



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

TÂMARA DE VASCONCELOS SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
COLINESTERASE ERITROCITÁRIA E PLASMÁTICA**

FORTALEZA

2015

TÂMARA DE VASCONCELOS SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
COLINESTERASE ERITROCITÁRIA E PLASMÁTICA**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica.

Orientador: Profa.Dra.Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S719p

Souza, Tâmara de Vasconcelos.

Padronização de métodos para determinação da atividade de colinesterase eritrocitária e plasmática / Tâmara de Vasconcelos Souza. – 2015.

40 f. : il.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho.

1. Inibidores da Colinesteras. 2. Espectrofotometria. 3. Potenciometria. I. Título.

CDD 543.55

TÂMARA DE VASCONCELOS SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
COLINESTERASE ERITROCITÁRIA E PLASMÁTICA**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Janete Eliza Soares de Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, pela Sua infinita bondade.

A minha família, por existir em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder-me a bênção de concluir minha graduação, pois sem Ele eu não teria forças suficientes para chegar ao fim desta jornada.

À minha família, que esteve sempre presente em todos os momentos, ajudando-me em tudo que foi preciso, sem eles este momento não seria tão especial e com tanta graça.

À minha orientadora e professora, Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho, que acolheu-me de prontidão durante esta etapa tão importante da graduação, com muita paciência e atenção.

Às professoras participantes da banca examinadora: professora Janete Eliza Soares de Lima e professora Renata de Sousa Alves por dedicarem tempo dando-me auxílio, colaborações e sugestões imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos maravilhosos que conheci, que foram verdadeiros presentes de Deus, por todos os momentos que passamos juntos, que não foram poucos, agradeço a todos vocês e espero que nossa amizade dure por toda a vida.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muitíssimo obrigada!

“Tudo tem começo e meio. O fim só existe para quem não percebe o recomeço”.

Luiz Gasparetto

RESUMO

No Brasil, as intoxicações agudas por praguicidas ocupam a terceira posição entre os agentes causais, ficando atrás apenas de medicamentos e animais peçonhentos. E, dentre os praguicidas, os inseticidas representam a maioria dos casos, estando entre eles os organofosforados e carbamatos, que são inibidores da enzima acetilcolinesterase. Para o diagnóstico da intoxicação aguda e crônica dos trabalhadores é importante realizar a determinação da atividade da enzima. Logo, o trabalho tem como objetivo padronizar as metodologias necessárias para a determinação das colinesterases eritrocitária e plasmática pelos métodos espectrofotométrico e potenciométrico e realizar comparação entre os resultados obtidos para os dois métodos. Foi realizada a padronização do método espectrofotométrico que se baseia na medida colorimétrica da velocidade de hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases sanguíneas, e do método potenciométrico que se baseia na medida da variação de pH de um meio ao qual se adicionam a amostra (plasma ou solução de eritrócitos), onde será medida a atividade enzimática, e substrato (acetilcolina) em meio tamponado. Para esta padronização foram simuladas amostras sem inibição (controles) e amostras com inibição de 1 hora e de 24 horas, utilizando-se o inseticida organofosforado malation, adicionados ao plasma e sangue. Como resultado observou-se que o valor da colinesterase sem inibição foi maior do que nas amostras em que houve inibição, e, além disso, o método espectrofotométrico conseguiu estabelecer uma diferença maior no resultado da atividade enzimática quando se analisaram as amostras inibida por 24 horas ao comparar-se ao método potenciométrico.

Palavras-chave: Colinesterase. Padronização. Espectrofotometria, potenciometria.

ABSTRACT

In Brazil, acute poisoning by pesticides occupy the third position among the causative agents behind only drugs and poisonous animals. And of pesticides, insecticides account for the majority of cases, being among them organophosphates and carbamates, which are the enzyme acetylcholinesterase inhibitors. For the diagnosis of acute and chronic poisoning of workers is important to realize the determination of enzyme activity. Thus, the study aims to standardize the methodologies necessary for the determination of cholinesterase erythrocyte and plasm by spectrophotometric and potentiometric methods and perform comparison between the results obtained for both methods. Standardizing the spectrophotometric method based on the colorimetric measurement of the rate of hydrolysis of acetylthiocholine by blood cholinesterases, and potentiometric method which relies on the measurement of pH change in a medium to which is added the sample was performed (plasm or solution erythrocytes), which will be measured enzyme activity, and substrate (acetylcholine) in buffered medium. For this standardization simulated samples were no inhibition (control) and samples with inhibition 1 hour and 24 hours, using an organophosphate insecticide malathion, added to plasm and blood. As a result it was observed that the amount of cholinesterase no inhibition was higher than in samples where there was inhibition, and furthermore, the spectrophotometric method was able to establish a larger difference in the result of enzymatic activity when analyzed samples inhibited by 24 hours when comparing to the potentiometric method.

Keywords: Cholinesterase. Standardization. Spectrophotometry, potentiometry.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fatores de correção para o cálculo da atividade enzimática pelo método potenciométrico.	30
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Determinação da acetilcolinesterase em sangue total pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição + tempo de espera com DTNB)	31
Tabela 2	Determinação da acetilcolinesterase em sangue total pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura).	32
Tabela 3	Determinação da Acetilcolinesterase em plasma pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: plasma sem inibição + tempo de espera com DTNB).	33
Tabela 4	Determinação da acetilcolinesterase em plasma pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura).	33
Tabela 5	Determinação da atividade enzimática nos eritrócitos pelo método potenciométrico (Amostra 1: solução de eritrócitos sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas).	35
Tabela 6	Determinação da atividade enzimática no plasma pelo método potenciométrico (Amostra 1: plasma sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas).	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BchE	Butirilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
RENACIAT	Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
UFC	Universidade Federal do Ceará
U.I.	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Delta
g	Gramma
®	Marca registrada
μ	Micro
mg	Miligramma
nm	Nanômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Praguicidas	17
2.2	Intoxicações	19
2.3	Métodos para determinação da atividade da colinesterase	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	Geral	24
3.2	Específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Delineamento e local da pesquisa	25
4.2	Reagentes	25
4.3	Equipamentos	25
4.4	Metodologias	25
4.4.1	Método Espectrofotométrico	26
4.4.1.1	Procedimento Analítico	26
4.4.2	Método Potenciométrico	28
4.4.2.1	Procedimento Analítico	29
4.5	Apresentação dos resultados	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Método Espectrofotométrico	31
5.2	Método Potenciométrico	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor catiônico do sistema nervoso, o qual é liberado na junção neuromuscular, participando diretamente na contração muscular. A neurotransmissão colinérgica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso central, uma vez que a acetilcolina participa do controle central e periférico do movimento, do funcionamento do sistema nervoso autônomo, da regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, consciência, atenção e aprendizado (DE JAEGER, 2010; CUARTERO et al., 2012).

Para que haja um correto funcionamento do sistema nervoso, é necessário que se tenha um bom desempenho na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), visto que ela realiza a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na sinapse nervosa (STRELITZ; ENGEL; KEIFER, 2014). E, como resultado, tem-se a metabolização em ácido acético e colina, permitindo-se desta forma, que o neurônio colinérgico retorne ao estado de repouso após a ativação, evitando-se uma transmissão excessiva de acetilcolina (SOREQ; SEIDMAN, 2001; SILMAN; SUSSMAN, 2005). A acetilcolinesterase está localizada no sistema nervoso central e nervos periféricos incluindo nervos simpáticos, parassimpáticos e junções neuro-musculares (sistema nervoso colinérgico) e também se faz presente nos eritrócitos, pulmões e baço. Há também uma outra enzima colinesterase, chamada butirilcolinesterase (BChE), a qual não possui substrato natural conhecido. Ela é produzida pelo fígado e é levada ao sangue, onde é solubilizada no plasma sanguíneo, mas também é encontrada no fígado, pâncreas, intestino delgado e matéria branca do cérebro (DOS SANTOS; MOSTARDEIRO, 2013; POHANKA, 2014).

Sabe-se até os dias atuais, após vários estudos e pesquisas, que existem apenas esses dois tipos de colinesterases presentes no corpo humano, a acetilcolinesterase (AChE), que pode ser chamada de colinesterase sanguínea ou colinesterase verdadeira e a butirilcolinesterase (BChE), que também pode ser chamada de colinesterase plasmática, pseudocolinesterase ou colinesterase do soro (DOS SANTOS; MOSTARDEIRO, 2013; POHANKA, 2014).

Dentre as duas, a AChE é a enzima chave para a regulação da concentração de ACh na fenda sináptica. Portanto, a sua inibição gera o acúmulo de ACh dentro das sinapses colinérgicas, gerando vários efeitos neurotóxicos graves (THIPHOM et al., 2013), como por exemplo, vertigem, náuseas, dificuldade de respirar e até mesmo a morte (STRELITZ; ENGEL; KEIFER, 2014).

Diversas substâncias podem levar à inibição da AchE, como por exemplo: galantamina ou prostigmina, além de inseticidas como os organofosforados e carbamatos, cuja consequência é o aumento da ação do neurotransmissor (ACh) (DOS SANTOS; MOSTARDEIRO, 2013).

A determinação da atividade de colinesterases sanguíneas apresenta importância do ponto de vista toxicológico, na avaliação da exposição a inseticidas organofosforados e nitrogenados (carbamatos) (DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001). Desde que os organofosforados foram conhecidos por inibir a atividade da enzima colinesterase, a determinação da atividade das colinesterases sanguíneas, a qual engloba a atividade das colinesterases eritrocitária e plasmática, se tornou comumente recomendada para diagnóstico laboratorial de intoxicação por esse grupo de substâncias químicas. Há uma preocupação maior com a intoxicação devido à exposição por agentes organofosforados devido ao fato de ser um grupo responsável por gerar um quadro mais grave, tendo maior potencial de levar à morte, especialmente em países desenvolvidos, devido ao seu modo de ação (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

Segundo dados de 2007 do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), que firma os casos de intoxicação e envenenamento registrados pela Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (RENACIAT), no Brasil, as intoxicações agudas por praguicidas ocupam a terceira posição entre os agentes causais, ficando atrás apenas de medicamentos e animais peçonhentos (BOCHNER et al., 2007). E, dentre os praguicidas, os inseticidas representam a maioria dos casos, com 73% deles, estando entre eles os organofosforados e carbamatos. Os inseticidas se destacam e são os maiores responsáveis pelas intoxicações no meio rural, considerando-se também o problema relacionado ao não uso de equipamentos de proteção individual, que acentua ainda mais os riscos da exposição (DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001).

A exposição aos inseticidas pode ocorrer no meio ocupacional, pelo uso destes na lavoura ou pela ingestão aguda (acidental ou intencional). A exemplo do uso desses agentes químicos intencionalmente (na tentativa de suicídio), temos a frequente utilização no Brasil, de um produto clandestino popularmente conhecido como “chumbinho”, o qual é irregularmente utilizado também como raticida. Este, não possui registro na ANVISA, nem em nenhum outro órgão de governo. E, a alguns anos atrás, tinha como princípio ativo um carbamato, denominado de aldicarbe (Temik ®)(DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001), mas atualmente foi verificado a partir de análises efetuadas em diversas cidades do país, que os praguicidas mais encontrados nos granulados tipo ‘chumbinho’ pertencem aos

grupos químicos dos carbamatos e organofosforados como o carbofurano (carbamato); terbufós (organofosforado); forato (organofosforado); monocrotofós (organofosforado) e metomil (carbamato). A substância a ser escolhida varia nas diferentes regiões do país (ANVISA, 2015).

Pode-se observar, deste modo, a importância na realização da determinação da atividade da acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira nos eritrócitos e da butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase no plasma, pois os efeitos gerados por uma possível inibição dessas enzimas servirão como biomarcadores nas urgências e emergências e na monitorização dos trabalhadores expostos aos inseticidas inibidores das colinesterases, tendo-se, respectivamente, intoxicação por exposição aguda e por exposição crônica (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

Logo, é de notória importância a padronização de métodos específicos, para a determinação da atividade destas enzimas nas condições do Laboratório de Análises Toxicológicas do Curso de Farmácia Universidade Federal do Ceará (UFC). Para tal finalidade, foram selecionados os métodos espectrofotométrico proposto por Ellman et al. e modificado por Harlin e Ross, o qual baseia-se na medida colorimétrica da velocidade de hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases sanguíneas (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008) e o método potenciométrico no qual a atividade das colinesterases é determinada pela mudança no pH devido à decomposição da acetilcolina (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Praguicidas

Os praguicidas, segundo a (FAO) Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura e são produtos químicos ou quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas à prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer outra forma na produção, na elaboração, na armazenagem, no transporte ou na comercialização de alimentos, para os homens ou os animais, de produtos agrícolas e da madeira, ou que podem ser administrados aos animais para combater insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos (DE OLIVEIRA BATISTUZZO; DE ALMEIDA CAMARGO; OGA, 2014).

Existem diferentes classes de praguicidas, baseadas no tipo de praga a ser controlada e na sua estrutura química, que incluem, entre outros: inseticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides); herbicidas (cloroacetanilidas, ácidos ariloxialcanoicos, triazinas, ureia e glicina substituída); e fungicidas (triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol, dicarboximidas) (DE OLIVEIRA BATISTUZZO; DE ALMEIDA CAMARGO; OGA, 2014).

No Brasil, as intoxicações agudas por praguicidas ocupam a terceira posição dentre os agentes causais. Entre 2007 e 2012, o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 42.365 casos, 55% deles por tentativas de suicídio, destas 66% com raticidas, que incluem o “chumbinho” (principalmente aldicarbe); seguido dos acidentes de trabalho com 20%, principalmente com praguicidas de uso agrícola (que representaram 86,7% dos casos); e 25% por outras causas, dentre elas os acidentes em geral, causa ambiental e violência (DE OLIVEIRA BATISTUZZO; DE ALMEIDA CAMARGO; OGA, 2014). No entanto, os agrotóxicos de uso agrícola já concentram sozinhos a maioria dos óbitos (BOCHNER et al., 2007).

A aplicação indiscriminada de praguicidas afeta tanto a saúde humana quanto os ecossistemas naturais. Os impactos na saúde podem atingir tanto os aplicadores do produto, quanto os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados, todavia a primeira categoria é a mais afetada por estes compostos. Com isso, temos hoje o aumento das intoxicações ocupacionais, sendo um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro (LINARES et al., 2005).

Dentre os inseticidas, os inibidores da colinesterase são classificados como organofosforados e nitrogenados (carbamatos). Os inseticidas organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico e apresentam duas características importantes: 1) são mais tóxicos para os vertebrados que os demais inseticidas; 2) são quimicamente instáveis, portanto se degradam no ambiente, impedindo bioacumulação (MIDIO; SILVA, 1995). Os inseticidas carbamatos são ésteres derivados do ácido carbâmico e também apresentam alta atividade inseticida com baixa ação residual, mas uma toxicidade mais baixa quando comparados com os inseticidas organofosforados (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

Os praguicidas organofosforados e os carbamatos são absorvidos pela pele, pelo trato respiratório e pelo trato gastrintestinal, e muitas vezes sua absorção é favorecida pelos solventes presentes na formulação. As exposições aos praguicidas podem ocorrer durante os processos industriais de fabricação, no uso de formulações, na aplicação agropecuária ou no controle de vetores em saúde pública, tendo como principais vias de exposição a via respiratória e a cutânea. No entanto, a via oral é importante quando há ingestão voluntária ou ingestão de alimentos contaminados (DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001).

Ambos inseticidas sofrem extensa biotransformação. Os organofosforados podem sofrer ataque enzimático em diferentes posições na molécula. A dessulfuração oxidativa, em que as formas P=S (formas tions) são convertidas para as formas P=O (formas óxons), resulta em produtos de biotransformação com maior toxicidade para insetos e mamíferos. Outras reações que podem ocorrer são a desarilação e a desalquilação oxidativa, envolvendo enzimas que utilizam a coenzima reduzida NADPH, o citocromo P-450 e um sistema regenerador de NADPH, para gerar o oxigênio e os elétrons necessários para produzir metabólitos polares. Os ésteres carbâmicos podem sofrer reações de hidrólise e reações oxidantes resumidos em dois grupos principais: 1) hidroxilação direta do anel e 2) oxidação de cadeias laterais. A fase II da biotransformação envolve conjugação glicurônica, com sulfatos e glutatona (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

Os inseticidas anticolinesterásicos apresentam como mecanismo de ação tóxica a inibição da acetilcolinesterase neuronal, impedindo assim a degradação do neurotransmissor acetilcolina, de forma que os sinais e sintomas da intoxicação por esses compostos se devem ao acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas. Como esse tipo de enzima também está presente no sangue e é igualmente inibida, a determinação da atividade de colinesterase no sangue é de grande importância para a verificação do grau de exposição a

inseticidas organofosforados e carbamatos. Em função da porcentagem de inibição verificada em um indivíduo, associada ao quadro clínico apresentado, pode-se saber se a exposição ao inseticida está sendo excessiva ou não, e, se excessiva, podemos ainda subdividir a intoxicação em quatro tipos: latente, leve, moderada e grave (MIDIO; SILVA, 1995).

As primeiras manifestações geralmente são muscarínicas: miose, sudorese, sialorreia, lacrimejamento, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e bradicardia. A seguir, surgem as manifestações nicotínicas: fasciculações, câimbras, hipertensão arterial, taquicardia, arritmias cardíacas e insuficiência respiratória. Em alguns casos, as manifestações nicotínicas ocorrem concomitantemente com as muscarínicas. A sintomatologia nicotínica, quando presente, é sinal de gravidade e necessita intervenção médica imediata (DE ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001).

2.2 Intoxicações

Os trabalhadores agrícolas apresentam um grande risco de intoxicação, devido ao contato intenso com praguicidas concentrados (RAINBIRD; O'NEILL, 1995). A pele é o órgão mais exposto durante as pulverizações. O contato pode ocorrer também durante a elaboração das caldas ou, ainda, durante o manuseio, limpeza do equipamento de pulverização e durante o descarte de embalagens vazias (SPIEWAK, 2001). Os indivíduos responsáveis pela aplicação de praguicidas serão expostos, de alguma forma, a esses produtos. O risco dessa exposição à saúde depende de fatores como: toxicidade do produto em humanos; condições da exposição; níveis de exposição ocupacional (DOMINGUES et al., 2004).

É importante ressaltar que a exposição ocupacional que ocorre em todas as etapas de formulação, manufatura e aplicação envolve o contato com misturas complexas de produtos químicos, ingredientes ativos e subprodutos utilizados nas formulações como impurezas, solventes, e outros compostos, que podem ser tão ou mais tóxicos que o próprio ingrediente ativo (BOLOGNESI, 2003). Dentre os efeitos tóxicos estão: as dermatoses, como as dermatites de contato, urticária, hipopigmentação da pele e alterações em unhas e cabelos (SPIEWAK, 2001). Embora a derme seja a principal via de contaminação dos trabalhadores envolvidos na aplicação de praguicidas, a via inalatória pode ser mais importante para produtos altamente voláteis ou que apresentam baixa absorção pela derme (ROSS et al., 2001).

O risco à saúde pode acontecer através de uma exposição única (intoxicação aguda) ou múltipla (intoxicação crônica) em um período relativamente curto de tempo que

uma pessoa estaria exposta, durante a manipulação do produto, de acordo com as recomendações de manuseio do fabricante ou de acordo com as normas para estocagem e transporte definidas pelos órgãos competentes (IPCS, 2010). Portanto, no caso dos trabalhadores, a vigilância à saúde dos trabalhadores expostos a praguicidas consiste da avaliação regular do seu estado de saúde e inclui o acompanhamento médico e a monitorização biológica. Esta pode ser entendida como medidas realizadas em amostras biológicas provenientes de trabalhadores expostos, cujos resultados são avaliados objetivando detectar precocemente uma exposição excessiva evitando alterações biológicas nocivas (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008; DE OLIVEIRA BATISTUZZO; DE ALMEIDA CAMARGO; OGA, 2014).

Na monitorização dos trabalhadores expostos aos praguicidas inibidores das colinesterases, é necessário que se conheça o nível de atividade enzimática na pré-exposição, ou seja, antes do início da exposição ocupacional aos inseticidas, de forma que cada trabalhador passe a ser seu próprio controle (MAGNOTTI et al., 1988). Assim sendo, a determinação da atividade destas enzimas serve de apoio no diagnóstico dos casos de intoxicações agudas e no acompanhamento dos trabalhadores expostos aos inseticidas organofosforados e carbamatos (DE OLIVEIRA BATISTUZZO; DE ALMEIDA CAMARGO; OGA, 2014).

Em geral, podem-se esperar sintomas clínicos quando se tem mais de 50% da atividade da acetilcolinesterase cerebral inibida, e níveis de inibição maiores que 90 % são associados à toxicidade severa (WOREK et al., 2005). A acetilcolinesterase eritrocitária tem demonstrado ser um parâmetro mais confiável que a colinesterase plasmática na avaliação da exposição dos trabalhadores, pois a enzima presente no eritrócito é a mesma presente no sistema nervoso e a atividade da enzima eritrocitária no sangue depende muito da meia-vida dos eritrócitos, sendo considerado um melhor avaliador de situações de exposição crônica (MAGNOTTI et al., 1988).

A diminuição da atividade da enzima plasmática não está necessariamente associada a sintomas de intoxicação por anticolinesterásicos, e grande inibição dessa enzima tem sido notada na ausência de qualquer alteração na acetilcolinesterase eritrocitária (COCKER et al., 2002). A colinesterase plasmática pode sofrer diminuição de sua atividade, por exemplo, em doenças hepáticas, infarto do miocárdio, mal nutrição, tuberculose etc., ao passo que essa enzima pode se apresentar aumentada em situações como obesidade, psoríase, hipertensão essencial, tireotoxicose, nefrose, asma, alcoolismo, esquizofrenia, entre outros (SILK; KING; WHITTAKER, 1979).

De acordo com a Norma Regulamentadora 7 da Secretaria da Segurança e Saúde no Trabalho, recomenda-se a determinação da atividade enzimática pré-ocupacional, e os Índices Biológicos Máximos Permitidos são: 30% de depressão da atividade inicial para a acetilcolinesterase eritocitária, 50% de depressão da atividade inicial para a colinesterase plasmática e 25% de depressão da atividade inicial para a atividade enzimática em sangue total (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

2.3 Métodos para determinação da atividade da colinesterase

As acetilcolinesterases presentes nos músculos e nos neurônios não são medidas diretamente através de métodos clínicos, portanto a colinesterase eritrocitária é um indicador importante para investigar as intoxicações agudas por organofosforados, além de facilitar na decisão acerca de quanto tempo se fará terapia com oximas em caso de enzimas que envelheceram rapidamente (THIERMANN et al., 2005; CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Numerosas estratégias foram usadas para detectar a exposição a organofosforados como: estimativa da atividade de acetilcolinesterase no sangue; identificação e quantificação de toxicantes e seus metabólitos no plasma e na urina; reativação de enzima inibida através do uso de fluoreto; digestão da enzima inibida seguida pela detecção de proteína fosforiladas (HOLAS et al., 2012).

A estimativa da atividade da acetilcolinesterase é a principal estratégia utilizada para o diagnóstico de intoxicação por organofosforados. Baseado em diferentes princípios utilizados para estimar a atividade da colinesterase, esta pode ser categorizada dentro de diferentes métodos: os métodos colorimétrico, manométrico, potenciométrico e titrimétrico, que são métodos que se baseiam na detecção de ácido acético e, os métodos espectrofotométrico, fluorimétrico e quimioluminescente, que se baseiam na detecção de tiocolina ou outros substratos (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

O método colorimétrico baseia-se na variação de pH do meio reação, pelo ácido acético liberado na hidrólise da acetilcolina pela enzima colinesterase, verificada através do indicador azul de bromotimol, que assume diferentes colorações em função da atividade enzimática (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

O método manométrico foi comumente utilizado para determinar a atividade de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase usando diferentes substratos. Tem como princípio a medição de CO₂ liberado quando a acetilcolina é hidrolisada na presença de colinesterases. Possui rápida determinação de atividade, porém o pH não pode variar durante a medição. É

um método demorado, nem a inibição cinética nem a reativação cinética podem ser estudadas, não sendo, portanto, um método utilizado para estimação da atividade da colinesterase na rotina laboratorial (HOLAS et al., 2012).

O método potenciométrico, um dos nossos alvos de padronização, é também empregado para determinação da atividade da colinesterase. Neste método, a acetilcolina, na presença de colinesterase em uma solução adequada, é quebrada em colina e ácido acético. A atividade da colinesterase é determinada pela mudança no pH da solução devido a formação de ácido depois de um intervalo de tempo fixado (ALDRIDGE; DAVIES, 1952). A atividade da colinesterase é expressa com a mudança de pH por 0,1 ml de amostra de sangue total em 1 hora. Este método é usado para estimar a atividade da colinesterase em sangue total, eritrócitos e plasma. A precisão de tal método é em torno de +/- 0,02- 0,03 ΔpH, mas não possui exatidão suficiente para estimar a atividade da colinesterase em comparação com o método manométrico, em que a mudança no pH é dependente da concentração de ácido, onde múltiplos fatores podem afetar esta mudança (AUGUSTINSSON, 1971). Além disso, baixos níveis de atividade enzimática não podem ser detectados (DAVIES; RUTLAND, 1950; ALDRIDGE; DAVIES, 1952; HOLAS et al., 2012).

No método titrimétrico a reação misturada contendo a enzima e o substrato em concentração adequada (comumente barbitona) é titulada com álcali de força conhecida para estudar um ponto final determinado por potenciometria ou um indicador apropriado. Ocorre, então a neutralização (através de solução alcalina padrão) do ácido acético que foi liberado pela hidrólise enzimática da acetilcolina, exigindo-se para o método uma manutenção de pH constante. É um método demorado e as rápidas mudanças no pH podem afetar na atividade enzimática. O titulador automático é utilizado apenas para testes de campo (ALDRIDGE; DAVIES, 1952; AUGUSTINSSON, 1971; CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

Dentre os métodos de detecção de tiocolina ou outros substratos, tem-se o método quimioluminescente, em que a acetilcolina na presença de acetilcolinesterase é hidrolisada, gerando colina. A colina gerada na presença de colina oxidase é convertida em peróxido de hidrogênio, que, na presença de peroxidase e luminol produz a quimioluminescência (BIRMAN, 1985). Apesar de apresentar como vantagem o aumento da sensibilidade de detecção de atividade da colinesterase, este método não é comumente utilizado na bioquímica laboratorial clínica para estimar a atividade da colinesterase no cenário de intoxicação aguda por organofosforados, pois requer instrumentação de preço elevado e alto preparo técnico dos indivíduos que fazem a sua análise (HOLAS et al., 2012).

O método fluorimétrico se baseia na formação de produto fluorescente. Os substratos utilizados como indoxil-acetato e ésteres de resorufina (acetato de resorufina e butirato de resorufina), são compostos não fluorescentes que são hidrolisados pela enzima, gerando produto altamente fluorescente. A vantagem deste método é a possibilidade de realizar estudos de inibição cinética, e a desvantagem, é que existem outras esterases hidrolíticas que podem hidrolisar tais substratos, reduzindo assim a especificidade do método (MIAO; HE; ZHU, 2010).

Atualmente, o método mais comumente usado para determinação da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária é o espectrofotométrico baseado no método de Ellman. Ele é rotineiramente usado para avaliação da inibição causada por organofosforados usando acetiltiocolina como substrato (WOREK; EYER; THIERMANN, 2012). O produto da hidrólise (tiocolina) reage com o cromógeno DTNB dissulfito (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) assim formando um produto de coloração amarela TNB diânion (3- carboxyl-4- nitrothiolate) que é quantificado através de absorvância de 412 nm realizando ajuste com branco apropriado. Foi observado que com 5×10^{-4} M/L de acetiltiocolina e 0,083 unidades/mL de colinesterase eritrocitária, a taxa de reação foi em torno de 0,1003/ minuto (ELLMAN, et al., 1961).

Embora este método seja simples e de custo eficaz, existem limitações. Pode haver interações entre tióis livres presentes na amostra biológica com DTNB, causando resultados falso-positivos em relação à atividade da acetilcolinesterase (RIENER; KADA; GRUBER, 2002; SIMPSON, 2007). As oximas, que são utilizadas para a reativação da acetilcolinesterase inibida reagem com a acetiltiocolina muito mais rápido do que o reagente de Ellman. Devido a esta interferência causada por oximas, a análise de reativação torna-se difícil ao se utilizar do método baseado no emprego da acetiltiocolina (SINKO et al., 2007).

Para o trabalho em questão, foram padronizados dois métodos, cujos equipamentos necessários estão disponíveis no laboratório: o espectrofotométrico e o potenciométrico, os quais podem ser utilizados nas determinações para diagnóstico de intoxicação aguda e, também podem ser utilizados na monitorização de intoxicação crônica em pessoas expostas aos inibidores de colinesterases. Desta forma, o trabalho se propôs a determinar a atividade da enzima colinesterase tanto em eritrócitos (monitorização da intoxicação crônica) quanto em plasma (monitorização da intoxicação aguda).

3 OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Padronizar metodologia para determinação das colinesterases eritrocitária e plasmática pelos métodos espectrofotométrico e potenciométrico.

3.2. ESPECÍFICOS

- Realizar comparação entre os resultados obtidos para os dois métodos.
- Quantificar por diferentes métodos.
- Verificar interferência do tempo de inibição.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento e local da pesquisa

A padronização de método para determinação da atividade de colinesterase eritrocitária e plasmática por espectrofotometria e potenciometria foi realizada no laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Professor Doutor Eurico Litton Pinheiro de Freitas da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Reagentes

Foram utilizados hidróxido de sódio-NaOH, cromato de potássio- K_2CrO_4 , fosfato dibásico de sódio heptaidratado- $Na_2PO_4 \cdot H_2O$, diidrogenofosfato de potássio- KH_2PO_4 , ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico-DTNB, bicarbonato de sódio- $NaHCO_3$ e iodeto de acetilticolina para o método espectrofotométrico. Para o método potenciométrico foram utilizados ácido clorídrico concentrado (HCl); barbital sódico; cloreto de potássio (KCl); cloreto de sódio (NaCl); diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), saponina purificada e, também, o iodeto de acetilticolina.

As amostras biológicas utilizadas (sangue e plasma) para os testes de padronização foram oriundas do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC (LACT) e do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

4.3 Equipamentos

Os equipamentos e acessórios utilizados para realização dos métodos foram: espectrofotômetro modelo Genesys 10S UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC®); medidor de pH modelo mPA 210 (MS TECNOPON Instrumentação®); centrífuga Rotofix 32, (HETTICH ZENTRIFUGEN®); balança analítica (HR200); agitador (WARMNEST®, Curitiba-PR); banho ultrasson modelo Q335D (QUIMIS®, São Paulo, Brasil), purificador de água (PURELAB Option ELGA®, São Paulo, Brasil).

4.4 Metodologias

Na padronização de método para determinação da atividade de colinesterase eritrocitária e plasmática foram utilizados: o método espectrofotométrico proposto por Ellman

et al. e modificado por Harlin e Ross, (ELLMAN et al., 1961; HARLIN; ROSS, 1989; MIDIO; SILVA, 1995; DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008) e, o método potenciométrico (MICHEL et al., 1949; MIDIO; SILVA, 1995; DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

4.4.1 Método espectrofotométrico

O método baseia-se na medida colorimétrica da velocidade de hidrólise da acetiltiocolina pelas colinesterases sanguíneas. A tiocolina liberada reage com o ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) liberando um composto de cor amarela que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm. A variação de absorbância por minuto é diretamente proporcional à atividade enzimática.

As amostras utilizadas foram: sangue heparinizado e plasma.

As seguintes soluções foram utilizadas: solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,05N; solução de cromato de potássio (K_2CrO_4) 0,21mmol; soluções tampão fosfato 0,1M (pH 7 e pH 8): as quais foram feitas a partir das soluções de fosfato dibásico de sódio 0,1 M (Na_2HPO_4) e de dihidrogenofosfato de potássio 0,1M (KH_2PO_4); solução de substrato (iodeto de acetiltiocolina) – (75mmol) e de ácido 5,5’ ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), adicionando-se 0,0396g de DTNB e 15 mg de $NaHCO_3$ em balão volumétrico de 10 ml, solubilizando-os com tampão fosfato pH 7 até completar o volume.

4.4.1.1 Procedimento analítico

Determinação da atividade enzimática em sangue total:

- 1) Adicionar 10 mL de tampão fosfato pH8,00 para um tubo de ensaio de 15ml e, em seguida, adicionou-se 10 μ L de amostra de sangue. Homogeneizar e agitar em agitador vortex.
- 2) Pipetar 3ml dessa mistura para outros 3 tubos de ensaio de 6mL cada.
- 3) Adicionar 50 μ L de solução de DTNB, e homogeneizar. Em seguida, adicionar 20 μ L de solução de iodeto de acetiltiocolina, e homogeneizar novamente.
- 4) Realizar a leitura após 1,2,3,4 e 5 minutos, controlando o tempo através de cronômetro. Zerar o espectrofotômetro com água destilada. Ler as amostras em 412 nm.
- 5) Realizar os testes em triplicata para melhor análise da precisão e exatidão do método.

O valor de referência para a atividade da enzima colinesterase no sangue total é de 10,4 +/- 3

U.I. (Unidades Internacionais).

Determinação da atividade enzimática em plasma:

- 1) Centrifugar uma amostra de sangue total heparinizado a 40rpm por 5 minutos e separar o plasma.
- 2) Adicionar 6 mL de tampão fosfato pH 8,00 em um tubo de ensaio de 15 mL e 10 μ L de plasma. Homogeneizar e agitar em agitador vortex.
- 3) Pipetar 3 mL da solução para outro tubo de ensaio. Realizar mesmo procedimento de diluição do plasma em tampão fosfato pH 8,00 para outros dois tubos de ensaio.
- 4) Adicionar 25 μ L da solução de DTNB, homogeneizar e agitar em agitador vortex. Em seguida, adicionou-se 20 μ L de solução de iodeto de acetiltiocolina. Homogeneizar.
- 5) Realizar a leitura após 1,2,3,4 e 5 minutos, controlando o tempo através de cronômetro. Zerar o espectrofotômetro com água destilada. Ler as amostras em 412 nm.

Observação: a análise foi feita em triplicata para melhor análise da precisão e exatidão do método.

Cálculos:

O cálculo da atividade enzimática para sangue total e plasma foi dado pela fórmula: $\Delta A/\text{minuto} \cdot (F)$

$\Delta A/\text{minuto}$ = variação de absorbância por minuto, sendo (Afinal- A inicial/ minuto, fazendo-se a soma das diferenças dos valores de $\Delta A/\text{minuto}$ das 5 leituras.

$F = [1000/1,36 \cdot 10^4 \cdot 1]$. FD, em que: $1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ é igual ao coeficiente de extinção molar do ânion de coloração amarela do produto formado (tionitrobenzoato);

O valor 1000 é igual ao fator de conversão (mmoles/ mL para μ moles/mL);

O valor 1 é igual ao caminho óptico (espessura da cubeta) em cm.

FD é o fator de diluição, sendo este igual a 1000 para sangue total e 600 para plasma.

A atividade enzimática foi expressa em micromoles de substrato hidrolisado por mL de amostra e por minuto (μ moles/mL. minuto).

Tem-se, portanto que:

$$\text{Atividade enzimática} = \Delta A/\text{minuto} \cdot [1000/ 1,36 \cdot 10^4 \cdot 1] \cdot \text{FD}$$

O valor de referência para a atividade da enzima colinesterase para a atividade da enzima colinesterase no plasma é de 5 +/- 2,1 U.I.

Expressão dos resultados em unidades S.I: A Colinesterase em (U.I/L) = Colinesterase (U.I/ mL) x 1000. Sendo uma U.I de Colinesterase a quantidade de enzima que

hidrolisa um μmol de substrato/ minuto/ mL de soro, a 37°C .

Amostras analisadas para ambos os métodos:

Foram analisadas 3 amostras de plasma: uma sem inibição por inseticida; outra com inibição após 1h da contaminação da amostra; outra com inibição após 24h da contaminação da amostra, utilizando uma solução a 1% do inseticida organofosforado malation (10 μL). Cada uma das amostras acima foi analisada em triplicata. Procedeu-se como descrito acima. O DTNB e o iodeto de acetiltiocolina devem ser colocados momentos antes da leitura de cada amostra.

4.4.2 Método Potenciométrico

O método baseia-se na medida da variação de pH de um meio ao qual se adicionam a amostra (plasma ou solução de eritrócitos), onde será medida a atividade enzimática, e substrato (acetilcolina) em meio tamponado. A enzima presente na amostra deverá hidrolisar o substrato, liberando ácido acético, responsável pela acidificação do meio e, portanto pela variação de pH através de um peagâmetro, com leitura de 0,01 unidade de pH.

As amostras utilizadas foram sangue heparinizado e plasma, onde se centrifugou a amostra de sangue e utilizou-se o sobrenadante obtido. As seguintes soluções foram utilizadas: HCl 0,1 N; NaCl 0,009 g/mL; saponina 0,00011 g/mL.

A solução tampão1 (para eritrócitos), foi preparada com 0,4180 g de barbital sódico, 0,0469 g de KH_2PO_4 , 4,4753 g de KCl e 2 mL de HCl 0,1 N, dissolvidos em água destilada em balão volumétrico de 100 mL. No momento do uso acertou-se o pH para 8,10 em potenciômetro, utilizando-se o HCl 0,1N para o ajuste;

A solução tampão 2 (para plasma), foi preparada com 0,1235 g de barbital sódico, 0,0172 g de KH_2PO_4 , 1,7539 g de NaCl e 1 mL de HCl 0,1 N dissolvidos em água destilada em balão volumétrico de 100 mL. No momento do uso acertou-se o pH para 8,00 em potenciômetro, utilizando-se o HCl 0,1N para o ajuste;

As soluções de substrato para a enzima eritrocitária e enzima plasmática a partir de diferentes massas de iodeto de acetiltiocolina, foram dissolvidas em água destilada, sendo as concentrações 0,03012 g/mL e 0,04509 g/mL, respectivamente. Utilizaram-se balões volumétricos de 10 mL.

4.4.2.1 Procedimento analítico

Determinação da atividade enzimática nos eritrócitos:

- 1) Misturar os eritrócitos obtidos na centrifugação (preparação da amostra) com o dobro de seu volume com solução de NaCl e novamente centrifugou-se a 2000 rpm por 15 minutos.
- 2) Descartar o sobrenadante e repetir a operação anterior, centrifugar por 20 minutos dessa vez.
- 3) Anotar o volume de células obtidas, que foi em torno de 1 mL, e retirar com pipeta Pasteur parte do sobrenadante, deixando todavia volume igual ao volume de eritrócitos, ficando 2 mL no total.
- 4) Homogeneizar e transferir 0,4 mL dessa solução para um tubo de ensaio contendo 9,6 mL de solução de saponina e homogeneizar novamente.
- 5) Transferir 2 ml dessa solução para um béquer de 5 mL e adicionar 2 mL de tampão I. À temperatura ambiente, medir o pH da mistura (pH1).
- 6) Adicionar 0,4 mL do substrato para eritrócitos e homogeneizar. Marca-se o tempo de 1 hora para que a reação ocorra. Decorrido este tempo, o pH deve ser novamente medido (pH2).

A análise foi feita em triplicata para melhor análise da precisão e exatidão do método. O potenciômetro foi calibrado previamente com duas soluções tampão, sendo uma de pH 4,00 e outra de pH 7,00.

Foram analisadas 3 amostras de sangue total: uma de sangue total sem inibição por inseticida; outra com inibição em torno de 1h por inseticida organofosforado malation e outra com inibição em torno de 24h também por inseticida organofosforado malation. A quantidade de malation utilizada foi de 10 µL para cada 3 ml de amostra. Cada uma das amostras acima foi analisada em triplicata, como já descrito.

Determinação da atividade enzimática no plasma

- 1) Diluir a amostra contendo plasma separado por centrifugação com água destilada na proporção de 0,02 mL de plasma para 1 mL de solução, sendo a solução total (plasma+ água). Como foram necessários 2 mL desta solução, foram necessários 0,04 mL de plasma e 1,96 mL de água destilada.
- 2) Transferir 2 mL dessa solução para um béquer de 5 mL e adicionar 2 mL do tampão II.
- 3) À temperatura ambiente, medir o pH da mistura no potenciômetro (pH1).
- 4) Adicionar 0,4 mL de substrato para plasma. Marcar o tempo de 1 hora para que a reação ocorra. E após este tempo o pH deve ser medido novamente (pH2).

Cálculos:

O cálculo da atividade enzimática eritrocitária e plasmática foi dado pela seguinte fórmula:

$$\Delta\text{pH/hora} = (\text{pH1} - \text{pH2} - b) \cdot f$$

pH1 = pH inicial;

pH2= pH final;

b= fator de correção da hidrólise não-enzimática, correspondente ao pH2; (ver Quadro 1)

f= correção das variações em pH/hora com pH, correspondente ao pH 2.

Valores de referência para colinesterase eritrocitária: 0,57 a 0,95 $\Delta\text{pH/h}$ e de 0,45 a 1,32 $\Delta\text{pH/h}$ para colinesterase plasmática.

A análise foi feita em triplicata para melhor análise da precisão e exatidão do método. O potenciômetro foi calibrado previamente com duas soluções tampão, sendo uma de pH 4,00 e outra de pH 7,00.

As amostras recebidas continham inicialmente sangue total, que passou por centrifugação (5 minutos) para posterior separação do plasma e análise da atividade enzimática do plasma: sem inibição e com inibição. Na amostra em que houve inibição foi adicionado ao sangue total o inseticida e, no momento da análise, o plasma foi separado das hemácias.

QUADRO 1: Fatores de correção para o cálculo da atividade enzimática pelo método potenciométrico.

pH ₂	Colinesterase eritrocitária	Colinesterase eritrocitária	Colinesterase plasmática	Colinesterase plasmática
	b	F	b	f
7,9	0,03	0,94	0,09	0,98
7,8	0,02	0,95	0,07	1,00
7,7	0,01	0,96	0,06	1,01
7,6	0,00	0,97	0,05	1,02
7,5	0,00	0,98	0,04	1,02
7,4	0,00	0,99	0,03	1,01
7,3	0,00	1,00	0,02	1,01
7,2	0,00	1,00	0,02	1,00
7,1	0,00	1,00	0,02	1,00
7,0	0,00	1,00	0,01	1,00
6,8	0,00	0,99	0,01	1,00
6,6	0,00	0,97	0,01	1,01
6,4	0,00	0,97	0,01	1,02
6,2	0,00	0,97	0,01	1,04
6,0	0,00	0,99	0,01	1,09

Fonte: DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

4.5 Apresentação dos resultados

Os experimentos foram apresentados em tabelas com as médias dos resultados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método espectrofotométrico

A seguir serão apresentados os resultados das amostras analisadas (Amostra 1: sem inibição; Amostra 2: inibição de 1 h; Amostra 3: inibição de 24 h), utilizando-se o método espectrofotométrico, em sangue total e no plasma.

Na Tabela 1 foram apresentados os resultados de sangue total em triplicata da Amostra 1, sem inibição (1, 1' e 1''), inicialmente colocando o DTNB e substrato em todos os tubos e depois procedendo-se à leitura. Foram observadas variabilidades nas leituras, o que levou a repetirmos a análise desta amostra, adicionando-se o DTNB e a solução de acetilcolina logo antes de cada leitura, sendo assim realizado para os testes subsequentes.

TABELA 1: Determinação da acetilcolinesterase em sangue total pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição + tempo de espera com DTNB).

Tempos Minutos	ABSORBÂNCIAS AMOSTRAS			
	Amostra 1	Amostra 1'	Amostra 1''	Média
1	0,659	0,717	1,010	0,795
2	0,726	0,777	1,070	0,857
3	0,808	0,859	1,177	0,948
4	0,887	0,940	1,273	1,033
5	0,976	1,021	1,375	1,124
AE*	23,31	22,35	26,84	24,16

*AE = Atividade Enzimática ($\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$) = $\Delta A/\text{minuto}$. (F); $F = [1000/1,36 \cdot 10^4 \cdot 1]$. FD; FD=1000.

Na Tabela 2 foram apresentados os resultados de sangue total, das amostras 1, 2 e 3 (todas em triplicata), sem inibição, com inibição de 1 hora e com inibição de 24 horas,

respectivamente. O DTNB foi colocado logo antes de cada leitura. No entanto, observando-se o resultado final não houve comprometimento do resultado final ao colocar o DTNB em todos os tubos antes de qualquer leitura ou imediatamente antes de cada leitura.

TABELA 2: Determinação da acetilcolinesterase em sangue total pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura.

Tempo Minuto	ABSORBÂNCIAS AMOSTRAS											
	1	1'	1''	Média	2	2'	2''	Média	3	3'	3''	Média
1	0,614	0,578	0,788	0,660	0,626	0,667	0,684	0,659	0,564	0,625	0,649	0,612
2	0,691	0,648	0,867	0,735	0,631	0,668	0,688	0,662	0,572	0,618	0,641	0,610
3	0,771	0,724	0,966	0,820	0,640	0,671	0,697	0,669	0,578	0,619	0,648	0,615
4	0,852	0,805	1,068	0,908	0,651	0,689	0,708	0,682	0,587	0,620	0,653	0,620
5	0,934	0,883	1,165	0,994	0,660	0,698	0,721	0,693	0,593	0,626	0,661	0,626
AE*	23,53	22,43	27,72	24,56	2,94	2,28	2,72	2,65	2,13	0,81	0,88	1,27

*AE = Atividade Enzimática ($\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$) = $\Delta A/\text{minuto}$. (F); $F = [1000/1,36 \cdot 10^4 \cdot 1]$. FD; FD=1000.

Na determinação da atividade enzimática em sangue total pelo método espectrofotométrico da amostra 1 (sem inibição), em relação ao momento de adição do reagente ácido 5,5 ditio-2-bisnitrobenzóico (DTNB), observou-se que não houve diferença significativa na atividade enzimática obtida. Ou seja, a amostra em que adiciona-se o DTNB antes de ser iniciada qualquer leitura, apresentou valor médio de 24,16 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$ (TABELA 1), enquanto que na amostra em que o DTNB foi posto no momento anterior a cada leitura, apresentou valor médio de 24,56 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$ (TABELA 2).

A amostra 2 (1 hora de inibição por inseticida organofosforado malation, apresentou uma atividade enzimática em sangue total de 2,65 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$ (TABELA 2), muito abaixo do valor de referência para amostra de sangue total (10,4 \pm 3 U.I) e na amostra 3 (24 horas de inibição), o valor médio de atividade enzimática em sangue total foi ainda menor, sendo 1,27 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$. Os valores obtidos através da análise mostram que o método foi satisfatório ao realizar leituras de amostras inibidas, nas quais fica clara a distinção na inibição conferida às colinesterases devido a tempos diferentes de inibição a que as amostras foram submetidas (ELLMAN et al., 1961; HARLIN; ROSS, 1989; MIDIO; SILVA, 1995).

Na Tabela 3 foram apresentados os resultados da amostra 1 de plasma, sem

inibição (em triplicata, 1, 1', 1''), colocando inicialmente o DTNB em todos os tubos. Como houve modificação nas leituras e no resultado, foi padronizado que o DTNB seria colocado em cada tubo apenas antes de cada leitura.

TABELA 3: Determinação da Acetilcolinesterase em plasma pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: plasma sem inibição + tempo de espera com DTNB).

Tempos	ABSORBÂNCIAS AMOSTRAS			
	Amostra 1	Amostra 1'	Amostra 1''	Média
1	0,078	0,079	0,071	0,076
2	0,104	0,119	0,100	0,107
3	0,134	0,138	0,132	0,134
4	0,165	0,170	0,164	0,166
5	0,195	0,199	0,195	0,196
AE*	5,16	5,29	5,47	5,31

*AE = Atividade Enzimática ($\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$) = $\Delta A/\text{minuto}$. (F); F= [1000/1,36. 10^4 .1]. FD; FD=600.

Na Tabela 4 foram apresentados os resultados de plasma, das amostras 1, 2 e 3, sem inibição, com inibição de 1 hora e com inibição de 24 horas, respectivamente. Todas analisadas em triplicata e colocando-se o DTNB logo antes da leitura.

TABELA 4: Determinação da acetilcolinesterase em plasma pelo método espectrofotométrico (Amostra 1: sangue total sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura).

Tempo Minuto	ABSORBÂNCIAS AMOSTRAS											
	1	1'	1''	Média	2	2'	2''	Média	3	3'	3''	Média
1	0,084	0,084	0,085	0,084	0,117	0,120	0,111	0,116	0,062	0,064	0,059	0,061
2	0,125	0,125	0,123	0,124	0,127	0,130	0,119	0,125	0,065	0,067	0,063	0,065
3	0,167	0,166	0,166	0,166	0,137	0,138	0,127	0,134	0,069	0,071	0,067	0,069
4	0,210	0,208	0,210	0,209	0,147	0,146	0,134	0,142	0,071	0,073	0,070	0,071
5	0,253	0,251	0,252	0,252	0,157	0,155	0,143	0,151	0,073	0,076	0,072	0,073
AE*	7,45	7,37	7,37	7,40	1,76	1,54	1,41	1,57	0,48	0,53	0,57	0,53

*AE = Atividade Enzimática ($\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$) = $\Delta A/\text{minuto}$. (F); F= [1000/1,36. 10^4 .1]. FD; FD=600.

Na determinação da atividade enzimática em plasma pelo método espectrofotométrico, o resultado da amostra 1 (sem inibição), foi de 5,31 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$,

quando colocou-se o ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) antes de realizar qualquer leitura (TABELA 3), enquanto que o resultado apresentado para a amostra 1 utilizando-se o DTNB logo antes de cada leitura (TABELA 4) foi de 7,40 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$. Logo é recomendado que o DTNB seja colocado no tubo apenas em instantes antes de cada leitura, a fim de evitar variação nas absorvâncias, gerando conseqüentemente valores de atividades enzimáticas menores, visto que a variação de absorvância por minuto é diretamente proporcional à atividade enzimática (ELLMAN et al., 1961; HARLIN; ROSS, 1989).

A amostra de plasma com 1 hora de inibição (amostra 2) apresentou valor médio de atividade enzimática de 1,57 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$ e a amostra com 24 horas de inibição (amostra 3) apresentou atividade enzimática de 0,53 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$ (TABELA 4), mostrando que o método foi eficiente na determinação da atividade enzimática em plasma, pois tem-se coerência nos resultados visto que a amostra 2, como foi inibida durante apenas 1 hora, apresentou atividade enzimática maior pelas colinesterases presentes do que a amostra 3, que sofreu inibição enzimática durante 24 horas.

Comparando-se as análises realizadas em sangue total e plasma, foi observado que as amostras de sangue total, quando inibidas, têm suas atividades enzimáticas bem mais afetadas do que as amostras de plasma. Foi notória a inibição enzimática causada pelo inseticida organofosforado malation, tanto em plasma como em sangue, mostrando que o método espectrofotométrico foi satisfatório na padronização proposta em laboratório.

5. 2 Método Potenciométrico

Na Tabela 5 foram apresentados os resultados das amostras analisadas em triplicata (Amostra 1: sem inibição; Amostra 2: inibição de 1 h e Amostra 3: inibição de 24 h por inseticida malation), utilizando-se o método potenciométrico, em eritrócitos. Foram apresentadas também as variações de pH/hora para cada uma das amostras, objetivando-se obter a avaliação dos níveis de atividade enzimática da colinesterase.

TABELA 5: Determinação da atividade enzimática nos eritrócitos pelo método potenciométrico (Amostra 1: solução de eritrócitos sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura).

	VALORES DE pH das AMOSTRAS								
	1	1'	1''	2	2'	2''	3	3'	3''
pH ₁	7,82	7,88	7,90	7,86	7,87	7,84	7,87	7,86	7,86
pH ₂	7,07	7,23	7,36	7,75	7,79	7,75	7,81	7,77	7,76
VARIACÃO DE PH/HORA									
Δ pH/hora	0,75	0,65	0,54	0,096	0,0672	0,0768	0,038	0,0768	0,0864
Média			0,64			0,08			0,067

$$\Delta\text{pH/hora} = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2 - b) \cdot f$$

Na determinação da atividade enzimática eritrocitária através do método potenciométrico, foi observado que a variação de pH/hora foi maior nas amostras que não sofreram inibição enzimática (amostra 1), sendo este resultado coerente com o método proposto pois isto significa que a amostra 1 possuía maior quantidade enzimática disponível para hidrolisar o substrato (acetilcolina), liberando maior quantidade de ácido acético, o que conferiu maior acidificação do meio, visto que a variação de pH foi maior (MIDIO; SILVA, 1995; DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

Em relação às variações de pH/hora para as amostras com 1 hora de inibição e 24 horas (amostra 2) e (amostra 3) respectivamente, houve uma pequena variação, tendo a amostra 2 uma média de variação de pH/hora de 0,08, enquanto que a média da variação de pH/hora para a amostra 3 foi de 0,067.

Na Tabela 6 foram apresentados os resultados em plasma, em triplicata, para as amostras: Amostra 1, sem inibição, Amostra 2, com inibição de 1 h e Amostra 3, com 24 h de inibição por inseticida malation. Foram apresentadas também as variações de pH/hora para cada uma das amostras, objetivando-se obter a avaliação dos níveis de atividade enzimática da colinesterase em plasma.

TABELA 6: Determinação da atividade enzimática no plasma pelo método potenciométrico (Amostra 1: plasma sem inibição; Amostra 2, com inibição de 1 hora; Amostra 3, com inibição de 24 horas com DTNB na hora da leitura).

	VALORES DE pH das AMOSTRAS								
	1	1'	1''	2	2'	2''	3	3'	3''
pH ₁	7,86	7,85	7,85	7,86	7,81	7,79	8,02	7,92	7,95
pH ₂	7,42	7,38	7,37	7,73	7,66	7,66	7,81	7,75	7,75
VARIACÃO DE PH/HORA									
Δ pH/hora	0,4141	0,4545	0,4646	0,0707	0,102	0,0816	0,14	0,1616	0,1414
Média			0,4444			0,0847			0,1476

$$\Delta\text{pH/hora} = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2 - b) \cdot f$$

Na determinação da atividade enzimática plasmática através do método potenciométrico, foi observado que a variação de pH/hora foi maior nas amostras que não sofreram inibição enzimática (amostra 1), sendo este resultado coerente com o método proposto pois isto significa que a amostra 1 possuía maior quantidade enzimática disponível para hidrolisar o substrato (acetilcolina), liberando maior quantidade de ácido acético, o que conferiu maior acidificação do meio, visto que a variação de pH foi maior, obtendo-se um valor médio de variação de pH/hora de 0,4444 (MIDIO; SILVA, 1995; DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008).

Em relação às variações de pH/hora para as amostras com 1 hora de inibição e 24 horas (amostra 2) e (amostra 3) respectivamente, houve uma pequena variação, tendo a amostra 2 uma média de variação de pH/hora de 0,0847 enquanto que a média da variação de pH/hora para a amostra 3 foi de 0,1476, não sendo estes valores coerentes, pois a amostra 2 foi inibida por menos tempo que a amostra 3, mostrando assim uma possível limitação do método em distinguir a inibição da colinesterase em quantidades de horas diferentes para a amostra de plasma, ou seja, baixos níveis de atividade enzimática não podem ser detectados (HOLAS et al., 2012).

Comparando-se as análises realizadas em amostra de solução de eritrócitos e plasma, foi observado que as variações de pH/hora para as amostra não inibidas são nitidamente maiores, sendo este resultado coerente com o método proposto, visto que o pH 2 quando medido é menor pelo fato das colinesterases estarem livres para hidrolisar o substrato, o que gera maior quantidade de ácido acético, que conseqüentemente acidifica mais o meio dos que nas amostras em que houve inibição das colinesterases presentes (DE MORAES MOREAU; DE SIQUEIRA, 2008; STRELITZ; ENGEL; KEIFER, 2014).

6 CONCLUSÃO

As padronizações das metodologias para determinação das atividades das enzimas colinesterases eritrocitária e plasmática pelos métodos espectrofotométrico e potenciométrico foram realizadas com êxito, com obtenção de resultados de análises satisfatórios.

Com as padronizações dos métodos espectrofotométrico e potenciométrico, nas condições do laboratório, pôde-se observar, que os resultados foram adequados considerando-se as amostras com e sem inibição pelo inseticida organofosforado malation. Pôde-se observar que o valor da colinesterase sem inibição foi maior do que nas amostras em que houve inibição. No entanto, o método espectrofotométrico conseguiu estabelecer uma diferença maior no resultado da atividade enzimática quando se analisaram as amostras inibida por 24 horas, realizando comparação com o método potenciométrico.

A padronização dos dois métodos poderá ser utilizada na resolução de casos autênticos quando se desejar obter a atividade da colinesterase em amostras biológicas, como na aplicação durante a realização de aulas práticas da disciplina de análises toxicológicas, auxiliando na melhoria da compreensão e diferenciação entre os métodos propostos.

REFERÊNCIAS

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Perguntas+Frequentes/Agrotoxico+e+Toxicologia/5fbf5580429fa2fd8ff5ef2312e9dd30>(<http://portal.anvisa.gov.br/> acessado em: 01/09/2015).

ALDRIDGE, W. N.; DAVIES, D. R. Determination of cholinesterase activity in human blood. **British medical journal**, v. 1, n. 4765, p. 945, 1952.

AUGUSTINSSON, Klas-Bertil. Determination of activity of cholinesterases. In: **Analysis of biogenic amines and their related enzymes**. Wiley—Interscience New York, 1971. p. 235.

DE OLIVEIRABATISTUZZO, José Antonio; DE ALMEIDACAMARGO, Márcia Maria; OGA, Seizi. **Fundamentos de toxicologia**. 4º ed. Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo: Editora do Grupo Atheneu, 2014.

BIRMAN, Serge. Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. **Biochem. J**, v. 225, p. 825-828, 1985.

BOCHNER, Rosanyet al. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas—SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **CienSaudeColet**, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.

BOLOGNESI, Claudia. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

CHOWDHARY, Sheemona; BHATTACHARYYA, Rajasri; BANERJEE, Dibyajyoti. Acute organophosphorus poisoning. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 66-76, 2014.

COCKER, J. et al. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. **Toxicology letters**, v. 134, n. 1, p. 97-103, 2002.

CUARTERO, M. et al. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. **Analytical biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 208-212, 2012.

DARVESH, S.; WALSH, R.; KUMAR, R.; CAINES, A.; ROBERTS, S.; MAGEE, D.; ROCKWOOD, K.; MARTIN, E. Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, 17:117-126, 2003.

DAVIES, D. R.; RUTLAND, J. P. The electrometric method of Michel for the estimation of cholinesterases. **The Biochemical journal**, v. 47, n. 2, p. xxii, 1950.

DE ANDRADE FILHO, Adebald; CAMPOLINA, Délio; DIAS, Mariana Borges. **Toxicologia na prática clínica**. Folium, 2001.

DE MORAES MOREAU, Regina Lúcia; DE SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos. **Toxicologia analítica**. Guanabara Koogan, 2008.

DOMINGUES, Mara Regina et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Semina:**

Ciências Biológicas e da Saúde, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004

DOS SANTOS, Aline Carré; MOSTARDEIRO, Clarice Pinheiro. PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DA COLINESTERASE PLASMÁTICA. **Revista Contexto & Saúde**, v. 8, n. 14/15, p. 23-30, 2013.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

HARLIN, K. S.; ROSS, P. F. Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, n. 4, p. 616-619, 1989

HOLAS, Ondrej et al. The progress in the cholinesterase quantification methods. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7, n. 12, p. 1207-1223, 2012.

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009**. World Health Organization, 2010.

JAEGER, Xavier de. **Modelos animais de disfunção colinérgica: papel da acetilcolina na cognição**. 2010. 160 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LINARES, Carlos Eduardo Blanco et al. NÍVEIS BASAIS DE ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE EM AGRICULTORES DA REGIÃO DE FREDERICO WESTPHALEN-RS. **Saúde (Santa Maria)**, v. 31, n. 1 e 2, p. 47-51, 2005.

MAGNOTTI, Ralph A. et al. Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterases. **Clinica Chimica Acta**, v. 176, n. 3, p. 315-332, 1988.

MIAO, Yuqing; HE, Nongyue; ZHU, Jun-Jie. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. **Chemical reviews**, v. 110, n. 9, p. 5216-5234, 2010.

MICHEL, Harry O. et al. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. **Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 34, p. 1564-1568, 1949.

MIDIO, Antonio Flavio; SILVA, Erasmo Soares da. **Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos**. Roca, 1995

POHANKA, Miroslav. Voltammetric assay of butyrylcholinesterase in plasma samples and its comparison to the standard spectrophotometric test. **Talanta**, v. 119, p. 412-416, 2014.

RAINBIRD, Graeme; O'NEILL, David. Occupational disorders affecting agricultural workers in tropical developing countries: results of a literature review. **Applied ergonomics**, v. 26, n. 3, p. 187-193, 1995.

RIENER, Christian K.; KADA, Gerald; GRUBER, Hermann J. Quick measurement of protein

sulphydryls with Ellman's reagent and with 4, 4'-dithiodipyridine. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 373, n. 4-5, p. 266-276, 2002.

ROSS, John H. et al. Could pesticide toxicology studies be more relevant to occupational risk assessment?. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 45, n. suppl1, p. S5-S17, 2001.

SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005.

SIMPSON, Richard J. Estimation of Free Thiols and Disulfide Bonds Using Ellman's Reagent. **CSH protocols**, v. 2008, p. pdb. prot4699-pdb. prot4699, 2007.

SINKO, Goran et al. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. **Analytical biochemistry**, v. 370, n. 2, p. 223-227, 2007.

SILK, Elsie; KING, J.; WHITTAKER, Mary. Assay of Cholinesterase in Clinical Chemistry Prepared for the Scientific and Technical Committee of the Association of Clinical Biochemists. **Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine**, v. 16, n. 1-6, p. 57-75, 1979.

SOREQ, Hermona; SEIDMAN, Shlomo. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SPIEWAK, Radoslaw. Pesticides as a cause of occupational skin disease in farmers. **Ann Agric Environ Med**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2001.

STRELITZ, Jean; ENGEL, Lawrence S.; KEIFER, Matthew C. Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers. **Occupational and environmental medicine**, v. 71, n. 12, p. 842-847, 2014.

THIERMANN, Horst et al. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. **Chemico-biological interactions**, v. 157, p. 345-347, 2005.

THIPHOM, Sarunya et al. A method for measuring cholinesterase activity in human saliva and its application to farmers and consumers. **Analytical Methods**, v. 5, n. 18, p. 4687-4693, 2013

WOREK, Franz et al. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, v. 214, n. 3, p. 182-189, 2005.

WOREK, Franz; EYER, Peter; THIERMANN, Horst. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. **Drug testing and analysis**, v. 4, n. 3-4, p. 282-291, 2012.