

**NÍVEIS BASAIS DE ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE EM
AGRICULTORES DA REGIÃO DE FREDERICO WESTPHALEN – RS.**

***Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase plasmatic
levels in farmers from Frederico Westphalen – RS.***

Carlos Eduardo Blanco Linares¹, Gabriela Dagios³, Magda Regina Carati³, Marcos Paulo Gasparin³, Tatiana Spader², Paulo Guilherme Markus Lopes²; Rodrigo Cordeiro Bolzan¹

RESUMO

A elevada utilização de agrotóxicos, sem os devidos cuidados, tem contribuído em muito para o aumento das intoxicações ocupacionais, sendo hoje, um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro. Entre os pesticidas mais utilizados estão os compostos pertencentes a categoria dos organofosforados que são inibidores da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase com variado grau de toxicidade em seres humanos. Intoxicações por esses compostos podem acarretar diversas alterações sendo a principal e de maior risco ao homem a alteração neuropsicológica. Os dados referentes a utilização de compostos dessa categoria ainda são uma realidade extra-oficial; todavia, motivaram a realização deste estudo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a exposição dos agricultores da área rural de Frederico Westphalen – RS a agrotóxicos inibidores das colinesterases, valendo-se de dados não oficiais quanto ao uso indiscriminado de organofosforados nessa região. As atividades enzimáticas foram avaliadas segundo método de Ellman (1961) modificado. Após a determinação individual das atividades da butirilcolinesterase plasmáticas e acetilcolinesterase eritrocitária de 60 agricultores, verificou-se que 15 (25%) agricultores apresentaram valores de butirilcolinesterase abaixo dos valores de referência obtidos para o grupo controle, ao passo que, todos os agricultores apresentaram valores de acetilcolinesterase inferiores aos valores de referência. Estes resultados são indicadores seguros de uma exposição e/ou intoxicação por pesticidas inibidores de colinesterases.

Palavras-chaves: organofosforados, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase.

Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e da Missões – URI Frederico Westphalen – RS, Brasil.

¹ Professor titular na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Frederico Westphalen. Mestre em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas.

² Alunos do Curso Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM, Santa Maria, RS.

³ Acadêmico(a) do Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Frederico Westphalen.

INTRODUÇÃO

No âmbito da América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxico, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região.¹

A aplicação indiscriminada de agrotóxicos 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.² Entre os agrotóxicos mais utilizados estão os compostos pertencentes à categoria dos organofosforados, que apresentam mecanismos de ação baseado na inibição de acetilcolinesterase e são responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural.³

Estima-se que os agrotóxicos sejam responsáveis por mais de 20 mil mortes não intencionais por ano, sendo que a maioria ocorre nos países pobres, onde se estima que 25 milhões de trabalhadores agrícolas são intoxicados, de forma aguda, anualmente.⁴

A exposição a organofosforados induz, em humanos, síndromes clínicas e alterações bioquímicas.⁵ A intoxicação aguda por organofosforados pode se manifestar através de sintomas muscarínicos, como náusea, sialorréia, visão turva, dispnéia e bradicardia, acompanhados de sintomas nicotínicos como taquicardia, câibras, sudorese e tremores; ou ainda, por manifestações do sistema nervoso central, como cefaléia, convulsões, coma e morte.⁶ De acordo com Mileson (1998)⁷, muitas das ações dos organofosforados sobre o sistema nervoso central parecem estar relacionadas com a organofosforilação da esterase alvo ou com a ligação direta do organofosforado a receptores nicotínicos.

Um valioso indicador da relação entre exposição a agrotóxicos e problema de saúde é a determinação da colinesterase eritrocitária e plasmática. A inibição dessas enzimas por compostos organofosforados leva ao acúmulo de acetilcolina, e o organismo passa a apresentar uma série de manifestações indesejáveis.⁸

A utilização descontrolada de pesticidas ainda é um dado extra-oficial, o que nos motivou a realização deste estudo, cujo objetivo foi avaliar a exposição de agricultores da área rural de Frederico Westphalen –

RS a agrotóxicos inibidores da acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do grupo expostos: as amostras de sangue foram obtidas de 60 agricultores de 20 localidades da região rural do município de Frederico Westphalen-RS associados ao Sindicato de Trabalhadores Rurais do município.

Amostras do grupo controle: foram colhidas 15 amostras de sangue de pessoas não expostas a pesticidas, sediadas na zona urbana de Frederico Westphalen, a fim de se obter os valores de referências locais de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase da região. Participaram número semelhante de homens e mulheres com várias idades, grau de escolaridade superior incompleto e sem patologias cardíacas ou hepáticas. Nenhum participante deste grupo fazia uso de medicação de uso contínuo.

Processamento das Amostras: as amostras de sangue foram coletadas com vacutainer heparinizados através de punção venosa. Após a coleta os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2000 g, sendo que os elementos figurados foram separados do plasma. As amostras de plasma foram estocadas a -20°C até o momento de determinação da atividade enzimática. A fração celular foi ressuspensa e diluída (1:10) em uma solução tampão de fosfato 0,02 mol/L, pH 7,6 (tampão de lise) e estocada a -20°C.

Determinação da atividade de Acetilcolinesterase^{1,9}: as amostras das frações estocadas em freezer foram descongeladas, homogeneizadas e centrifugadas a 4000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, constituído de membrana, ressuspensa em tampão de lise (volume inicial). Esse processo foi repetido por mais duas vezes, sendo o precipitado final suspenso em 0,5 ml de solução tampão de fosfato 0,12 mol/L, pH 7,6 (tampão de análise). As determinações das atividades colinesterásicas foram realizadas de forma cinética, segundo método de Ellman (1961) modificado. Para as determinações da acetilcolinesterase foram colocados 1ml do sistema para acetilcolinesterase (1:4 de solução de DTNB a 0,001 mol/L, em uma solução

tampão fosfato de potássio a 0,1 mol/L, PH 7,0), em tubo de ensaio adicionando-se 750 µl de água destilada. Este tubo foi agitado e pré-incubado por 2 minutos a 37 °C. Posteriormente acrescentou-se 50 µl de membrana de eritrócito resfriado no tubo, sendo o sistema, água e amostra colocados em cubeta para leitura em espectrofotômetro. A reação teve início adicionando-se 200 µl de solução de acetiltiocolina a 0,008 mol/L. A variação da absorbância foi medida a 412 nm seguida por 2 min em espectrofotômetro termotizado. A leitura foi realizada a cada 30 segundos, em um total de 4 leituras para a determinação do ?E.

Determinação da atividade de Butirilcolinesterase: a determinação de butirilcolinesterase plasmática realizada com kit comercial da Wiener.

Dosagem de proteínas¹⁰: a determinação do conteúdo de proteína foi realizado de acordo com o método de Bradford a 595nm. Como padrão foi utilizado albumina bovina 1mg/ml.

Termo de consentimento e ficha de entrevista estruturada: para a realização da pesquisa foi preparado um termo consentimento livre e esclarecido onde todos os participantes assinaram. Todos participantes da pesquisa também responderam uma ficha de entrevista que teve o intuito de eliminar participantes que apresentassem fatores externos que pudessem vir a interferir na atividade das enzimas colinesterases.

RESULTADOS

Os valores de acetilcolinesterase entre agricultores de Frederico Westphalen variaram entre 17,6 – 33 mmol/l de acetiltiocolina/ h / mg/ de proteína. Todos os valores encontrados foram inferiores aos valores de referência determinados a partir de uma população não exposta a pesticidas. Quando feita uma análise do percentual de agricultores que ficaram abaixo do valor mínimo de referência obtivemos que: 59 (98,33%) agricultores ficaram na faixa de mais de 10 % abaixo do valor mínimo de referência, 56 (93,3 %) agricultores ficaram 20 % abaixo, 43 (71,67 %) agricultores ficaram 30 % abaixo e 17 (28,33%) agricultores tiveram valores de mais que 40 % abaixo do valor de referência estipulado a partir da população não exposta a

pesticidas.

Para a butirilcolinesterase plasmática os valores encontrados entre os agricultores variaram de 10,3 – 25,8 U/L, sendo que 15 agricultores ficaram abaixo do valor mínimo de referência estipulado a partir de uma população não exposta. Quando feita uma análise do percentual de agricultores que ficaram abaixo do valor mínimo de referência obtivemos que: 8 (13,33 %) agricultores ficaram na faixa de mais de 10 % abaixo do valor mínimo de referência, 4 (6,67 %) agricultores ficaram 20 % abaixo, 1 (1,67 %) agricultor ficou 30 % abaixo do valor de referência estipulado.

DISCUSSÃO

Após a determinação individual das atividades da butirilcolinesterase plasmáticas e acetilcolinesterase eritrocitária dos 60 agricultores, verificou-se que 15 (25%) dos 60 agricultores evidenciaram níveis abaixo dos valores de referência encontrados para a butirilcolinesterase; similarmente, de acordo com os valores de referência de acetilcolinesterase os 60 (100%) agricultores evidenciaram níveis inferiores aos valores de referência verificados no grupo controle. Apesar das colinesterases estarem alteradas em patologias como alcoolismo e doenças hepáticas, é sabido que a exposição freqüente dos agricultores está relacionada com os níveis de inibição das enzimas; fato que se comprovou em Frederico Westphalen, com os resultados aqui apresentados.

Ao compararmos nossos dados com os encontrados por Oliveira *et al*, (2000)¹¹, Soares *et al*, (2003)¹², e Salvi *et al*, (2003)¹³, verificamos que não estão totalmente de acordo, no entanto, remetem a uma reflexão para que um maior controle no uso de pesticidas seja feito nessa região.

As atividades encontradas para acetilcolinesterase e butirilcolinesterase nos agricultores analisados indicam intoxicações de caráter não recente ou mais provavelmente de exposições sucessivas a doses baixas de agrotóxicos, pois a acetilcolinesterase apresenta uma menor taxa de renovação sanguínea que a butirilcolinesterase, podendo revelar de forma integral esse tipo de exposição.¹ Além disso a enzima butirilcolinesterase plasmática apresenta menor especificidade, maior sensibilidade e reposição que a

acetilcolinesterase eritrocitária reforçando ainda mais a ideia de intoxicações de caráter não recente ou mais provavelmente de exposições sucessivas a doses baixas de agrotóxicos.¹

Assim, mesmo cientes dos possíveis interferentes

sobre a atividade das colinesterases, acreditamos que esta pesquisa demonstrou níveis alarmantes de alterações na atividade dessas enzimas sugerindo, portanto, exposição e/ou intoxicações desses agricultores por pesticidas inibidores de colinesterases.

SUMMARY

The massive use of pesticides and poor care to spray them has been contributing to the increase of the occupational intoxications, being one of the major problems of public health in the Brazilian rural way. Organophosphorates, the most commonly pesticide used in Brazil, inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes resulting in a wide range of human toxicity symptoms. One of the main consequences of the intoxication is neuropsychiatric disorders potentially harmful to the human health. Although pesticides use is unofficial data in rural way from Frederico Westphalen – RS, this fact impelled this study. The aim of this work was to evaluate cholinesterases activities alterations in suspected farmers to high exposure to pesticides. The enzymatic activities were determined by the method of Ellman. Determination of plasmatic butyrylcholinesterase and erythrocyte acetylcholinesterase activity were performed in 60 farmers. Results have shown that butyrylcholinesterase levels for 15 (25%) of the 60 farmers analyzed were lower than to the reference values found for the control group, while all acetylcholinesterase activity values were lower than control group. These data are reliable indicators of a human intoxication for cholinesterase inhibitors pesticides after chronic exposure in agricultural labour.

Key-Words: organophosphorates, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva OJJ, Alves RS, Meyer A, Perez F, Sarcinelli NP, Mattos R, Moreira J. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxico, Brasil. *Revista Saúde Pública*. 2001; 35:130-135.
2. Bowles RG, Webster JPG. Some problems associated with the analysis of the costs and benefits of pesticides. *Crop Protection*. 1995; 14:593-600.
3. Jeyaratnam J, Maroni M. Organophosphorus compounds. *Toxicology*. 1994; 91:15-27.
4. Araújo ACP, Nogueira DP, Augusto LG. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomate. *Revista de Saúde Pública*. 2000; 34:309-313.
5. Peter JV, Cherian AM. Organic insecticides. *Anaesth Intensive Care*. 2000; 28:11-21.
6. Mendes R. *Patologia do Trabalho*. São Paulo: Atheneu, 2003.
7. Mileson BE, Chambers JE, Chen WL, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, et al. Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci*. 1998; 41:8-20.
8. Mariconi FAM. *Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas*. São Paulo: Editora Agronômica, 1980.
9. Ellman GL, Courtney K, Featherstone R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72:248-254.
11. Oliveira GH, Salgado PET, Lepera IS, Larini L. Comparação de dois métodos para determinação da atividade da colinesterase plasmática. *Revista Brasileira de Saúde*. 1974, 19:36-42.
12. Soares W, Almeida RMVR, Moro S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais. *Caderno Saúde Pública*. 2003, 19:1117-1127.

13. Salvi MR, Lara RD, Ghisolfi SE, Portela VL, Dias DR, Souza OD. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicological Sciences*. 2003, 72:267-271.

Endereço para correspondência:
Carlos Eduardo Blanco Linares
Ciências da Saúde
Rua Assis Brasil 788, URI – FW
97400-000, Frederico Westphalen, RS, Brasil
e-mail: clinares@fw.uri.br