl pyrophosphoramidate; BW284c51: 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide.

10 mM for 60 min. After incubation, the enzyme activity was determined using Ellman method¹³ with modification by Assis.¹⁴ Briefly, 0.25 mM DTNB (200 μ L) prepared in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 was added to the incubated mixture and the reaction was started by the addition of 62 mM acetylthiocholine iodide (20 μ L). Enzyme activity was determined by reading the absorbance increase at 405 nm for 180s. A unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of converting 1 μ M of substrate per minute. A blank was prepared with the assay buffer instead of ghost suspension sample. All these assays were carried out in quadruplicates.

Enzyme activity in blood samples exposed to pesticides. The activity of membrane RBC AChE extracted from whole blood samples incubated with pesticides and

controls were determined by mixing 200 μ L of DTNB with 20 μ L of ghost samples and finally adding 20 μ L of the substrate acetylthiocholine iodide. The reaction was carried out and followed spectrophotometrically, similarly as described in the section on selective inhibition. All these assays were carried out in quadruplicates.

Protein determination. Protein content in the RBC membrane preparations was estimated according to Sedmak and Grossberg,¹⁵ using bovine serum albumin as a standard. All tests were performed at room temperature (25°C) in triplicates.

Estimation of IC_{20} , IC_{50} and K_i . The enzymatic activity values obtained from selective inhibitors and pesticide exposition were plotted against selective

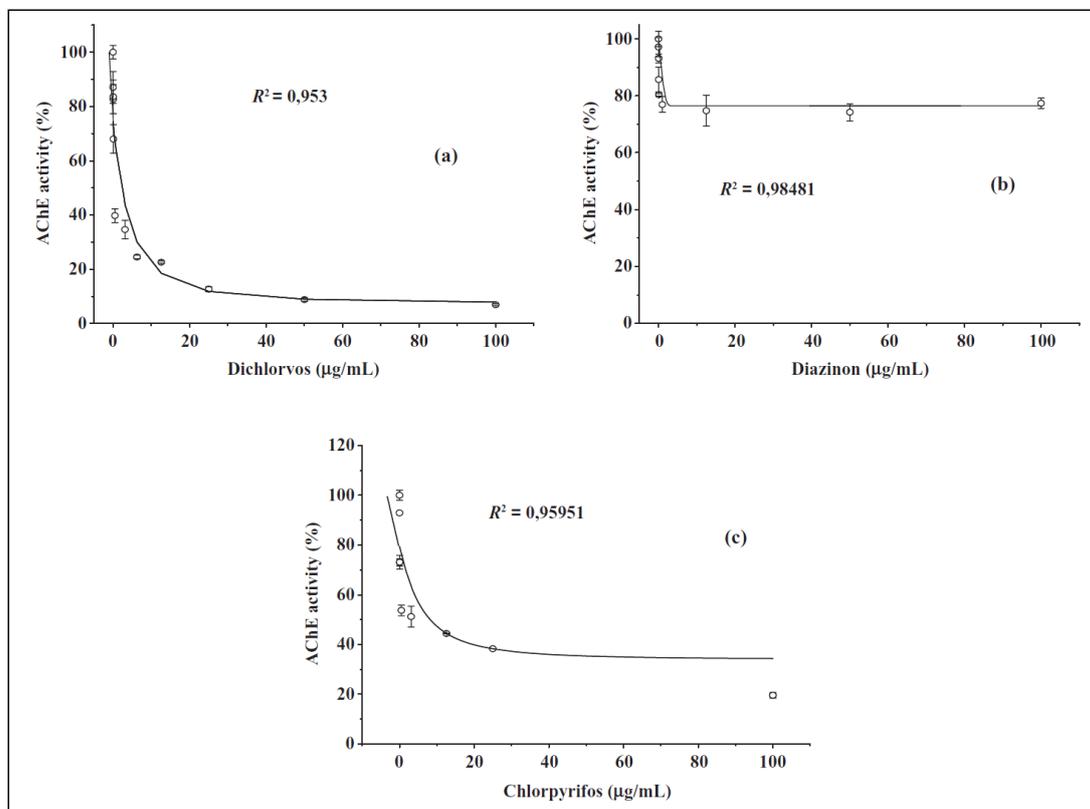


Figure 2. Effect of (a) dichlorvos, (b) diazinon and (c) chlorpyrifos from 0.01 to 100 µg/mL on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase.

inhibitor or insecticide concentration. From the curves generated by nonlinear regression fitting (using MicroCal™ Origin® Version 8.0), the IC_{50} and IC_{20} (concentrations capable of inhibiting the enzyme activity by 50% and 20%, respectively) were estimated for each selective inhibitor or pesticide. Their respective inhibition constants (K_i) were calculated using the Cheng and Prusoff equation.¹⁶

Comparative study of enzyme inhibition in accordance with current regulations. The IC_{20} found for the pesticides was converted from microgram per milliliter to milligram per kilogram body weight per day (acceptable daily intake (ADI) unit) for comparison with the results reported by specialized agencies.

Sensitivity and specificity of the method. The ability to correctly detect whether the samples were exposed to each pesticide was analyzed by measuring the

sensitivity and specificity of the test according to Glaser¹⁷ and using 20% of enzymatic inhibition as a cutoff.¹⁸

Results

AChE present in the RBC membrane preparation was strongly inhibited (about 50%) by its specific inhibitor BW284c51 at 0.001 mM (Figure 1(a)), whereas under Iso-OMPA exposure (BChE specific inhibitor) its activity was only 19% reduced at 1 mM (Figure 1(b)). On the other hand, neostigmine, a very potent inhibitor of total ChEs, abolished the enzyme activity even at 0.001 mM (Figure 1(c)). These results show the ability of the enzyme extraction method in getting just the fraction of AChE from RBC. The IC_{50} and K_i values for BW284c51 and neostigmine were 0.92 µM and 0.0054 µM; and 0.30 µM and 0.0018 µM, respectively. It was not possible to estimate these parameters for Iso-OMPA.

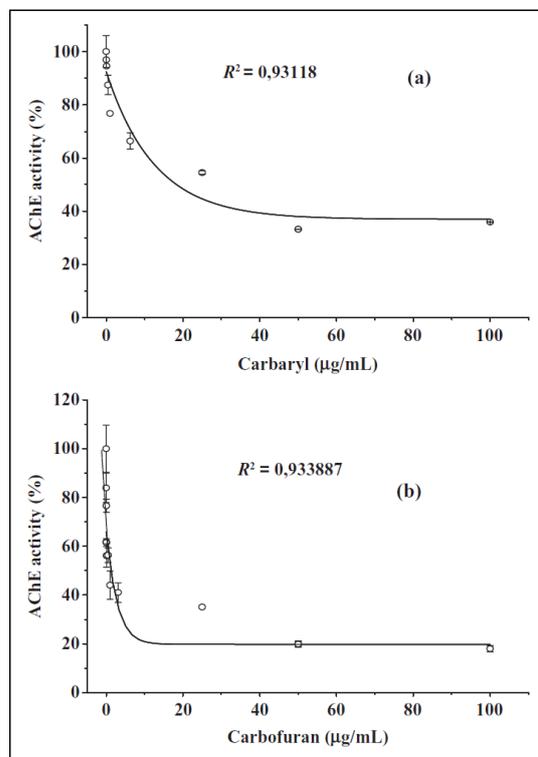


Figure 3. Effect of (a) carbaryl and (b) carbofuran from 0.01 to 100 µg/mL on frozen blood samples of human RBC AChE activity. RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase.

The effects of dichlorvos, diazinon and chlorpyrifos (OPs) as well as carbaryl and carbofuran (CBs) on RBC membrane AChE are displayed in Figures 2 and 3, respectively. The results show that diazinon is a less effective inhibitor among the five investigated pesticides, whereas dichlorvos and carbofuran were the most powerful inhibitors. These findings are corroborated by their IC_{20} , IC_{50} and K_i (Table 1) estimated from the curves. The parameter IC_{20} converted to milligram per Kg body weight per day was confronted with the values of ADI found in national and international specific legislation in Table 1.

The results of sensitivity and specificity for each pesticide are listed in Table 2. Sensitivity ranged from 75% (diazinon) to 100% (chlorpyrifos and carbaryl), and specificity from 63.6% (carbofuran) to 83.3% (dichlorvos).

Discussion

The mechanism of action of OPs and CBs occurs through binding to the esteratic site of enzymes with

phosphorylation and carbamoylation, respectively.^{19,20} Inhibition by the organophosphorus compounds tends to be irreversible if untreated.⁷ The inhibition by CBs is reversible and the recovery of the enzyme may take several minutes to hours.⁸

The monitoring of pesticides based on blood ChE inhibition recommended by World Health Organization (WHO)^{21,22} requires fresh blood samples of total ChE using the methods of Edson²³ and Ellman¹³ (adapted by WHO)²² or RBC AChE by George and Abernethy.²⁴ The disadvantages of these methods are the nondiscriminating use of both blood enzyme activities in case of using total ChE samples and the less accuracy by hemoglobin interference in the case of those which use RBC AChE samples without complete red cell lysis and centrifugation. The method proposed by Oliveira-Silva et al.¹¹ not only uses RBC AChE but also allows the freezing of samples for further analysis in an appropriate place without colorimetric interactions with hemoglobin.

Several works chose RBC AChE instead of BChE for many reasons, as follows: (1) determination of inter- and intraindividual variation in both ChE activities, which was considered critical for a blood esterase monitoring program. The class of AChEs is more homogeneous in terms of their primary structure than the class of BChEs,²⁵ and RBC AChE activity was pointed to be less variable than BChE^{26,27}; (2) the first one is more closely correlated with the AChE activity from nervous system²⁸; (3) more stability in frozen blood samples: 7 days against 3 days for BChE¹¹; (4) BChE spontaneous recovery of inhibited forms are faster than AChE.²⁶ In order to perform a successful monitoring program, it should be taken into account that some conditions other than pesticide exposure can change blood ChEs activities, hindering the evaluation and interpretation of results from studies. BChE activity can be decreased by liver diseases, malnutrition, alcoholism, nephritic syndrome, pregnancy, contraceptive pills and metoclopramide, whereas RBC AChE activity is altered by pregnancy, anemia, hemorrhagic events and reticulocytosis. Other factors that may result in misinterpretation of ChE levels are collection, improper processing and transportation of samples and laboratory errors.^{29,30} In addition, considering each person as his or her own control, measures should be taken to minimize intraindividual variation by collecting samples in periods of growing seasons before and after pesticide applications.

The efficiency of the proposed method to extract the membrane RBC AChE was shown by selective

Table 1. ADI, IC₂₀ and IC₅₀ for human RBC AChE referring to pesticides under study.

Pesticide	ADI (mg/kg bw/day)	IC ₂₀ (mg/kg bw/day)	IC ₂₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
Dichlorvos	0.004 ³⁷ 0.004 ³⁸ 0.003 ⁹ 0.0005 ³⁹ 0.0008 ⁴⁰	0.0019	0.135	10.66	0.131
Diazinon	0.002 ⁴¹ 0.002 ⁴² 0.0007 ⁴³ 0.0002 ⁴⁴	0.0076	0.394	— ^a	—
Chlorpyrifos	0.01 ⁴⁵ 0.01 ⁴⁶ 0.001 ⁴⁷ 0.01 ⁴⁸	0.002	0.085	21.42	0.262
Carbaryl	0.003 ⁴⁹ 0.008 ⁵⁰ 0.008 ⁴² 0.0075 ⁵¹	0.0033	4.96	109.98	1.35
Carbofuran ^b	0.002 ⁵² 0.002 ⁴² 0.005 ⁵³ 0.001 ⁵⁴	0.0019	0.135	5.44	0.066

RBC: red blood cell; AChE: acetylcholinesterase; IC₂₀ and IC₅₀: concentrations capable to inhibit the enzyme activity by 20% and 50%, respectively; ADI: acceptable daily intake.

^aThe maximum concentration used in the assays did not inhibit beyond 50%.

^bIn the process of cancelation of all licenses for use in food production in the United States.

Table 2. Sensitivity and specificity^a of the human erythrocyte AChE and pesticide inhibition method in relation to pesticides under study.

Pesticide	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Dichlorvos	90.9	83.3
Diazinon	75.0	80.0
Chlorpyrifos	100.0	66.7
Carbaryl	100.0	75.0
Carbofuran	88.89	63.6

AChE: acetylcholinesterase.

^aAccording to Glaser.¹⁷

inhibition by BW284c51, whereas Iso-OMPA (BChE specific inhibitor) did not impair significantly the activity at low concentrations. Also, regarding the inhibition effect of BW284c51 and neostigmine on membrane RBC AChE is worthwhile to register that the dissociation rate (K_i) of neostigmine was threefold slower than that of BW284c51. One of the more remarkable differences between AChE and BChE is the smaller cavity of AChE active site, lined by six aromatic amino acid residues that prevent the entrance of the selective BChE inhibitors and substrates.³¹

Once established that membrane RBC AChE was properly extracted the whole blood was exposed to pesticides, simulating intoxication by them in order to evaluate the enzyme activity reduction as measure of this contact. The results showed the highest inhibitory action on the enzyme by dichlorvos compared with diazinon and chlorpyrifos. Dichlorvos is already bioactive as an oxon, whereas the thion form (diazinon and chlorpyrifos form) needs biotransformation to enhance its toxic action.^{7,32} However, another feature that interferes in the toxicokinetic of OP pesticides and that was decisive in the results is their specific lipophilicity. The most lipophilic compounds are rapidly absorbed and accumulated in fat and this contributes to the reduction in the primary effects of these pesticides (ChEs inhibition) while increasing secondary effects in other biomolecules. Phosphorothioates (diazinon and chlorpyrifos) are more lipophilic than phosphates (dichlorvos).³² In addition, serum oxonases seem to be more effective in the hydrolysis of diazinon and chlorpyrifos.^{33–35} Moreover, according to Rosenberry,²⁵ AChE is more sensitive to small acyl-chain size condition fulfilled by dichlorvos compared with diazinon and chlorpyrifos.

Between the investigated CBs, carbofuran showed to be more toxic to membrane RBC AChE than carbaryl. This difference may be attributed to the 2,2-dimethylbenzofuranyl ring (carbofuran) that is more reactive than the naphthyl ring (carbaryl) when interacting with residues in the AChE active center.³⁶ The controls with and without DMSO did not present significant difference.

The IC₂₀ is the threshold limit to consider the presence of an anticholinesterasic compound, whereas the IC₅₀ represents the point at which clinical signs and symptoms appear and death occurs after 90% inhibition.¹⁸ Here, the IC₂₀ values were converted into ADI unit that stands for the highest concentration causing no effect (no-observed-adverse-effect-level) on the most susceptible species of mammal in long-term studies (chronic exposure).

To verify the possibility of using membrane RBC AChE extracted by the method proposed here as a biomarker for pesticides exposure, the IC₂₀ values of each one (Table 1) should be below their respective ADIs. Thus, the values of IC₂₀ for all the studied pesticides were lower than those recommended by WHO,^{42,46} Food and Agriculture Organization,^{38,48,50} Agency for Toxic Substances and Disease Registry,^{9,43,47} European Food Safety Agency,^{40,44,51,54} United States Environmental Protection Agency^{39,53} and ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency)^{37,41,45,49,52} except diazinon. It is noteworthy to mention that carbofuran presented low IC₂₀ value and has been outlawed nowadays in the United States for use in food farming.⁵⁵

The cutoff of 20% inhibition of AChE activity was chosen to evaluate the sensitivity and specificity, according to several institution recommendations as mentioned above. Sensitivity values for the five investigated pesticides were above 80%, except for diazinon, whereas all the specificity values were above 60% (Table 2). Higher values would be found if the used cutoff was 50% inhibition but at this point clinical signs of poisoning by anti-ChE agents appear¹⁸ and the present proposed procedure would lose its usefulness.

Conclusions

The results of the extraction method can be ascribed to RBC AChE according to selective inhibition. The used enzymatic assay allowed relevant levels of inhibition to be achieved, and they were at pesticide concentrations below the majority of ADIs adopted for the analyzed OPs and CB insecticides in foods

by national and international regulations. Regarding this, the method showed sufficient *in vitro* accuracy to be a promising tool in human monitoring programs for occupational exposure to such pesticides and can be useful for sample collections in locations far from the laboratories.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), Petróleo do Brasil S/A (PETROBRAS), Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP/PR), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq).

Funding

Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support (Grant number: IBPG-0523-2.08/11 FACEPE).

References

1. Silva JM, Novato-Silva E, Faria HP and Pinheiro TMM. Pesticides and work: a dangerous combination for the Brazilian agricultural workers health. *Ciência e Saúde Coletiva* 2005; 10: 891–903.
2. Hart KA, Pimentel D. Environmental and economic costs of pesticide use. In: Pimentel D (ed) *Encyclopedia of pest management*. New York, NY: Marcel Dekker, 2002, pp. 237–239.
3. USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Pesticides industry sales and usage 2006 and 2007 market estimates*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2011. Available at: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf. (accessed June 2011).
4. Chatonnet A and Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 1989; 260: 625–634.
5. Çokugras AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 2003; 28: 54–61.
6. Taylor P. The cholinesterases. *J Biol Chem* 1991; 266: 4025–4028.
7. WHO (World Health Organization). *Organophosphorus insecticides: a general introduction. Environmental health criteria 63*. Geneva, Switzerland: WHO, 1986.
8. WHO (World Health Organization). *Carbamate insecticides: a general introduction. Environmental Health Criteria 64*. Geneva, Switzerland: WHO, 1986.

9. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological profile for dichlorvos. Toxicological profile 88*. Atlanta, USA: ATSDR, 1997.
10. Magnotti RA Jr, Eberly JP, Quarm DE and McConnell RS. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clin Chem* 1987; 33: 1731–1735.
11. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Inacio AF, Meyer A, Sarcinelli PN, Mattos RC, et al. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19: 173–177.
12. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Peres F, Sarcinelli PN, Costa Mattos RCO, et al. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Revista de Saude Publica* 2001; 35: 130–135.
13. Ellman GL, Courtney KD, Andres V and Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.
14. Assis CRD, Castro PF, Amaral IPG, Maciel Carvalho EVM, Carvalho LB Jr and Bezerra RS. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environ Toxicol Chem* 2010; 29: 2243–2248.
15. Sedmak JJ and Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 1977; 79: 544–552.
16. Cheng Y and Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099–3108.
17. Glaser AN. *High-yield biostatistics*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
18. FAO (Food and Agriculture Organization). *Pesticides in food report 2007. FAO plant production and protection paper 191*. Rome, Italy: FAO, 2007.
19. Fukuto R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990; 87: 245–254.
20. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev* 1987; 87: 955–979.
21. WHO (World Health Organization). *Expert committee on the safe use of pesticides in public health*. Technical Report Series 356. Geneva, Switzerland: WHO, 1967.
22. WHO (World Health Organization). *Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity*. WHO/VBC/84.888. Geneva, Switzerland: WHO, 1984.
23. Edson EF. Blood tests for users of OP insecticides. *World Crops* 1958; 10: 49–51.
24. George PM and Abernethy MH. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin Chem* 1983; 29: 365–368.
25. Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Area Mol Biol* 1975; 43: 103–218.
26. Nigg HN and Knaak JB. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000; 163: 29–111.
27. Lefkowitz LJ, Kupina JM, Hirth NL, Henry RM, Noland GY, Barbee JY, et al. Intraindividual stability of human erythrocyte cholinesterase activity. *Clin Chem* 2007; 53: 1358–1363.
28. Tinoco-Ojanguren R and Halperin DC. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* 1998; 53: 29–35.
29. Furman J, Boiko P, Keifer M, Weyrauch K, Hanks C. Cholinesterase Monitoring for Agricultural Pesticide Handlers; Guidelines for Health Care Providers in Washington State. January 2006. Available at: <http://depts.washington.edu/opchild/pdf/ProvidersGuidelines.pdf>. (accessed December 2012).
30. Del Prado-Lu JL. Pesticide exposure, risk factors and health problems among cutflower farmers: a cross sectional study. *J Occup Med Toxicol* 2007; 2: 9.
31. Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié J, et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10827–10831.
32. Vale JA. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol Lett* 1998; 102–103: 649–652.
33. Li WF, Furlong CE and Costa LG. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40: 337–346.
34. Li WF, Furlong CE and Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995; 76: 219–226.
35. Manthripragada AD, Costello S, Cockburn MG, Bronstein JM and Ritz B. Paraoxonase 1 (PON1), agricultural organophosphate exposure and Parkinson disease. *Epidemiology* 2010; 21: 87–94.
36. Metcalf RL. Structure–activity relationships for insecticidal carbamates. *Bull World Health Organ* 1971; 4: 43–78.
37. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Índice monográfico D13: diclorvos. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7c26ef0047458f8c9e3dc3fbc4c6735/d13.pdf?MOD=AJPERES> (accessed August 2009).

38. Lu FC. A review of the acceptable daily of pesticides assessed by the world health organization. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995; 21: 351–364
39. USEPA. *Environmental protection agency. Integrated risk information system database (IRIS)*, Washington, DC, USA: USEPA, 1994.
40. EFSA (European Food Safety Agency). *Draft Assessment Report (DAR): Dichlorvos*. Vol. 1. Rome, Italy: EFSA, 2005 (Accessed December 2009).
41. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Índice monográfico D10: diazinona. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cf8f420047458f7898bfdc3fbc4c6735/D10++Diazinona.pdf?MOD=AJPERES> (accessed August 2009).
42. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Pesticide residues in food 2003: evaluations for food and agriculture organization of the United Nations. In: World Health Organization. *JMPR 2003*, Rome, Italy, 2004.
43. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological profile for diazinon. Toxicological profile* 86. Atlanta, USA: ATSDR, 2001.
44. EFSA (European Food Safety Agency). *Draft Assessment Report (DAR): diazinon*. Vol. 1. Lisbon, Portugal: EFSA, 2005 (accessed December 2009).
45. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Índice monográfico C20: clorpirifós. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b822400047458d519692d63fbc4c6735/C20++Clorpirif%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES> (accessed August 2009).
46. WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization). Pesticide residues in food 1999: evaluations for food and agriculture organization of the United Nations. In: *World Health Organization. JMPR 1999*, Rome, Italy, 1999.
47. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Agency for toxic substances and disease registry. toxicological profile for chlorpyrifos. Toxicological profile* 84. Atlanta, GA, USA: ATSDR, 1997.
48. FAO (Food and Agriculture Organization). *Specifications and evaluations for agricultural pesticides: chlorpyrifos*. Rome, Italy: FAO, 2006.
49. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Índice monográfico C03: carbaril. Available at <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0f12e900474575dd83edd73fbc4c6735/C03++Carbaril.pdf?MOD=AJPERES> (accessed August 2009).
50. FAO (Food and Agriculture Organization). *Specifications and evaluations for agricultural pesticides: carbaryl*. Rome, Italy: FAO, 2006.
51. EFSA (European Food Safety Agency). *Draft Assessment Report (DAR): Carbaryl*. Vol. 1. Madrid, Spain: EFSA, 2005 (accessed December 2009).
52. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Índice monográfico C06: carbofurano. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/778da6004745759c839bd73fbc4c6735/C06++Carbofurano.pdf?MOD=AJPERES> (accessed August 2009).
53. USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Chemical fact sheet number 24: carbofuran*. Washington, DC, USA: Insecticide/Rodenticide Branch, Registration Division (TS-767), Environmental Protection Agency, 1984.
54. EFSA (European Food Safety Agency). *Draft Assessment Report (DAR): carbofuran*. Vol. 1. Brussels, Belgium: EFSA, 2004 (accessed December 2009).
55. USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Carbofuran; Final Tolerance Revocations; Final Rule. 40 CFR Part 180 [EPA-HQ-OPP-2005-0162; FRL-8413-3]*. Washington, DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency, 2009. Available at: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/carbofuran/carbofuran_noic.htm. (accessed July 2011).

ANEXO B – Formulário de investigação de doenças e fatores capazes de interferir na atividade da AChE eritrocitária.

Página: 1 de 2

<p>Projeto: ACETILCOLINESTERASE ERITROCITÁRIA HUMANA COMO BIOMARCADOR NA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS.</p> <p>FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS</p>
--

Formulário Nº		Data: ____/____/____	
Entrevistador			
Nome do voluntário		Data de Nascimento ____/____/____	
RG	Órgão emissor	Sexo Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/>	
Endereço			
Município		UF	
Utiliza ou utilizou pesticidas domésticos?		SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>	
Utilizou algum EPI durante as aplicações do pesticida?		SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>	
Quando foi a última vez que utilizou pesticidas?			
Quais pesticidas utilizou nesse período?			
Quantas vezes utilizou?			
Você foi o(a) responsável pela preparação dos pesticidas?		SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/>	
Onde armazena os pesticidas?		Casa <input type="checkbox"/> Local específico <input type="checkbox"/>	
Como você descarta as embalagens?			
Bebe ou fuma?			
Utiliza alguma medicação? Qual é a dosagem.			

Doenças ou estados fisiológicos que interferem na atividade colinesterásica

Página: 2 de 2

Doenças/condição fisiológica						Estados fisiológicos
Leucemia	AIDS	Cirrose	Hepatite virótica	Anemias	Desnutrição	Gravidez
		A	A	A	A	A
		P	P	P	P	P
Casos na família						

A = atual; P = passado

Doenças ou estados fisiológicos que interferem na atividade colinesterásica (continuação)

Doenças/condição fisiológica				Estados fisiológicos/eventuais	
Talassemia	Necrose amebiana	Fígado cardíaco	Neoplasma maligno metastático	- Contraceptivos orais - Drogas anti-malária	
	A	A	A	A	A
	P	P	P	P	P
Casos na família					

A = atual; P = passado

Resultado de atividade enzimática

Enzima	Inib %	Inib %	Inib %	Média
Acetilcolinesterase				

Observações gerais

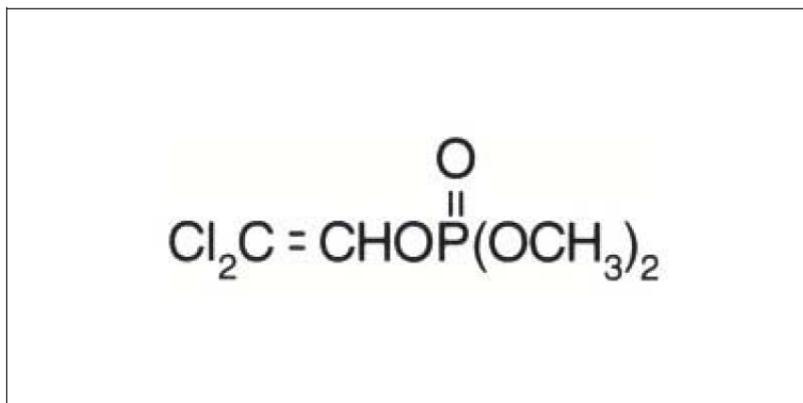
Data e local	
, de	de
Nome e assinatura do Técnico responsável	

ANEXO C - D13 – Diclorvós

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
D13	DICLORVÓS

D13 - Diclorvós

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: DICLORVÓS (dichlorvos)
- b) Sinonímia: SD 1750; OKO; OMS 14; UDVF; DDVP
- c) N° CAS: 62-73-7
- d) Nome químico: 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate
- e) Fórmula bruta: C₄H₇Cl₂O₄P
- f) Fórmula estrutural:



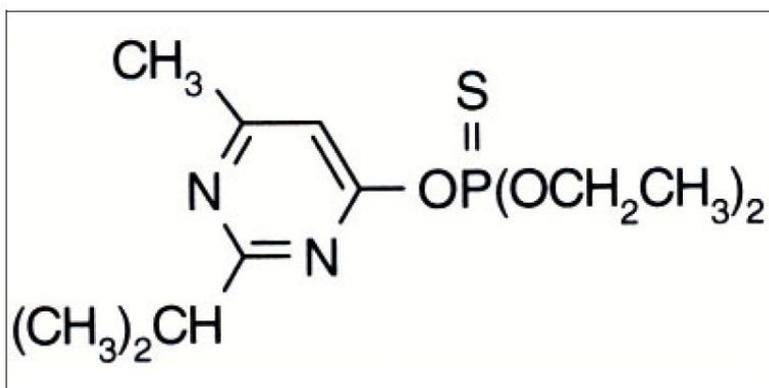
- g) Grupo químico: Organofosforado
- h) Classe: Inseticida
- i) Classificação toxicológica: Classe II
- j) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.
- Líquidos premidos ou não:
- | | |
|-------------------------------|---------------|
| Venda livre..... | 1 % p/p |
| Entidades especializadas..... | 2 % p/p |
| Isclas..... | 2 % p/p |
| Pós e granulados..... | 5 % p/p |
| Volatilizantes..... | não permitido |
- Jardinagem amadora:
- | | |
|--------------|-----------|
| Líquido..... | 0,1 % p/p |
|--------------|-----------|

ANEXO D - D10 – Diazinon

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
D10	DIAZINONA

D10 - Diazinona

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: DIAZINONA (diazinon)
- b) Sinonímia: AG-500; G 24 480
- c) N° CAS: 333-41-5
- d) Nome químico: O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate
- e) Fórmula bruta: C₁₂H₂₁N₂O₃PS
- f) Fórmula estrutural:



- g) Grupo químico: Organofosforado
- h) Classe: Inseticida e acaricida
- i) Classificação toxicológica: Classe II
- j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de citros e maçã.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Citros	Foliar	0,7	14 dias
Maçã	Foliar	0,5	14 dias

Resíduo não intencional(*)	LMR (mg/kg)
Carne (na gordura)	0,7

(*) Intervalo de segurança não determinado por tratar-se de resíduo estranho.

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,002 mg/kg p.c.

m) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.

- Líquidos premidos ou não:

Venda livre.....	1 % p/p
Entidades especializadas.....	2 % p/p
Pós e granulados.....	1 % p/p
Fumigantes.....	não permitido
Volatilizante.....	não permitido

Jardinagem amadora:

Líquido.....	0,1 % p/p
--------------	-----------

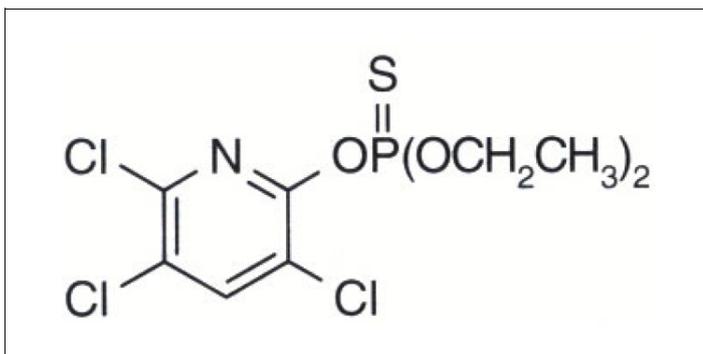
ANEXO E – C20 - Clorpirifós



ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
C20	CLORPIRIFÓS

C20 – Clorpirifós (Ingrediente ativo em reavaliação técnica)

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: CLORPIRIFÓS (chlorpyrifos)
- b) Sinonímia: Chlorpyriphos; Chlorpyrifos-ethyl
- c) N° CAS: 2921-88-2
- d) Nome químico: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate
- e) Fórmula bruta: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS
- f) Fórmula estrutural:



- g) Grupo químico: Organofosforado
- h) Classe: Inseticida, formicida e acaricida
- i) Classificação toxicológica: Classe II
- j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate(*) e trigo.

Aplicação localizada na cultura da banana (saco para proteção do cacho).

Aplicação no solo nas culturas de batata e milho.

Aplicação no controle de formigas, apenas na forma de isca granulada, conforme aprovação em rótulo e bula.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
----------	-----------------------------------	-------------	------------------------

Algodão	Foliar	0,5	21 dias
Banana	Localizada	0,01	7 dias
Batata	Foliar	1,0	21 dias
Batata	Solo	1,0	(1)
Café	Foliar	0,05	21 dias
Cevada	Foliar	0,1	14 dias
Citros	Foliar	2,0	21 dias
Feijão	Foliar	0,1	25 dias
Maçã	Foliar	1,0	14 dias
Milho	Foliar	0,1	21 dias
Milho	Solo	0,1	(1)
Pastagens	Foliar	2,0	13 dias
Soja	Foliar	0,01	21 dias
Sorgo	Foliar	0,01	21 dias
Tomate (*)	Foliar	0,5	21 dias
Trigo	Foliar	0,2	21 dias

Resíduo não intencional (*)	LMR (mg/kg)
Gordura de carne bovina	2,0
Gordura de carneiro e aves	0,2
Leite (na gordura)	0,01

(1) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego.

(*) Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.

(**) Intervalo de segurança não determinado por tratar-se de resíduo estranho.

OBS: LMR e o intervalo de segurança não estabelecidos para o controle de formigas.

l) Uso não agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação no controle de formigas, apenas na forma de isca granulada, conforme aprovação em rótulo e bula.

m) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,01 mg/kg p.c.

n) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado

Destinação de uso:

Venda livre	Concentração máxima permitida
Isca acondicionadas em porta-iscas	1% p/p

o) Uso como Preservante de Madeira - Uso exclusivo para tratamento de madeiras destinadas para dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas, com a finalidade de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.

p) Na reavaliação do ingrediente ativo clorpirifós, estabelecida pela Resolução-RDC nº 135 de 17/05/02, DOU de 22/05/2002, determinou-se a **manutenção apenas das modalidades de aplicação tratorizada, pivot central e aplicação aérea com GPS e sem o uso de “bandeirinhas”**.

q) De acordo com a Resolução-RDC n° 206 de 23/08/04, DOU de 24/08/04, determinou-se a suspensão do registro, bem como a não-concessão de novos registros, de produtos saneantes domissanitários à base do ingrediente ativo Clorpirifós, excluindo-se desta determinação somente aqueles registros destinados ao uso em iscas para combate de baratas, em embalagens portáteis dotadas de dispositivo de segurança para evitar a exposição de crianças.

ANEXO F - C03 - Carbaril

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
C03	CARBARIL

C03 – Carbaril

a) Ingrediente ativo ou nome comum: CARBARIL (carbaryl)

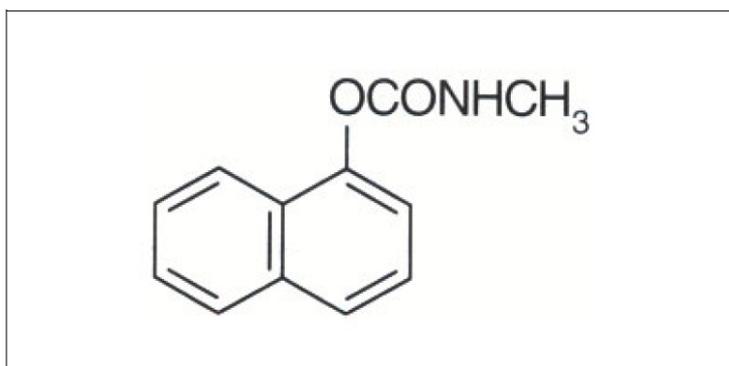
b) Sinonímia: NAC

c) N° CAS: 63-25-2

d) Nome químico: 1-naphthyl methylcarbamate

e) Fórmula bruta: C₁₂H₁₁NO₂

f) Fórmula estrutural:



g) Grupo químico: Metilcarbamato de naftila

h) Classe: Inseticida

i) Classificação toxicológica: Classe II

j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Abacaxi	Foliar	0,5	7 dias
Abóbora	Foliar	0,1	3 dias
Algodão	Foliar	0,05	15 dias
Alho	Foliar	0,2	14 dias
Banana	Foliar	0,2	14 dias
Batata	Foliar	0,1	30 dias

Cebola	Foliar	0,1	14 dias
Couve-flor	Floiar	0,02	14 dias
Feijão	Foliar	0,5	3 dias
Maçã	Foliar	2,0	7 dias
Pastagens	Foliar	100,0	5 dias
Pepino	Foliar	0,02	3 dias
Repolho	Foliar	0,2	14 dias
Tomate	Foliar	0,1	3 dias

Produtos de origem animal (*)	LMR (mg/kg)
Aves (parte comestível)	0,5
Aves (pele)	5,0
Carnes	1,0
Ovos (sem casca)	0,5

(*) Intervalo de segurança não determinado por tratar-se de resíduo estranho

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,003 mg/kg p.c.

m) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.

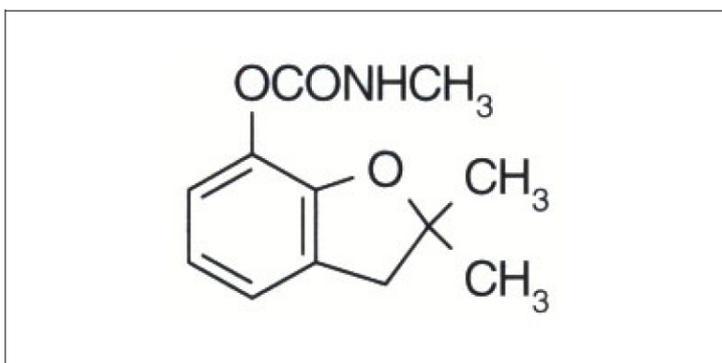
Entidades especializadas	2,5 % p/p
Pós e granulados	5,0 % p/p
Volatilizantes	não permitido

ANEXO G - C06 – Carbofuran

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
C06	CARBOFURANO

C06 – Carbofurano

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: CARBOFURANO (carbofuran)
- b) Sinonímia: -
- c) N° CAS: 1563-66-2
- d) Nome químico: 2,3-dihidro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbamate
- e) Fórmula bruta: $C_{12}H_{15}NO_3$
- f) Fórmula estrutural:



- g) Grupo químico: Metilcarbamato de benzofuranila
- h) Classe: Inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida
- i) Classificação toxicológica: Classe I
- j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação no solo nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo.

Aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e trigo.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Sementes	0,1	(1)
Algodão	Solo	0,1	45 dias
Amendoim	Solo	0,1	14 dias
Arroz	Sementes	0,2	(1)

Arroz	Solo	0,2	30 dias
Banana	Solo	0,1	30 dias
Batata	Solo	0,5	60 dias
Café	Solo	0,1	90 dias
Cana-de-açúcar	Solo	0,1	90 dias
Cenoura	Solo	0,5	60 dias
Feijão	Sementes	0,1	(1)
Feijão	Solo	0,1	75 dias
Fumo	Solo	UNA	
Milho	Sementes	0,1	(1)
Milho	Solo	0,1	30 dias
Repolho	Solo	1,0	90 dias
Tomate	Solo	0,1	60 dias
Trigo	Sementes	0,1	(1)
Trigo	Solo	0,1	30 dias

Resíduo não intencional (*)	LMR (mg/kg)
Leite, carne, gordura e sub-produtos de bovinos, caprinos,ovinos e suínos	0,05

U.N.A. = Uso Não Alimentar

(1) Intervalo de segurança não estabelecido devido à modalidade de emprego.

(*) Intervalo de segurança não especificado por tratar-se de resíduo estranho

OBS 1: O tratamento de sementes deverá ser feito na época do plantio por entidades oficiais ou particulares, devidamente registradas e credenciadas pelos órgãos competentes do Ministério da Agricultura, mediante o emprego de equipamentos apropriados.

OBS 2: os LMRs referem-se à soma de carbofurano e de 3-hidroxi-carbofuran, expressos como carbofurano.

l) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,002 mg/kg p.c.