

Artigo Original

Avaliação da Estabilidade da Enzima Acetilcolinesterase em Amostras de Sangue Frescas e Congeladas

Evaluation of Acetylcholinesterase Stability in Fresh and Frozen Blood Samples



<http://dx.doi.org/10.18316/sdh.v9i3.7711>

Patrícia Stahl¹, Danieli Benedetti^{1,2}, Juliana Da Silva^{1,2*}

RESUMO

Objetivo: avaliar a estabilidade da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em amostras de sangue frescas e congeladas.

Materiais e Métodos: a amostra foi composta por um *pool* de voluntários no qual foi determinada a atividade da AChE. A atividade foi determinada na amostra sem contaminação pelo agrotóxico Diazinon 0,07M (P0/control) e em três níveis de inibição pelo composto: P1 (7×10^{-3} M), P2 ($5,7 \times 10^{-3}$ M) e P3 (4×10^{-3} M). Avaliou-se a estabilidade das amostras frescas no dia da coleta, bem como 24 e 72 horas após a coleta. As amostras congeladas foram avaliadas após 3, 6 e 8 dias de congelamento. **Resultados:** nas amostras frescas a estabilidade do controle foi de 24 horas

e nas amostras contaminadas com agrotóxico apresentaram menor estabilidade e maior inibição da AChE com o passar do tempo. As amostras congeladas apresentaram boa estabilidade durante 8 dias. Não foi observada diferença significativa entre a atividade da AChE em amostras frescas e congeladas no 3º dia, porém as amostras frescas não foram estáveis. **Conclusão:** o processamento das amostras frescas pode ser realizado até o 3º dia e as amostras congeladas, embora necessitem de mais testes compreendendo 24 e 48 horas de congelamento, podem ser utilizadas até 8 dias.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase; Estabilidade; Agrotóxicos; Amostras Frescas; Amostras Congeladas; Exposição Ocupacional.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the stability of acetylcholinesterase (AChE) enzymatic activity in fresh and frozen blood samples. **Materials and Methods:** the sample consisted of a pool of volunteers in which AChE activity was determined. Activity was determined in the sample without contamination by the 0.07M Diazinon pesticide (P0/control) and at three levels of compound inhibition: P1 (7×10^{-3} M), P2 (5.7×10^{-3} M) and P3 (4×10^{-3} M). The stability of fresh samples on the day of collection, as well as 24 and 72 hours after collection was evaluated. Frozen samples were evaluated after 3, 6 and 8 days of freezing. **Results:** in fresh samples the control stability was 24 hours and the pesticide contaminated samples showed lower stability and greater inhibition of AChE over time. The frozen samples showed good stability for 8 days. There was no significant

¹ Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

² Laboratório de Genética Toxicológica, PPG em Saúde e Desenvolvimento Humano (PPGSDH), Universidade La Salle (UniLaSalle), Canoas, RS, Brasil.

***Autor Correspondente:** Laboratório de Genética Toxicológica, PPG em Saúde e Desenvolvimento Humano (PPGSDH), Universidade La Salle (UniLaSalle), Av. Victor Barreto, 2288, Centro - Canoas RS, Brasil, 92010-000.

E-mail: juliana.silva@unilasalle.edu.br

Submetido em: 19.10.2020

Aceito em: 16.02.2021

difference between AChE activity in fresh and frozen samples on day 3, but fresh samples were not stable. **Conclusion:** and the processing of the fresh samples can be carried out until the 3rd day and the frozen samples, although requiring further testing including 24 and 48 hours freezing, can be used for up to 8 days.

Keywords: Acetylcholinesterase; Stability; Pesticides; Fresh Samples; Frozen Samples; Occupational Exposure.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é classificado como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo¹. Os agrotóxicos podem ser classificados conforme sua constituição química, destacando-se os compostos organofosforados (OPs) e carbamatos (CBs)^{1,2}. OPs e CBs estão entre as classes de agrotóxicos mais usadas atualmente, o que se torna um grave problema quando se sabe que esses compostos abrangem os agrotóxicos responsáveis pelo maior número de intoxicações e mortes no Brasil^{1,3,4}. O Diazinon é um agrotóxico do grupo químico dos OPs e faz parte da classe de uso inseticida⁵, seu uso é amplo na agricultura e na pecuária⁶.

Compostos OPs e CBs são conhecidos por agirem como agentes neurotóxicos^{2,7}, inibindo a atividade de enzimas denominadas colinesterases (ChEs), tais como acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), exercendo uma atividade anticolinesterásica. Como outros OPs, a principal ação tóxica do Diazinon é a inibição da atividade da AChE, resultando na neurotoxicidade⁸. Estudos ainda demonstram que o Diazinon exerce efeitos danosos sobre o DNA e tóxicos em vários sistemas do corpo^{2,9,10}.

O mecanismo de ação dos compostos OPs e CBs se baseia na ligação com o sítio ativo da AChE, com fosforilação para OPs e carbamilação no caso dos CBs, resultando na inibição da enzima⁵. O complexo de interação composto tóxico-ChE pode ser definido como reversível ou irreversível. OPs geralmente formam complexos mais estáveis, mais característicos de uma inibição irreversível com as enzimas AChE e BChE, enquanto os CBs tendem a formar complexos menos estáveis e reversíveis^{2,11}. Agentes anticolinesterásicos, como OPs e CBs, têm a propriedade de retardar

a degradação da ACh, uma vez que inibem as colinesterases, assim o neurotransmissor permanece por mais tempo na fenda sináptica, intensificando a transmissão colinérgica⁹. A permanência de ACh na fenda sináptica gera um acúmulo do neurotransmissor, ocasionando um quadro de hiperestimulação com sintomas característicos, tais como sudorese, náuseas, cólicas abdominais, diarreia e bradicardia, podendo chegar a convulsões e até coma^{11,12}.

A forma de diagnóstico mais difundida e de baixo custo consiste na determinação da atividade da AChE, pelo método desenvolvido por Ellman et al.¹³ utilizando espectrofotometria. Esta determinação é considerada uma ferramenta adequada para o diagnóstico de exposições e intoxicações por OPs, a partir do uso de amostras de sangue total frescas dos indivíduos expostos^{12,14}. Uma vez que a determinação enzimática da atividade da AChE, ou colinesterase verdadeira, é geralmente considerada método mais sensível e específico, quando comparado com o da BChE¹⁵, o que a torna mais adequada para utilização na avaliação de exposição e diagnóstico de intoxicações a agentes anticolinesterásicos¹⁶. A AChE apresenta melhor especificidade, pois reflete melhor a atividade da enzima no sistema nervoso, em virtude de sua similaridade funcional com a enzima que se encontra nas placas motoras e nas sinapses. Além disso, apresenta maior sensibilidade em relação à gravidade do quadro clínico, uma vez que sua meia vida é maior em relação a BChE, corresponde a dos eritrócitos, de cerca de 120 dias. Dessa forma, pode ser considerado um bom biomarcador de exposição crônica para os casos de monitoramento biológico, visto que as concentrações eritrocitárias levam mais tempo para diminuir quando comparadas às concentrações séricas de BChE, e necessitam de mais tempo para normalização após a exposição^{11,17,18}.

O monitoramento de agricultores expostos de forma crônica a compostos anticolinesterásicos e o conhecimento quanto aos riscos que tais substâncias podem causar na saúde destes indivíduos manifestam a necessidade de se determinar a atividade da AChE eritrocitária, como forma de avaliar a exposição. Contudo, em casos de agricultores expostos é fundamental, ainda, que a metodologia empregada permita a análise de amostras congeladas, visto que, na

maioria das vezes, as áreas de monitoramento para os indivíduos expostos aos agrotóxicos se concentram em zonas rurais, sendo difícil portanto a avaliação de AChE em amostras frescas. Por isso, o uso de amostras congeladas poderia ser viável, sem comprometimento ou possíveis interferências na determinação da atividade da enzima. A técnica utilizada na rotina não prevê congelamento, sendo as amostras processadas em até 24 horas. Assim, este trabalho se justifica pela necessidade da utilização de um método de determinação da atividade da AChE que permita o congelamento prévio das amostras para posterior análise, admitindo tempo maior até o processamento e eliminando possíveis interferentes adquiridos durante o transporte, o que garante resultados de maior confiabilidade. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade da atividade enzimática da AChE em amostras de sangue frescas e congeladas, determinando desde a coleta e fase pré-analítica, qual o período que estas podem ser processadas sem comprometer a fase analítica da AChE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

Trata-se de um estudo de caráter experimental cuja amostra foi composta por oito voluntários não expostos a agentes anticolinesterásicos, saudáveis, não-fumantes, com idade maior que 18 anos e sem histórico de patologias crônicas, sendo quatro homens e quatro mulheres. Destes, obteve-se 5 mL de sangue total, por meio de punção venosa, em tubo contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram coletadas na cidade de Santa Cruz do Sul (RS) e processadas no Laboratório de Genética Toxicológica e no Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento - CEPED da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Os voluntários foram informados do objetivo da pesquisa e convidados a participar, sendo incluídos no estudo após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 1). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA - Canoas), sob parecer nº 3.363.594, CAEE 13898619.0.0000.5349.

Preparo das amostras e princípio do método

Para avaliar a estabilidade da AChE em amostras frescas e congeladas foi utilizado um *pool* de amostras de sangue total dos voluntários. As amostras frescas foram distribuídas em microtubos e estes armazenados a temperatura de 2 a 8°C. As amostras antes de serem congeladas foram centrifugadas a 3600 rpm por 30 minutos e a fração eritrocitária de cada amostra foi diluída (1:10) com tampão de lise pH 7,6 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM), sendo estocadas a -6°C.

Para o controle positivo das análises foram adotados níveis de inibição utilizando o agrotóxico Diazinon. Foi preparada uma solução 0,07 M de Diazinon (comercial 40 PM; concentrado solúvel estabilizado). A amostra (*pool* de amostras dos voluntários) foi distribuída em microtubos, e as alíquotas acrescidas de solução de Diazinon (por 3 horas antes da análise da atividade enzimática), obtendo-se três concentrações finais: P1= $7,0 \times 10^{-3}$ M; P2= $5,7 \times 10^{-3}$ M; e P3= $4,0 \times 10^{-3}$ M. Além disso, foi considerado como controle negativo da avaliação da AChE amostra sem Diazinon (P0; controle).

Os testes para avaliar a atividade enzimática de AChE em amostras de sangue frescas foram determinadas no dia da coleta (Dia 0), Dia 1 (após 24 horas da coleta) e Dia 3 (72 h após a coleta). Já os testes para avaliar a estabilidade das amostras congeladas, as amostras foram congeladas no Dia 0 e avaliadas após descongelamento nos Dia 3, Dia 6 e Dia 8, conforme descrito por Oliveira-Silva et al.¹⁹. A definição dos dias para realização dos testes com as amostras congeladas foi dada a fim de simular uma situação real, considerando o tempo necessário entre a coleta da amostra em campo, processamento e análise. A temperatura durante as determinações foi definida e controlada em 24 ± 1 °C, assim como a proteção contra a exposição a luz, em virtude da possibilidade de deterioração dos reagentes utilizados. Todas as análises foram realizadas em duplicata cujo objetivo foi avaliar a inibição da amostra pelos compostos anticolinesterásicos.

A metodologia tem como fundamento o método proposto por Ellman et al.¹³ e modificado por Harlin e Ross²⁰, que se baseia na taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, substrato da reação, pela enzima AChE dando origem à tiocolina. A tiocolina liberada reage com o ânion

carboxilato do ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB), formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptopicolina e um composto de coloração amarela, o 5-tio-2-nitrobenzoato, que é quantificado por espectrofotometria visível num comprimento de onda de 412 nm. A variação de absorbância por minuto é diretamente proporcional à atividade enzimática¹². A modificação proposta por Harlin e Ross²⁰ compreende alterações referentes à diluição da amostra e concentração de DTNB adicionada ao ensaio.

Teste de estabilidade e atividade de AChE em amostras de sangue frescas

A dosagem de AChE nas amostras de sangue frescas foi realizada com base no método de Ellman et al.¹⁸, modificado por Harlin e Ross²⁰, seguindo protocolo estabelecido e implantado no Centro de Informação Toxicológica do RS (CIT RS)²¹.

A atividade da AChE foi quantificada no Dia 0 (dia da coleta), no Dia 1 (24 horas após a coleta) e no Dia 3 (72 horas após a coleta) para as amostras de sangue P0 (controle sem contaminação), P1, P2 e P3 (P1-3 com Diazinon). O *pool* correspondente ao Dia 0 foi imediatamente diluído (1:10) com tampão fosfato 0,1M pH 8,0 (NaH₂PO₄ 0,1M e KH₂PO₄ 0,1M), com o objetivo de se obter uma suspensão estável de células sanguíneas. Como forma de evitar interferentes com a colinesterase plasmática (BChE), foi empregada uma solução de sulfato de quinidina. Foi adicionada à mistura o reagente de cor DTNB, que permite a medida colorimétrica da velocidade de hidrólise do substrato pela colinesterase eritrocitária.

A mistura foi homogeneizada e distribuída em duas cubetas semi-micro para a quantificação espectrofotométrica e foi ajustado o zero de absorbância à 412 nm. Uma solução de iodeto de acetiltiocolina foi usada como substrato da reação, uma vez que é um análogo do substrato natural, e adicionada em uma das cubetas. A leitura das absorbâncias foi realizada a cada minuto, durante 4 minutos. Foi utilizada como resultado para o cálculo final da atividade, como demonstrado a seguir, a média dos valores resultantes das diferenças entre as absorbâncias obtidas (ΔA).

Atividade da enzima (kU/L)	$\Delta A \times 132,35$
Equivalência de unidades	1 U/mL=1 kU/L=1000 U/L

Onde: ΔA = variação na absorbância/min. E, **132,35** = coeficiente de extinção molar da enzima.

O procedimento foi repetido às 24 horas (Dia 1) e 72 horas (Dia 3) após a coleta.

Teste de estabilidade e atividade de AChE em amostras de sangue congeladas

O método para determinação da atividade da AChE em amostras de sangue congeladas foi baseado no proposto por Ellman et al.¹³ e modificado por Oliveira-Silva et al.¹⁹ e Bastos et al.²², com pequenas modificações. No momento da análise, a alíquota foi descongelada previamente em temperatura ambiente e homogeneizada. As amostras foram descongeladas 3, 6 e 8 dias após o congelamento (Dia 3, Dia 6 e Dia 8).

Após descongelamento, a fração celular foi centrifugada a 3600 rpm por 30 minutos para retirada do tampão, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado, constituído de membranas, ressuspenso em tampão de lise novamente. O processo foi repetido por mais duas vezes, como forma de eliminar qualquer interferência provocada pela hemoglobina em casos de hemólise. Após a terceira centrifugação, retirou-se o sobrenadante e foi adicionado tampão de análise (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 120 mM, pH 7.6) ao precipitado. A dosagem de AChE em amostras congeladas foi realizada como descrito anteriormente para amostras frescas, com alteração a partir da etapa onde é adicionado DTNB, onde é adicionado etanol 10% (C₂H₆O), a fim de estabilizar a solução. O mesmo procedimento foi realizado no Dia 6 e no Dia 8 após a coleta, para determinação de AChE em amostras congeladas.

Análise estatística

Os resultados dos testes foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os períodos diferentes de execução dos testes e as diferentes concentrações do Diazinon utilizado no teste de estabilidade, foram determinadas pela Análise de Variância One-Way (ANOVA). Já a diferença entre a atividade

da AChE em amostras frescas e congeladas foi realizada por meio do Teste *t-Student*, podendo ser corrigidos por Welch. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico *Graphpad PRISM 5.0*.

RESULTADOS

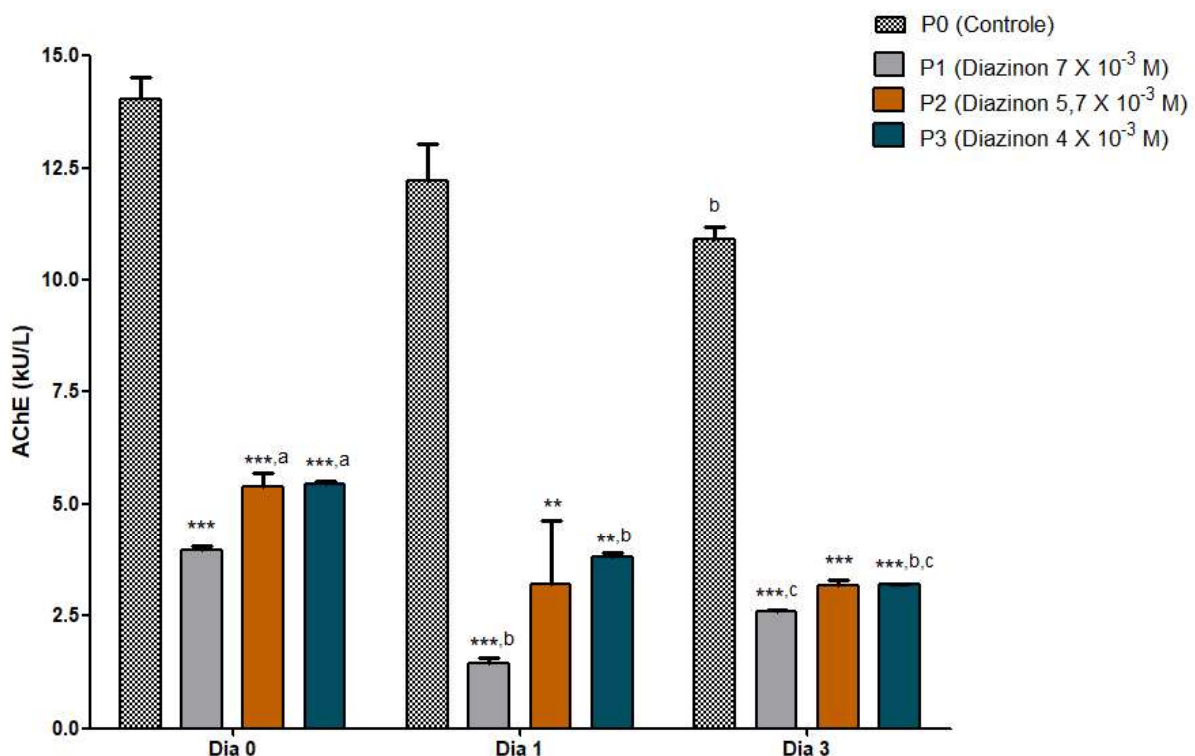
Testes de estabilidade: amostras frescas

No Dia 0 (dia da coleta), a atividade da AChE avaliada na amostra controle, P0 (não contaminada com Diazinon), mostrou diferença significativa quando comparada com a atividade enzimática nas três amostras contaminadas: P1, P2 e P3, com inibições de 71,7%; 61,6% e 61,2%, respectivamente. Assim, nota-se uma redução significativa da atividade enzimática quando a amostra é contaminada por um composto OP nas diferentes concentrações, como observado na Figura 1. No Dia 0 ainda, a amostra P1, variou significativamente ($p < 0,05$) em relação as amostras P2 e P3 (Figura 1).

Em relação a estabilidade da AChE, podemos observar na Figura 1 ao comparar a atividade da enzima nas diferentes amostras ao longo dos dias, que a amostra P0 (controle) apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) em sua atividade no Dia 3, representando 22,2% de inibição. Perda da na atividade da AChE também pode ser observada na figura para as amostras P1 e P3.

Em relação à avaliação da atividade enzimática do Dia 1, a Figura 1 mostra após 24 horas da coleta, a atividade enzimática da AChE nas amostras P1, P2 e P3 continuou apresentando uma inibição significativa induzida pelo Diazinon: 88,2%; 73,7% e 68,7%, respectivamente, quando comparada com a amostra P0. Ainda com base nesta figura, observa-se que no 3º dia a atividade da AChE permaneceu inibida de forma significativa nas amostras P1, P2 e P3: com 76,1%; 71,0% e 70,6% de inibição, respectivamente, comparando-se com a sua atividade na amostra P0. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras P1, P2 e P3 para os dias 1 e 3.

Figura 1. Atividade enzimática da AChE (kU/L) nas amostras frescas P0 e contaminadas com diferentes concentrações de Diazinon (P1, P2 e P3) nos Dias 0, 1 e 3 (média \pm erro padrão). Teste ANOVA/Tukey: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao P0 (controle; amostra sem Diazinon do respectivo dia); ^a $p < 0,05$ quando comparado ao P1 do respectivo dia de tratamento; ^b $p < 0,05$ quando comparado com a mesma concentração do Dia 0; ^c $p < 0,05$ quando comparado com a mesma concentração do Dia 1.



Testes de estabilidade: amostras congeladas

Resultados referentes às amostras descongeladas no 3º dia do congelamento para P0, P1, P2 e P3 podem ser observados na Figura 2. Diferença significativa da atividade da AChE em P0 quando comparada com os níveis de inibição em P1 e P3, nos quais verifica-se 81,6% e 65,0% de redução da enzima, respectivamente. Também pode ser observado, que após 6 dias estando em congelamento, a atividade da enzima na amostra P0 demonstrou diferença significativa quando comparada com a atividade dos controles P1, P2 e P3, apontando uma inibição em todas as concentrações de agrotóxico: 74,6%; 64,6% e 58,6%, respectivamente. Em relação a estabilidade da AChE após 8 dias da coleta observamos que a atividade enzimática nas amostras P1, P2 e P3 congeladas continuou apresentando uma inibição significativa pelo composto anticolinesterásico: 69,4%; 59,2% e 33,4%.

Atividade de AChE em amostras frescas e congeladas

A atividade da enzima AChE foi avaliada concomitantemente em amostras frescas e congeladas no 3º dia (72 horas após a coleta). Na Figura 3 observa-se que a atividade da enzima não variou significativamente entre as amostras P0, P1, P2 e P3, frescas e congeladas, verificando a estabilidade da enzima apesar de ter sido mantida sob congelamento durante 3 dias. É importante lembrar que a amostra fresca P0 do Dia 3 já apresentava redução na atividade da AChE, em comparação com a amostra fresca do Dia 0 (linha tracejada da Figura 3; comparação estatística na Figura 1). As diferenças significativas entre P1, P2 e P3 em relação a P0 para o Dia 3 (fresca e congelada) podem ser observadas nas Figuras 1 e 2 ($p < 0,05$).

Figura 2. Atividade enzimática da AChE (kU/L) nos Dias 3, 6 e 8 após congelamento das amostras (P0, sem contaminação com Diazinon) e contaminadas (P1, P2 e P3) com diferentes concentrações de Diazinon 0,07M (2%). Valores apresentados: média \pm erro padrão. Teste ANOVA/Tukey: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com a atividade da amostra P0 do respectivo dia; $^a p < 0,05$ quando comparado com a amostra P1 do respectivo dia.

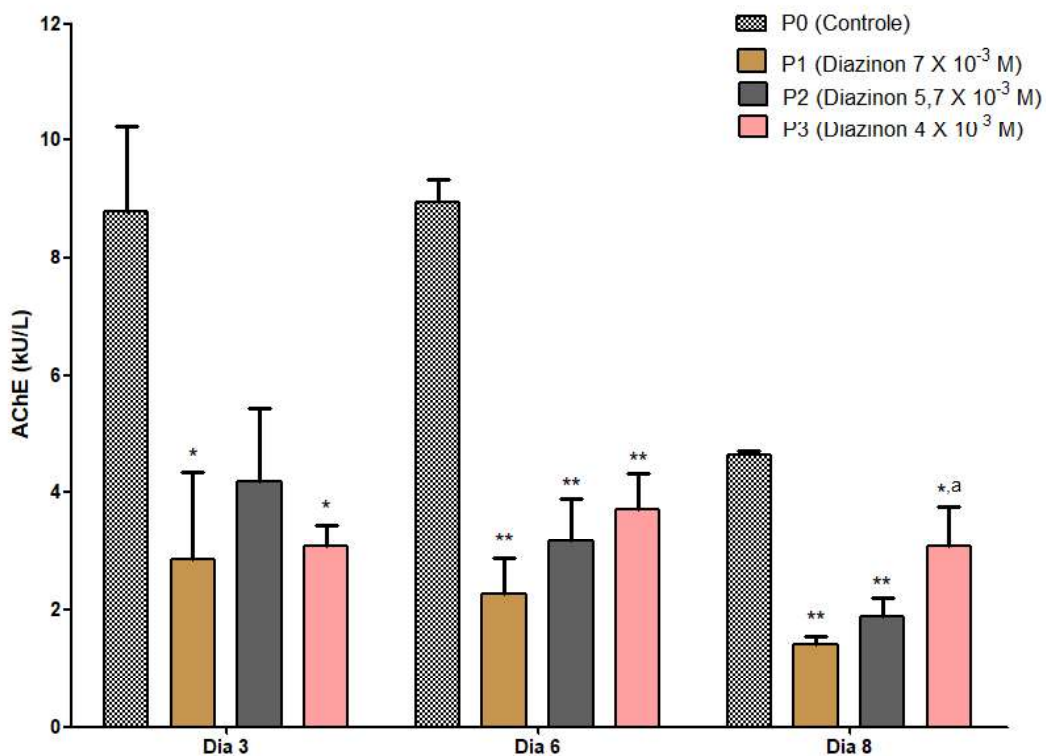
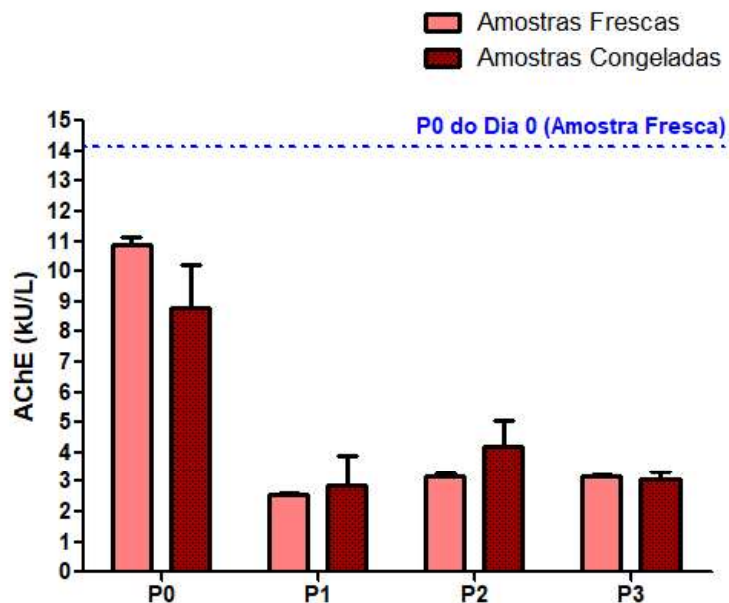


Figura 3. Atividade enzimática da AChE (kU/L) nas amostras frescas e contaminadas (Dia 3) com diferentes concentrações de Diazinon em relação à atividade da enzima nas amostras congeladas sem contaminação (P0) e contaminadas com diferentes concentrações de Diazinon (P1, P2 e P3).



DISCUSSÃO

Sabe-se que atualmente os trabalhadores agrícolas estão expostos a elevados riscos de intoxicação em virtude do contato direto com agrotóxicos. O risco ocupacional da exposição, principalmente de OPs e CBs reside no fato de que esses compostos podem causar efeitos adversos principalmente no Sistema Nervoso Central (SNC)⁷. Tais compostos são conhecidos por inibirem colinesterases (AChE, BChE), responsáveis em modular o impulso nervoso nas fendas sinápticas, desencadeando o quadro de intoxicação^{7,12,15,19}. Avaliar o risco ocupacional é uma necessidade principalmente porque, grande parte dos indivíduos são expostos desde a infância de forma contínua e frequente a doses baixas e de maneira crônica²³.

No Brasil, as normas NR7 e NR31 estabelecem que trabalhadores agrícolas, devem realizar exames médicos periódicos, com o objetivo de avaliar a exposição ocupacional aos OPs e CBs^{24, 25}. A avaliação da exposição se baseia, geralmente, na avaliação da atividade das enzimas AChE e BChE no sangue, por meio da dosagem de AChE eritrocitária e da determinação da atividade sérica da BChE¹⁵. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o monitoramento da exposição ocupacional por compostos OPs e CBs, seja realizado por meio

da determinação da atividade da enzimas e que tenham como base a inibição da AChE no sangue, em amostras de sangue total frescas, utilizando o método de Ellman et al.^{13, 19, 26, 27}. Entretanto, deve ser considerado que ocorrem distâncias consideráveis entre as áreas de exposição em zonas rurais e os laboratórios especializados o que torna cada vez mais necessária a utilização de um método que permita o congelamento das amostras, de forma a minimizar interferentes adquiridos durante o transporte e a fase pré-analítica do teste⁷. Neste estudo comparamos amostras coletadas e analisadas no mesmo dia, e até 3 dias após mantidas refrigeradas, bem como congelamos as amostras por até 8 dias para realizar as comparações, buscando um maior período entre a coleta e a análise, e as condições que resultassem em uma análise confiável.

A amostra P0 fresca (sem contaminação por OP) apresentou uma estabilidade da atividade de AChE, no período desde o dia 0 até 24 horas sob armazenamento a temperatura de 2° a 8°C. Observa-se que após 72 horas já se observa uma redução da enzima de forma significativa. Como já relatado anteriormente, as recomendações são realmente para amostras frescas visto a perda da atividade da enzima¹⁵. Apesar disto, este estudo foi capaz de demonstrar que a diferença entre amostras contaminadas e não contaminadas permaneceu, o que demonstrou que mesmo não

sendo o ideal, as análises podem ser realizadas e podem auxiliar na detecção de intoxicações. Todas as amostras continham Diazinon nas diferentes concentrações permaneceram demonstrando redução da enzima no decorrer dos dias. Somente a menor concentração do Dia 1 e Dia 3 demonstraram uma redução da atividade enzimática em relação ao Dia 0, mas sem deixar de ser significativa a diferença em relação ao P0 do respectivo dia. Muitos autores relacionam o efeito de inseticidas sobre a AChE em agricultores, o que caracteriza a exposição crônica desses trabalhadores aos compostos^{2, 15, 28, 29}. Cabe ressaltar ainda a importância na calibração dos equipamentos, para que a atividade da enzima seja reproduzida fielmente, tais como temperatura, pH, estabilidade dos reagentes utilizados e tempo de contato entre a enzima e o substrato^{30, 31}. Estudos anteriores relatam ainda que a exposição a diferentes classes de agrotóxicos pode induzir o processo de estresse oxidativo em agricultores³². Esse fato favorece o acúmulo de radicais livres que são gerados no interior do eritrócito, resultando em peroxidação lipídica nas membranas eritrocitárias^{33, 34}, assim levando a redução indireta da atividade da enzima.

No presente trabalho também se observou a estabilidade das amostras congeladas (P0, P1, P2 e P3) até o 6º dia após a coleta e o armazenamento à -6°C. O 8º dia apresenta uma redução na atividade da enzima em todos os grupos, apesar desta redução não ser significativa. Nossos achados estão de acordo com Oliveira-Silva et al.¹⁹, que realizaram um teste de estabilidade enzimática para AChE em amostras de sangue congeladas durante 28 dias e encontraram uma boa estabilidade para a enzima durante os primeiros 7 dias. A principal interferência ocasionada durante o transporte e armazenamento das amostras diz respeito a presença de hemólise. A ruptura das células vermelhas do sangue leva ao extravasamento de diversos constituintes, incluindo a hemoglobina. A hemoglobina possui a absorvância no mesmo comprimento de onda (410 nm) que o DTNB, composto responsável por quantificar a atividade enzimática da AChE no método de Ellman et al.¹³. Dessa forma, utilizamos o método de Oliveira-Silva et al.²⁴, onde realizamos o congelamento das amostras após as lavagens sucessivas com tampão que remove grande parte dos possíveis resquícios de hemoglobina, que poderiam gerar interferências colorimétricas^{7, 22}.

A utilização de um método sem a completa lise e posterior centrifugação das hemácias poderia levar a resultados falso-positivos⁷.

Não foram encontrados achados na literatura que estabelecessem uma comparação entre a atividade da enzima em amostras frescas e congeladas, entretanto, Oliveira-Silva et al.¹⁹, avaliou a atividade da enzima numa população rural do sudeste do Brasil em amostras de sangue congeladas e identificou que 41,8% dos trabalhadores encontravam-se intoxicados por agrotóxicos, demonstrando a eficácia do método mesmo após o congelamento da amostra. Em nosso estudo, é possível observar que a atividade da AChE se manteve estável em amostras congeladas ao ser avaliada ao longo dos dias testados. No entanto, é importante destacar que a amostra fresca no 3º dia já havia apresentado uma redução na atividade quando comparada ao dia da coleta (Dia 0). Assim, não se pode afirmar de forma clara que o método de congelamento foi eficaz em manter a estabilidade da enzima. Desse modo, é necessário que sejam realizados testes adicionais que compreendam os dias que antecedem o 3º dia de congelamento de tais amostras (24 e 48 horas).

Outro achado importante deste estudo foi o fato de que o composto OP Diazinon inibiu significativamente a atividade da enzima AChE *in vitro*, simulando um quadro de intoxicação por tais substâncias, como já comprovado por diferentes estudos, que determinaram a atividade da enzima em trabalhadores agrícolas expostos aos agrotóxicos e em indivíduos não expostos^{13, 14, 28}. Podendo ser utilizada esta contaminação *ex vivo* como um controle externo das análises, quando se opte por um congelamento ou por mais dias após a coleta das amostras.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam que o processamento de amostras de sangue frescas seja realizado preferencialmente em um prazo de até 24 horas. Além disto, se a opção for por amostras congeladas, devido a distância do local de amostragem e laboratório, recomenda-se a remoção de interferentes provindos da hemólise resultante do transporte das amostras, e processamento até 6 dias após congelamento. Conclui-se que o método, tanto

em amostras congeladas quanto em amostras frescas, foi capaz de refletir inibição significativa quando a amostra foi contaminada por composto anticolinesterásico nos diferentes níveis testados. Desta forma, sugere-se o uso do Diazinon (contaminação *ex vivo*) como controle externo na avaliação de amostras congeladas. Novos estudos são necessários, buscando confirmar a eficácia da metodologia de congelamento das amostras em campo, ou seja, utilizar como população de estudo trabalhadores expostos aos agrotóxicos capazes de inibir a atividade da enzima a fim de observar sua funcionalidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Genética Toxicológica, ao Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento (CEPPED, ULBRA) e ao Centro de Informação Toxicológica do RS (CIT RS) pela disponibilização de materiais, reagentes e instalações para realização do presente trabalho, além do apoio financeiro da ULBRA, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- Santana CM, Da Costa AR, Nunes RMP, Nunes NMF, Peron AP, Cavalcante AACM, et al. Exposição ocupacional de trabalhadores rurais a agrotóxicos. *Caderno e Saúde Coletiva*. 2016 Set 12; 24 (3): 301-307.
- Maroni M, Fanetti AC, Metruccio F. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *La Medicina del lavoro*. 2006 Mar 1; 97(2): 430-437.
- King AM, Aaron CK. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emergency Medicine Clinics of NA*. 2015 Fev 1; 33(1): 133-151.
- Silva SMSD. Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento [dissertation]. Coimbra (Portugal): Universidade de Coimbra; 2015.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Índice Monográfico D10 – Diazinona. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D10%2B%2BDiazinona.pdf/2b5d21bd-6881-4e8e-98aa-9b90673cb667>>. Acesso em: jul. 2019.
- International Agency for Research on Cancer – IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Diazinon, v: 112. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono112-09.pdf>>. Acesso em jul. 2019.
- Linhares AG, Assis CRD, Siqueira MT, Bezerra RS, Carvalho Jr LB. Development of a method for extraction and assay of human erythrocyte acetylcholinesterase and pesticide inhibition. *Human & experimental toxicology*, 2013 Abr 30; 32(8): 837-845.
- Čolović M, Krstić D, Petrović S, Leskovac A, Joksić G, Savić J, et al. Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology letters*, 2010: 193(1), 9-18.
- Abdel-Daim MM, Abushouk AI, Alkhalaf MI, Toraih EA, Fawzy MS, Ijaz H, et al. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* on diazinon-induced hemato-biochemical alterations and oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018: 25(27), 27463-27470.
- Freeman LEB, Bonner MR, Blair A, Hoppin JA, Sandler DP, Lubin JH, et al. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. *American journal of epidemiology*, 2005: 162(11), 1070-1079.
- Goodman LS, Gilman AS. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Araújo CRM, Santos VDA, Gonsalves AA. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*. 2016 Nov 11; 8(6): 1818-1834.
- Ellman GL, Courtney K, Featherstone R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961 Nov 14; 7(2):88-95.
- Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PDN, da Mattos RDCO, et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 2001 Fev 5; 35(2): 130-135.

15. Benedetti D, Alves J, Silva FRD, Silva JD. An evaluation of occupational exposures to pesticides in Brazil. *Occup. Med. Health Aff.* 2014 Jul 24; 2(4): 170-176.
16. Linhares AG. Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional [dissertation]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2013.
17. Dos Santos AC, Mostardeiro CP. Padronização de metodologia analítica para avaliação da colinesterase plasmática. *Revista Contexto & Saúde.* 2008 Jan 14; 8(14/15): 23-30.
18. Silva, ES. Inseticidas Organofosforados: Determinação da Atividade de Colinesterases Sanguíneas por Espectrofotometria. *Ciências Farmacêuticas - Toxicologia Analítica.* São Paulo: Guanabara Koogan; 2008.
19. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Inacio AF, Meyer A, Sarcinelli PDN, Mattos RDC, et al. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human & experimental toxicology.* 2000 Mar 1; 19(3): 173-177.
20. Harlin KS, Ross PF. Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists.* 1990 Jul 1; 73(4): 616-619.
21. Filla GS. Validação de método para quantificação da acetilcolinesterase eritrocitária por espectrofotometria visível para exposição à organofosforados [CD-ROM]; 2011.
22. Bastos MDM, dos Anjos Santos VL, de Assis Gonsalves A, Araújo CRM. Avaliação da atividade de aldeídos aromáticos e suas oximas frente à enzima acetilcolinesterase eritrocitária humana. *Acta Brasiliensis.* 2017 Set 27; 1(3):22-27.
23. Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Dos Santos CEI, Da Silva J, et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research.* 2013 Jan 3; 752(1-2): 28-33.
24. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho. NR7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional de 8 de junho de 1978.
25. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho. NR 31- Segurança e saúde no trabalho na agricultura, pecuária silvicultura, Exploração florestal e aquicultura de 03 de março de 2005.26. WHO (World Health Organization). Expert committee on the safe use of pesticides in public health. Technical Report Series 356. Geneva, Switzerland: WHO, 1967.
26. WHO (World Health Organization). Spectrophotometric kit for measuring cholinesterase activity. WHO/VBC/84.888. Geneva, Switzerland: WHO, 1984.
27. Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology Letters.* 2005 Mai 25; 159:13-21.
28. Pasiani JO, Torres P, Silva JR, Diniz BZ, Caldas E. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *International journal of environmental research and public health.* 2012 Ago 24; 9(9): 3051-3068.
29. Leite OD, Fatibello-Filho O, Rocha FR. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. *Química Nova.* 2004 Ago 13; 27(2): 337-341.
30. Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1976 Ago 9; 24(6): 1090-1093.
31. Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clinica Chimica Acta.* 2001 Mar 29; 310(2): 107-112.
32. Panemangalore M, Dowlah HA, Byers ME. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *International archives of occupational and environmental health.* 1999 Mar 1; 72(2): 84-88.
33. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters.* 1999 Jan 31; 107(1-3): 33-47.