

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
CENTRO DE ESTUDOS DE SAÚDE DO TRABALHADOR E ECOLOGIA  
HUMANA

**LEVANTAMENTO FENOTÍPICO DA ATIVIDADE  
DA ENZIMA PARAXONASE EM POPULAÇÕES  
EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS A PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS.**

***André Luiz Oliveira da Silva***

Tese de mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Ciências (área Saúde Pública).

Rio de Janeiro  
2000

Este trabalho foi realizado no laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e ecologia Humana, departamento da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (CESTEH/ENSP/FIOCRUZ), com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
CENTRO DE ESTUDOS DE SAÚDE DO TRABALHADOR E  
ECOLOGIA HUMANA

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E LEVANTAMENTO  
FENOTÍPICO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAXONASE EM  
POPULAÇÕES EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS A PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS.

ANDRÉ LUIZ OLIVEIRA DA SILVA  
Mestrando

JOSINO COSTA MOREIRA  
Orientador

JAIME SILVA DE LIMA  
Co - orientador

Dissertação aprovada em ...../...../.....

Banca examinadora

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a toda minha família, já que sem eles nada disso seria possível.

Ao meu orientador Josino não só pela orientação, mas também pela amizade e por ser um exemplo a ser seguido por todos nós.

Ao meu orientador Jaime, pela orientação e força nas horas mais difíceis.

A minha companheira Daphne, pelo imenso apoio e por me suportar até nos momentos de mau humor.

A todos do laboratório do CESTEHE

Rita, Paula, Marquinho, Kleber, Cris, Cristina Sisino, Ana, Simone, Armando, Fátima Pivetta, Sergio, Alan e a todos os demais do laboratório “lá do fundo”.

Ao meu irmão Jefferson, pela grande força nesta jornada.

A toda família Pagani, por todo apoio dado.

Alexandre, Marcelo, Rogerinho, Rodriguinho, Vitor, Vitinho, Mauricio e a toda galera.

Yngwie Malmsteen, pela trilha sonora.

Ao Tom e a Brida, por estarem sempre me esperando.

Oliveira-Silva, André Luiz  
Comportamento Bioquímico e Levantamento  
Fenotípico da Atividade da Enzima Paraoxonase em  
Populações Expostas e Não Expostas a Pesticidas  
Organofosforados.  
XIV,77 páginas  
Tese de mestrado em saúde Pública, Escola  
Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ.  
1. Paraoxonase. 2. Esterases 3.  
Organofosforados. 4. Tese. I. Fundação Oswaldo  
Cruz. II. Título

Esta Tese é dedicada a todos os trabalhadores  
rurais do Córrego de São Lourenço,  
Nova Friburgo - RJ.

## ABREVIATURAS

$\lambda$  - Comprimento de onda

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

AChE - acetilcolinesterase eritrocitária (EC 3.1.1.7)

BChE - butirilcolinesterase plasmática (EC 3.1.1.8)

DL50 - Dose Letal 50

FAO - Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

HCl - Ácido Clorídrico

HDL - lipoproteína de alta densidade

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Economia

M - Molar

Mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

NaCl - Cloreto de Sódio

$^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

OP - Organofosforados

PAPES - Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde

POX - paraoxonase (EC 3.1.1.8)

RPM - Rotações por minuto

SNC - sistema nervoso central

Tris - Tri - Hidroxi - Amino - metano

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das substâncias segundo via de absorção e toxicidade aguda, expressa em DL50.

Tabela 2 - Relação de alguns dos pesticidas mais utilizados, sua classificação quanto à toxicidade e classe química.

Tabela 3 - Algumas das subclasses mais utilizadas de organofosforados, suas estruturas gerais e exemplos.

Tabela 4 - alguns exemplos de compostos organofosforados utilizados com intuito bélico.

Tabela 5 - Análise descritiva das idades na população do Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo, RJ e no grupo controle.

Tabela 6 - Análise descritiva das atividades da enzima arilesterase do grupo estudado e do grupo controle.

Tabela 7 - Teste T de Student, entre as atividades da enzima arilesterase (expressa em  $\mu$ moles de fenol/ min/ mL de plasma) do grupo estudado e do grupo controle.

Tabela 8 - Análise descritiva da atividade basal da enzima paraoxonase nas populações do Córrego de São Lourenço e da cidade do Rio de Janeiro.

Tabela 9 - Teste T de Student, entre a atividade basal da enzima paraoxonase (expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma) da população do Córrego de São Lourenço e da cidade do Rio de Janeiro.

Tabela 10 - Análise descritiva das atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl do grupo estudado e do grupo controle.

Tabela 11 - Teste T de Student, entre as atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl (expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma) do grupo estudado e do grupo controle.

Tabela 12 - teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl e arilesterase da população do Córrego de São Lourenço.

Tabela 13 - teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl e arilesterase da população da cidade do Rio de Janeiro.

Tabela 14 - teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl, arilesterase, acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática da população da cidade do Rio de Janeiro.

Tabela 15 - teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl, arilesterase, acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática da população do Córrego de São Lourenço.

Tabela 16 - teste t de amostras independentes entre as enzimas paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com nível de atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática.

Tabela 17 - teste t de amostras independentes entre as enzimas paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com nível de atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária.

Tabela 18 - teste t de amostras independentes entre as enzimas paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com a avaliação clínica dos trabalhadores.

Tabela 19 - teste t de amostras independentes entre as enzimas paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com a avaliação clínica dos trabalhadores.

Tabela 20 - Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade basal da enzima paraoxonase.

Tabela 21 - Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase.

Tabela 22 - Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade da enzima arilesterase.

Tabela 23 - Regressão logística das variáveis analisadas em relação com os fenótipos bimodal baseados no percentual de estimulação por NaCl.

Tabela 24 - Distribuição dos fenótipos da população do Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo - RJ.

Tabela 25 - Distribuição dos fenótipos da população da Cidade do Rio de Janeiro, RJ.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de um pesticida organofosforado.

Figura 2: Exemplos de rotas metabólicas do pesticida organofosforado paration no organismo humano.

Figura 3 - Representação esquemática da enzima paraoxonase.

Figura 4: Distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade da enzima paraoxonase.

Figura 5 - Distribuição dos sexos na população estudada.

Figura 6 - Distribuição dos sexos na população do Córrego de São Lourenço.

Figura 7 - Distribuição da idade no Córrego de São Lourenço.

Figura 8 Distribuição da idade na população não exposta.

Figura 9 - Distribuição da atividade da enzima arilesterase na pop. Do Córrego de São Lourenço.

Figura 10 - Distribuição da atividade da enzima arilesterase na pop. Da cidade do Rio de Janeiro.

Figura 11 - Distribuição da atividade basal da enzima paraoxonase na população do Córrego de São Lourenço (Atividade expressa em  $\mu$ moles p-nitrofenol/ min/ mL de plasma).

Figura 12 - Distribuição da atividade basal da enzima paraoxonase na população da cidade do Rio de Janeiro. (Atividade expressa em  $\cdot$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL).

Figura 13 - distribuição das atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl na pop. do Córrego de São Lourenço. (Atividade expressa em  $\mu$ mole de p-nitrofenol/ min /mL de plasma).

Figura 14 - Distribuição da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl na população da cidade do Rio de Janeiro. (Atividade expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma).

Figura 15 - Razão entre a atividade da enzima paraoxonase e da enzima arilesterase (fenótipo), na população do Córrego de São Lourenço.

Figura 16 - Razão entre a atividade da enzima paraoxonase e da enzima arilesterase (fenótipo), na população do Córrego de São Lourenço.

## RESUMO

Atualmente tem se proposto a utilização de indicadores biológicos de susceptibilidade humana a agentes tóxicos. No caso dos pesticidas organofosforados, baseando - se nas diferentes capacidades hidrolíticas de seus fenótipos, e em resultados obtidos em animais de laboratório, a enzima paraoxonase (E. C. 3.1.8.1) tem sido proposta para este fim. A obtenção destes fenótipos da enzima paraoxonase baseia - se na atividade desta enzima estimulada por NaCl e a atividade da enzima Arolesterase. A partir disto, o objetivo principal deste trabalho é a caracterização do comportamento bioquímico desta enzima e a determinação dos fenótipos desta em uma comunidade rural do Córrego de São Lourenço, em Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, e de doadores de um banco de sangue na cidade do Rio de Janeiro - RJ.

Em um grupo de 97 trabalhadores rurais, e de 142 indivíduos na cidade do Rio de Janeiro, a determinação da atividade paraoxonásica foi realizada a partir do método de Eckerson et al. (1983a, 1983b), modificado por Moraes (1997). A dosagem da enzima arilesterase foi feita a partir do método de Lorentz et al. (1979), modificado por Oliveira-Silva et al. (1998).

Como resultado obtivemos os seguintes perfis fenotípicos da enzima paraoxonase no Córrego de São Lourenço: cerca de 44% dos indivíduos apresentava o fenótipo AA (baixa capacidade hidrolítica), aproximadamente 52% apresentava a tipologia AB (capacidade hidrolítica intermediária) e por volta de 4% dos indivíduos apresentava o tipo BB (alta capacidade hidrolítica), já no Rio de Janeiro estes fenótipos se distribuíram da seguinte maneira: 36% dos indivíduos apresentaram o fenótipo AA, 52% foram do tipo AB e 12 % do tipo BB.

## ABSTRACT

Nowadays the utilization of susceptibility biological indicators to toxic agents has been purposed. In the case of organophosphorous pesticides, considering the different hydrolytic capabilities of its phenotypes, and laboratory results obtained in animals, the paraoxonase enzyme (E. C. 3.1.8.1) is a natural candidate to this utilization. These phenotypes were obtained from utilization of paraoxonase and arylesterase enzyme activities. The Main objective of this work is the characterization of biochemical behavior of this enzyme and the determination of these phenotypes in a rural community of Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo – RJ, and blood donors, in Rio de Janeiro city, RJ.

The determination of paraoxonase activity was based in Eckerson's method (1983a, 1983b), modified by Moraes (1997). The determination of arylesterase activity used the Lorentz et al. method, modified by Oliveira-Silva et al. (1998). 97 rural works from Nova Friburgo and 142 blood donors from Rio de Janeiro city formed the study group.

The results show these phenotypes distribution in Córrego de São Lourenço: 44% were AA phenotype (low hydrolytic capability); 52% were AB phenotype (medium hydrolytic capability) and 4% were BB phenotype (high hydrolytic capability). The Rio de Janeiro distribution was: 36 % were AA phenotype, 52% were AB and 12% were BB.

## OBJETIVOS

Um dos objetivos desse trabalho envolve o levantamento de dados a respeito do comportamento bioquímico da enzima paraoxonase e o seu possível papel como indicador de susceptibilidade humana a pesticidas organofosforados.

Um outro objetivo seria o levantamento da distribuição dos fenótipos da enzima paraoxonase em populações brasileiras, por que além de ser um dado fundamental para uma análise a respeito do possível papel como indicador biológico de susceptibilidade, não existe na literatura nenhuma descrição a respeito dessa distribuição em nossa população.

# SUMÁRIO

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - PESTICIDAS	2
1.1.1 - DEFINIÇÃO	2
1.1.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
1.1.3 - CLASSIFICAÇÃO	3
1.1.4 - ASPECTOS HISTÓRICOS	5
1.1.5 - AGENTES ANTICOLINESTERÁSICOS	9
1.1.6 - PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	10
1.1.7 - TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA DE AGENTES ORGANOFOSFORADOS.	13
1.2 - MONITORAMENTO BIOLÓGICO DE EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.	16
1.2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.2.2 - INDICADORES DE DOSE INTERNA	16
1.2.3 - INDICADORES DE EFEITO	17
1.2.4 - INDICADORES DE SUSCETIBILIDADE	18
1.3 - ESTERASES QUE INTERAGEM COM ORGANOFOSFORADOS	19
1.3.1 - ESTERASES B	21
1.3.2 - ESTERASES	23
1.4 – OBJETIVOS	29
2 - MATERIAIS E METODOS	30
2.1 - REAGENTES	31
2.2 - EQUIPAMENTOS	31
2.3 - GRUPO DE INDIVÍDUOS	31
2.3.1 - POPULAÇÃO NÃO EXPOSTA A AGENTES ORGANOFOSFORADOS	31
2.3.2 - POPULAÇÃO EXPOSTA A AGENTES ORGANOFOSFORADOS	32
2.4 - OBTENÇÃO DE DADOS GEOGRÁFICOS, BIOQUÍMICOS, SOCIOECONÔMICOS, HISTÓRICO E PERFIL OCUPACIONAL E CLÍNICO NA REGIÃO DO CÔRREGO DE SÃO LOURENÇO, NOVA FRIBURGO - RJ.	32
2.5 - COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	33
2.6 - DOSAGEM DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS PARAOXONASE E ARILESTERASE.	33
2.6.1 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA ARILESTERASE	33
2.6.2 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE	33

2.6.2.1 - DOSAGEM DA ATIVIDADE BASAL DA ENZIMA PARAOXONASE	34
2.6.2.2 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE ESTIMULADA POR CLORETO DE SÓDIO (NaCl)	34
2.7 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ENZIMA PARAOXONASE NA POPULAÇÃO ESTUDADA.	35
2.7.1 - DISTRIBUIÇÃO BIMODAL	35
2.7.2 - DISTRIBUIÇÃO TRIMODAL	36
2.8 - BANCO DE DADOS, CÁLCULOS ESTATÍSTICOS E GRÁFICOS	36
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 - CONSIDERAÇÕES	38
3.2 - ANÁLISES DESCRITIVAS	39
3.2.1 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXOS NO GRUPO CONTROLE E NA POPULAÇÃO ESTUDADA	40
3.2.2 - DISTRIBUIÇÃO DE IDADE NOS GRUPOS ANALISADOS	41
3.2.3 - ANÁLISE DESCRITIVA DAS ATIVIDADES DA ENZIMA ARILESTERASE NA POPULAÇÃO DO CÔRREGO DE SÃO LOURENÇO E NA POPULAÇÃO DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.	42
3.2.4 - ANÁLISE DESCRITIVA DA ATIVIDADE BASAL E ESTIMULADA POR NaCl DA ENZIMA PARAOXONASE, NA POPULAÇÃO DO CÔRREGO DE SÃO LOURENÇO E DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.	46
3.2.4.1- ATIVIDADE BASAL DA ENZIMA PARAOXONASE	46
3.2.4.2 - ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE ESTIMULADA POR SAL (NaCl)	49
3.2.5 - CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE COM OUTROS FATORES ANALISADOS.	53
3.2.6 - COMPORTAMENTO DA ENZIMA PARAOXONASE EM UMA POPULAÇÃO EXPOSTA	58
3.2.7 - REGRESSÃO LINEAR E LOGÍSTICA DA ENZIMA PARAOXONASE E SEUS RESPECTIVOS FENÓTIPOS COM OS OUTROS FATORES AVALIADOS.	62
3.3 - DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA DA ENZIMA PARAOXONASE NAS POPULAÇÕES DO CÔRREGO DE SÃO LOURENÇO E DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.	68
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

# ***1 - INTRODUÇÃO***

## 1.1 - PESTICIDAS

### 1.1.1 - DEFINIÇÃO

Existem diversas definições para pesticidas na literatura, mas talvez a mais completa e mais utilizada seja a da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas – FAO – que define os pesticidas como: substâncias ou mistura destas utilizadas com o objetivo de prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças animais ou vegetais, espécies indesejáveis de vegetais ou animais que causem dano ou que, de alguma forma interfiram durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos relacionados à agricultura, madeira e seus derivados, rações ou ainda substâncias que possam ser administradas em animais para o controle de insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos. O termo ainda inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecadores ou ainda agentes para prevenir a queda prematura de frutas e substâncias aplicadas à plantação, antes e/ou depois da colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem e/ou transporte. (WHO/ UNEP, 1990).

### 1.1.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Sem dúvida um dos maiores problemas enfrentados quanto ao uso de pesticidas, se deve ao fato que a ação tóxica destas substâncias deveria possuir alta especificidade para os organismos alvo sem causar dano a qualquer outra espécie,

mas infelizmente a maioria destas substâncias não possui qualquer forma de seletividade e ainda possuem toxicidade elevada. Sua manipulação e utilização deveriam ser rigorosamente controladas. Entretanto, na prática, pouca atenção é dada a este tipo de problema, o que atribui aos pesticidas um grau de destaque como poderosos agentes de contaminação humana.

O uso de pesticidas tem aumentado continuamente desde de 1940 e hoje em dia estima-se um consumo anual de entre 2,5 e 3,0 milhões de toneladas, a um custo correspondente a cerca de 20 bilhões de dólares. Sendo que deste montante cerca de 600 mil toneladas são consumidas por países em desenvolvimento (Mowbray, 1975), paradoxalmente, de acordo com a OMS, cerca de um milhão de pessoas sofrem danos graves a saúde e aproximadamente 20 mil morrem por ano em decorrência da exposição não intencional a pesticidas. Levando-se em conta os casos intencionais de exposição (suicídios e homicídios) estes números sobem para aproximadamente três milhões de intoxicados e cerca de 220 mil mortes/ano, das quais 99 % ocorrem em países em desenvolvimento (WHO/UNEP, 1990; Jeyaratnam, 1990; McConnell, 1994; Pimentel, 1996).

### 1.1.3 - CLASSIFICAÇÃO

Os pesticidas normalmente são classificados de acordo com sua toxicidade, estrutura química e organismo alvo. Em relação à toxicidade, segue-se à classificação da Organização Mundial de Saúde – OMS – que se baseia na distinção entre as formas de maior e menor risco de cada substância, sob o aspecto da toxicidade intrínseca de cada uma destas (Tabela 1). Podendo ser entendido como a

capacidade de causar dano agudo à saúde, por meio de uma única ou múltiplas exposições em um curto período de tempo. Esta toxicidade é expressa pela Dose Letal 50 (DL50) aguda, por via oral ou dérmica para ratos. A DL50 é o valor estimado da dose necessária, em mg/Kg de peso corpóreo, que irá levar a morte 50 % dos animais em experimentação (Henao e Corey, 1986; Albert, 1988;Fait, 1994).

Tabela 1 – Classificação das substâncias segundo via de absorção e toxicidade aguda, expressa em DL50.

Classe	DL50 para ratos (mg / Kg de peso corpóreo)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos*	Líquidos*	Sólidos*	Líquidos*
Ia Extremamente perigoso	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib Altamente perigoso	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II Moderadamente perigoso	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III Ligeiramente perigoso	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

\* Os termos Sólidos e Líquidos se aplicam ao estado físico do produto ou formulação testada.

Fonte: Fait, 1994.

Existem cerca de 700 pesticidas no mercado, sendo que 48 pertencem à classe Ia (extremamente perigosos), 77 a classe Ib (altamente perigosos), 141 a classe II (moderadamente perigosos), 153 a classe III (ligeiramente perigosos) e cerca de 280 que são considerados incapazes de produzir dano agudo, sob condições normais de uso (He, 1993). A tabela 2 apresenta a listagem de alguns pesticidas comumente utilizados, sua classificação química e grau de toxicidade.

Embora seja comum a classificação segundo a toxicidade, a forma mais corriqueira de classificação dos pesticidas é a que se baseia no organismo alvo da substância. Segundo este parâmetro podemos classificá-los como: inseticidas, herbicidas, nematocidas, carrapaticidas, rodenticidas, fungicidas, molusquicidas e etc. Em função da enorme variedade de estruturas químicas, dentro de cada uma destas classes, estes pesticidas ainda são classificados em função de sua estrutura química. Assim os inseticidas são classificados como: Organoclorados, organofosforados, Piretróides e carbamatos; dentre os herbicidas, podemos ter clorofenólicos, bipiridílicos, triazínicos, entre outros. No caso dos fungicidas podemos encontrar ditiocarbamatos, pentaclorofenóxidos, organomercuriais e etc. (Henao e Corey, 1986; Meyer, 1998).

#### 1.1.4 - ASPECTOS HISTÓRICOS

A origem da utilização de pesticidas pelo homem confunde-se com a origem da agricultura, já que grandes extensões de terra cultivadas com uma única espécie facilitam em muito o ataque de organismos que possam vir a destruir ou prejudicar uma determinada cultura.

Tabela 2 – Relação de alguns dos pesticidas mais utilizados, sua classificação quanto à toxicidade e classe química.

Nome	Classificação <sup>1</sup>	Classe <sup>2</sup>
Aldicarb	Ia	C
Chlorfenvinfós	Ia	OP
Mevinfós	Ia	OP
Paration	Ia	OP
Metil Paration	Ia	OP
Demeton – O	Ia	OP
Disulfoton	Ia	OC
Sulfotep	Ia	OP
Aldrin	Ib	OC
Dieldrin	Ib	OC
Carbofuran	Ib	C
Diclorvos	Ib	OP
Dicrotofós	Ib	OP
Demeton – S	Ib	OP
Metil Azimphos (Gution)	Ib	OP
Metamidofós	Ib	OP
Metomyl	Ib	C
Monocrotofós	Ib	OP
2,4,5 – T	II	H
Carbaryl	II	C
Cypermctrina	II	P
DDT	II	OC
Deltametrina	II	P
Endosulfan	II	OC
Fenitrotion	II	OP
Diazinon	II	OP
Naled	II	F
Chlorpyrifos	II	OP
Paraquat	II	H
Lindano	II	OC
Acefato	III	OP
Bromofós	III	OP
Malation	III	OP
MCPA	III	H
Glifosato	III	OP
Temefós	III	OP
Thiram	III	F

Legenda<sup>1</sup>: Ia – extremamente perigoso, Ib – altamente perigoso, II – moderadamente perigoso, III – ligeiramente perigoso

Legenda<sup>2</sup>: OP –Organofosforados, OC –Organoclorados, C –Carbamatos, P –Piretróides, H –Herbicidas, F –Fungicidas

Fonte: Meyer, 1998

Através dos séculos o homem tem desenvolvido vários métodos para controlar organismos nocivos as suas culturas e a sua saúde. Os registros históricos citam diversas doenças em plantas e pragas de insetos e diversas tentativas de controlar estas. O enxofre era usado como fumigante pelos chineses antes do ano 1000 a.C. e como fungicida na Europa em meados do século XIX.; e continua como pesticida mais utilizado hoje na Califórnia. No Japão do século XVI, óleo de baleia era misturado com vinagre e aplicado em campos de arroz, a fim de impedir o desenvolvimento de larvas de insetos por enfraquecimento da cutícula. Os chineses aplicavam quantidades moderadas de compostos contendo arsênico como inseticidas no século XVII. Por volta de 1690, extratos aquosos de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) eram usados como inseticidas, e a nux vomica, a semente da *Strychnos nux-vomica* (estriquinina) tinha como objetivo controlar roedores. Em meados do século XIX a raiz da *Derris elliptica*, contendo rotenona, foi usada como inseticida, assim como um piretróide presente nas flores do Crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). No final do século XIX, trióxido de Arsênico foi usado contra ervas daninhas. A mistura de Bordeaux ou “Calda Bordalesa” (sulfato de cobre, hidróxido de cálcio e água) foi introduzida em 1882 para combater um fungo (*Plasmopara viticola*), que atacava as plantações de uvas na França. Ácido sulfúrico era utilizado no início deste século para controlar ervas daninhas dicotiledôneas, já que estas absorviam o ácido, enquanto que os grãos de cereais , monocotiledôneas, que possuíam um tecido único, liso e encerado, não absorviam o ácido. Os derivados do arsênico foram utilizados de 1900 até 1930, quando diversos problemas ligados a sua toxicidade e o amplo uso destes compostos fizeram com que seu uso fosse sendo abandonado. (Klaassen, 1996)

Efetivamente, somente após 1920 é que se começaram as pesquisas a respeito de compostos sintéticos orgânicos com atividade praguicida. Podemos citar o início desta era de pesticidas sintéticos, a descoberta das atividades inseticidas do Diclorodifeniltricloroetano (DDT) no final da década de 30, e de outros compostos Organoclorados no início da década de 40. Estas substâncias foram amplamente utilizadas tanto nas atividades agropecuárias, quanto na saúde pública, obviamente incontestáveis benefícios foram gerados pela utilização destas substâncias, mas sua persistência no meio, sua capacidade de biomagnificação e bioacumulação, trouxeram efeitos danosos ao homem e ao meio ambiente (Cremlin, 1978; Colborn et al; 1996).

Quase que simultaneamente ao desenvolvimento do pesticidas Organoclorados, na Alemanha nazista compostos orgânicos derivados do ácidos fosfórico (organofosforados) eram desenvolvidos com fins homicidas. Estes agentes, mais tarde sofreram modificações em suas estruturas a fim de se reduzir a toxicidade ao homem, e a partir da década de 60 eles começam a substituir os organoclorados na escolha como pesticidas. (Klaassen, 1996; Goodman e Gilman, 1988)

A partir da década de 80, foram introduzidos os piretróides sintéticos, análogos sintéticos das piretrinas. Estas substâncias foram introduzidas no mercado na década de 80 e em apenas 2 anos já contavam com quase 30 % na participação do mercado mundial de pesticidas. Isto basicamente se deve à baixa toxicidade a mamíferos, em relação ao organofosforados, apesar deste ainda ter uma forte participação no mercado mundial de pesticidas. (Klaassen, 1996; Goodman e Gilman, 1988; McConnell, 1994)

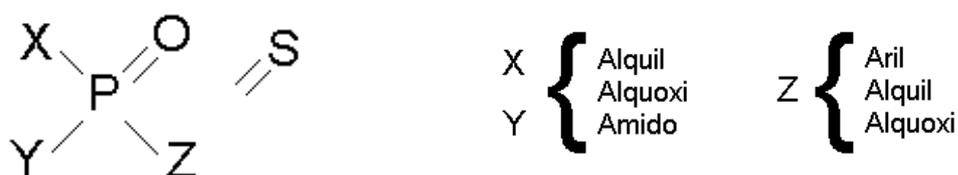
### 1.1.5 - AGENTES ANTICOLINESTERÁSICOS

Esta classificação inclui os pesticidas carbamatos e organofosforados, devido a sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), presente no sistema nervoso, plasma e fígado. Esta enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina, sendo assim, quando este sistema de degradação se encontra inibido ocorre acúmulo deste neurotransmissor levando à exacerbação dos efeitos colinérgicos. (Jeyaratnam e Maroni, 1994)

Os sinais e sintomas de intoxicação por agentes anticolinesterásicos podem ser divididos em três grupos: muscarínicos (quando há o acúmulo de acetilcolina nas sinapses parassimpáticas), nicotínica (quando este se dá nas placas motoras terminais) e centrais. Os sinais e sintomas inerentes ao sistema nervoso central (SNC) incluem ansiedade, insônia, dor de cabeça, tremores, confusão, falta de concentração, convulsões e depressão respiratória. Salivação e transpiração excessivas, lacrimejamento, aumento de secreções nasais e brônquicas, além de miose (redução do diâmetro pupilar), falta de acomodação, diarreia, bradicardia, são sinais muscarínicos. Os efeitos nicotínicos incluem palidez, taquicardia, hipertensão, fraqueza e fasciculações. A morte geralmente é devida à paralisia respiratória, que pode ser de origem central ou periférica (Marrs, 1993; Kandell et al., 1991).

### 1.1.6 - PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Os pesticidas organofosforados são basicamente ésteres do ácido fosfórico e sua nomenclatura mais comum se baseia nos átomos e radicais que se ligam ao átomo central de fósforo (figura 1). Esta classe pesticida atualmente pode ser subdivida em 13 subclasses, sendo que os fosfatos, fosfonatos, fosfinatos, fosforotioatos e fosforoditioatos (tabela 3), são os mais comumente utilizados. (Henao e Corey, 1986).



Fonte: Ecobichon, 1996

Figura 1: Estrutura básica de um pesticida organofosforado

Estes pesticidas inicialmente foram criados na Alemanha nazista por volta da segunda grande guerra, com intuito homicida. Estes agentes também são conhecidos como “gases dos nervos”, no qual podemos citar como exemplo: o soman, o sarin, o tabun, o gás V e o VX (tabela 4) (Ecobichon, 1996), além da importância destes compostos por terem servido de base para a estrutura química dos atuais pesticidas organofosforados, alguns acontecimentos recentes: como a utilização do gás sarin contra os Curdos em 1988 no Iraque (Ecobichon, 1996). O atentado ao metro japonês em 1995 (Ferrer e Cabral, 1995), utilizando o mesmo gás, a atual crise internacional envolvendo o armazenamento destes compostos e sua possível utilização em caso de uma guerra por alguns países e a possibilidade do uso destes compostos em atentados terroristas, demonstram que além dos compostos organofosforados utilizados como pesticidas, estes compostos criados

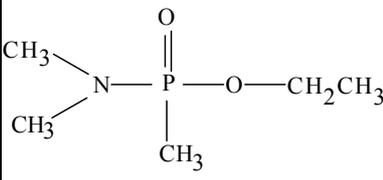
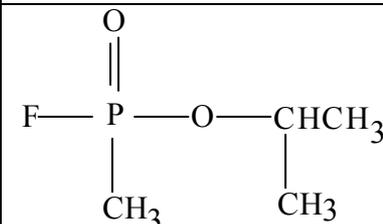
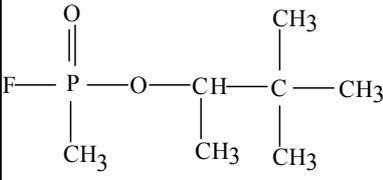
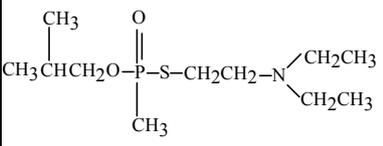
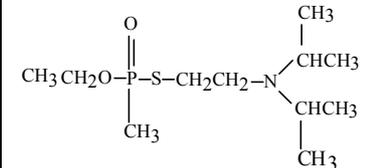
com propósitos homicidas merecem especial atenção de autoridades e pesquisadores.

Tabela 3: Algumas das subclasses mais utilizadas de organofosforados, suas estruturas gerais e exemplos.

Subclasse	Estrutura	Exemplos
Fosfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{RO} - \text{P} - \text{OR} \\   \\ \text{OR} \end{array}$	Dichlorvos
Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{RO} - \text{P} - \text{R} \\   \\ \text{OR} \end{array}$	Trichlorfon
Fosfinatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R} - \text{P} - \text{R} \\   \\ \text{OR} \end{array}$	Glifosato
Fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ \text{RO} - \text{P} - \text{OR} \\   \\ \text{OR} \end{array}$	Paration
Fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ \text{RS} - \text{P} - \text{OR} \\   \\ \text{OR} \end{array} \quad \text{ou} \quad \begin{array}{c} \text{S} \\    \\ \text{RS} - \text{P} - \text{OR} \\   \\ \text{OR} \end{array}$	Malation

Adaptado de Meyer, 1998.

Tabela 4 – alguns exemplos de compostos organofosforados utilizados com intuito bélico.

Nome Comum	Nome CAS *	Estrutura química
Tabun, GA	Dimetilphosphoramidocyanid acid, ethyl ester	
Sarin , GB	Methylphosphonofluoridic acid, (1 – methyl ethyl) ester	
Soman, GD, Pinacolil, Metilphosponil Fluoride	Methylphosphonofluoridic acid, 1,2,2 – trimethylpropyl ester	
Gás V	Methylphosphonothioc acid, S-[2-(diethylamino) ethyl] O-2-methylpropynil ester	
VX	Methylphosphonothioc acid, S-[2-bis[(1-methyl ethyl) amino] ethyl] O-ethyl ester	

\* CAS – Chemical Abstracts Service

Fonte: [http://www.mitretek.org/ofere/energy/cw\\_page/cwagente.html](http://www.mitretek.org/ofere/energy/cw_page/cwagente.html)

Após o período de guerra estes agentes sofreram modificações em sua estrutura afim de se diminuir a sua toxicidade para o homem, para que pudessem ser usados como pesticidas. Os organofosforados podem ser utilizados como inseticidas, rodenticidas, fungicidas e herbicidas, o que indica um amplo espectro de usos, e que apesar das alterações sofridas em sua estrutura, ainda possuem um alto grau de toxicidade. Ao observamos os pesticidas classificados como extremamente e altamente perigosos, encontramos um número relativamente maior de pesticidas organofosforados, confirmando assim a sua alta capacidade de causar dano agudo, mesmo depois de modificações que alteraram seu grau de toxicidade (Henao e Corey, 1986; Ecobichon, 1996)

#### 1.1.7 - TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA DE AGENTES ORGANOFOSFORADOS.

A absorção de agentes organofosforados pode se dar por via digestiva, pulmonar e dérmica, sendo esta última a via mais importante, principalmente sob o aspecto ocupacional (Rraheel, 1988). Após a etapa de absorção, os compostos organofosforados são biotransformados no fígado, e passam a ter grande afinidade por seus alvos no sistema nervoso central e periférico (Jeyaratnam e Maroni, 1994).

Os organofosforados podem sofrer inúmeras reações de biotransformação, tais como oxi-redução, alquilação, desidrogenação, etc., sendo que no caso dos fosforotiossulfatos são preferencialmente de dessulfuração oxidativa. Desta maneira, um aumento significativo da hidrosolubilidade destes compostos e, conseqüentemente uma maior facilidade da sua excreção (Ecobichon, 1996; Valle,

1988).

O mecanismo de ação tóxica dos organofosforados e carbamatos se deve basicamente à inibição da enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) presente nas sinapses, embora esta enzima esteja presente em outros tecidos. No sistema nervoso tem papel fundamental na interrupção circunstancial da propagação do impulso nervoso, através da hidrólise da acetilcolina. Quando este sistema enzimático está inibido, ocorre acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e conseqüentemente, colapso no sistema nervoso.

Os fosforotionados, como o paration, não são inibidores diretos da acetilcolinesterase, eles sofrem ativação metabólica no tecido hepático, neste caso dessulfuração oxidativa do ester tionado, através da ação de um sistema enzimático denominado oxidase de função mista (citocromo P450), presente no tecido hepático de mamíferos (Main, 1976; Larine, 1987; Rozman e Klassen, 1996; Parkinson, 1996).

Organofosforados e carbamatos reagem como as colinesterases por um mecanismo análogo ao da reação com o substrato acetilcolina. Na reação fisiológica a enzima é acetilada e posteriormente ocorre a hidrólise em ácido acético e colina. Estes inibidores reagem de forma similar, produzindo uma enzima fosforilada ou carbamilada, mas que apresenta uma velocidade de dissociação muito menor. Os carbamatos se ligam reversivelmente a enzima, o que os torna compostos de menor toxicidade (Soreq et al., 1992).

A detoxificação destes esteres organofosforados, se dá por meio de via hidrolítica. A hidrólise destes compostos ocorre por via de enzimas conhecidas como esterases A. (Heinnecke e Lusic, 1998)

A literatura indica que possivelmente outros sistemas enzimáticos podem ser afetados pelos organofosforados, como por exemplo, a esterase neurotóxica, o que explicaria certos quadros clínicos que não poderiam ser associados à síndrome colinérgica. (Marrs, 1993; Forget, 1991)

## 1.2 - MONITORAMENTO BIOLÓGICO DE EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

### 1.2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso de indicadores biológicos tem sido úteis ferramentas no sentido de possibilitar avaliações mais específicas, como, por exemplo, a dose de uma substância no órgão onde se dá sua ação tóxica, assim como também indicar diferenças individuais relacionadas aos mecanismos toxicocinéticos dos xenobióticos. (Lowry, 1995; Bernard, 1995).

Basicamente 3 tipos de indicadores biológicos podem ser utilizados nestes monitoramentos, os indicadores biológicos de: dose interna, efeito e suscetibilidade.

### 1.2.2 - INDICADORES DE DOSE INTERNA

Estes indicadores podem refletir a concentração real da substância no local onde ela exerce sua ação tóxica, ou estimar o grau de exposição sempre que o nível da substância no material biológico esteja correlacionado com a concentração ambiental. Além disso, permite avaliar a concentração do agente químico nos órgãos e tecidos a partir dos quais é lentamente liberada.

No caso de pesticidas organofosforados, poderíamos citar a detecção de metabólitos destes pesticidas como *p*-Nitrofenol (no caso do Paration), metabólitos alquilfosfato (dietil organofosforados), como poderíamos citar também a determinação direta destes compostos, apesar da sua menor aplicação devido a sua meia-vida relativamente curta e sua não acumulação nos tecidos (He, 1993).

A técnica mais utilizada para este tipo de monitoramento é a cromatografia, tanto a gasosa, como a líquida de alta eficiência (Sherma, 1995).

### 1.2.3 - INDICADORES DE EFEITO

São aqueles que identificam alterações precoces e reversíveis no organismo, resultantes da ação do xenobiótico, oriundos da ação deste em qualquer tecido, órgão ou sistema. (Lowry, 1995).

No monitoramento a pesticidas organofosforados, um indicador de efeito bastante utilizado é a determinação das atividades das colinesterases sanguíneas.

No tecido sanguíneo, existem duas colinesterases, a acetilcolinesterase eritrocitária (EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase plasmática (EC 3.1.1.8), que devido aos diferentes órgãos de origem, afinidades por determinados substratos, localização tecidual e funções fisiológicas, possuem diferenciados usos como indicadores de efeito. A acetilcolinesterase da hemácia é sintetizada durante a hematopoese, quando estas células ainda são nucleadas, logo todo o processo de síntese ocorre na medula óssea fazendo com que esta enzima apresente uma meia-vida próxima a das hemácias (aproximadamente 3 meses), fazendo com que esta enzima possa ser utilizada como indicador de exposição subcrônica a organofosforados. A butirilcolinesterase plasmática é produzida no fígado e exportada para a corrente sanguínea, sendo constantemente produzida e degradada, mantém sua com atividade por apenas alguns dias (uma semana aproximadamente) fazendo com que esta possa vir a ser utilizada como indicador de exposição aguda a estes compostos (Nutley e Cocker, 1993; Jeyaratnam e Maroni,

1994).

#### 1.2.4 - INDICADORES DE SUSCETIBILIDADE

Possibilitam a determinação de indivíduos com maior ou menor sensibilidade à ação tóxica de um determinado xenobiótico, nos ajudando a entender, pelo menos em parte, as diferentes repostas individuais face à exposição a substâncias tóxicas, facilitaria também a determinação de áreas de maior ou menor risco, de acordo com o perfil das populações dos locais estudados.

No caso de pesticidas organofosforados um candidato a indicador de suscetibilidade poderia ser a enzima paraoxonase (EC 3.1.1.8) (Costa e Manzo, 1995), já que existem estudos que indicam esta enzima como fator de proteção frente a compostos organofosforados, devido à capacidade desta hidrolisar estes compostos (Geldmar et al., 1988). Existem ainda evidências indiretas, como a alta suscetibilidade de pássaros, que possuem nenhuma ou baixa atividade paraoxonásica, à intoxicação por organofosforados, em comparação com mamíferos, que possuem níveis bem mais altos de atividade desta enzima (Brealey et al, 1980). Poderíamos citar também testes diretos a respeito da proteção da paraoxonase contra a intoxicação por organofosforados, onde após se injetar paraoxonase parcialmente purificada em animais, a resistência destes foi bastante aumentada (Costa et al, 1990; Li et al.; 1993; Li et al., 1995).

### 1.3 – ESTERASES QUE INTERAGEM COM ORGANOFOSFORADOS

Este grupo de enzimas denominadas esterases compreende uma gama variada de estruturas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster de inúmeros substratos. Este grupo de enzimas pode ser dividido em 3 grandes grupos, em função da interação com organofosforados. As esterases do tipo “A”, são capazes de hidrolisar compostos organofosforados, sem serem inibidos por estes, já as esterases do tipo “B”, são capazes de hidrolisar estes compostos, mas, entretanto, são inibidas por estes compostos, enquanto as esterases do tipo “C”, não possuem qualquer forma de interação com os pesticidas organofosforados (Parkinson, 1996).

Este grupo de enzimas é particularmente importante no metabolismo de compostos organofosforados, já tanto o seu principal alvo, a acetilcolinesterase da fenda sináptica (EC 3.1.1.7), uma esterase “B”, quanto a principal enzima envolvida em sua detoxificação, a paraoxonase (EC 3.1.1.8), uma esterase “A” (figura 2), estão envolvidas em neste processo. (Mackness, 1989).

Tem se postulado que a maior diferença entre as esterases, se encontra na presença de um resíduo cisteína no sítio catalítico da esterase “A” a presença de serina no sítio ativo das esterases “B” (yan et al., 1994).

Ambas famílias de enzimas são capazes de hidrolisar organofosforados, porém o tempo de dissociação do complexo enzima-substrato é que irá determinar o potencial inibidor ou não destes compostos. Nas esterases do tipo “B” o tempo de dissociação é maior que a meia-vida (“turnover”) da enzima, sendo assim, pode-se considerar que esta família de pesticidas é um inibidor irreversível deste complexo enzimático, o que já não ocorre com as esterases do tipo “A”, já que nesta família de

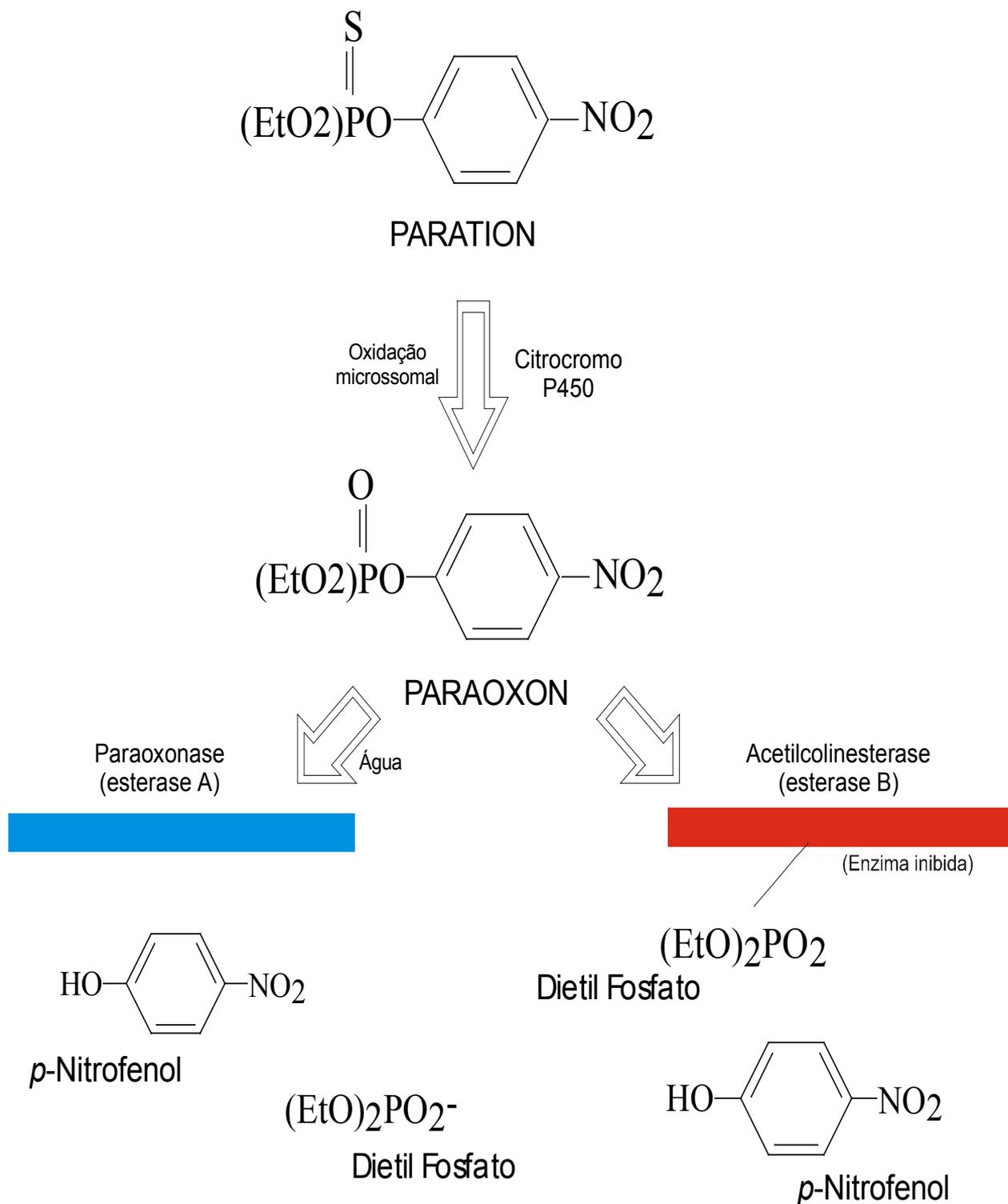


Figura 2: Exemplos de rotas metabólicas do pesticida organofosforado paration no organismo humano. Nota - se a fosforilação é irreversível na enzima acetilcolinesterase, o que não ocorre na paraoxonase.

enzimas, o tempo de dissociação do complexo enzima-substrato é menor do que a meia vida da enzima, sendo assim, os compostos organofosforados não são inibidores efetivos desta família de enzimas. (Mackness, 1989).

Cabe ressaltar que as esterases também estão envolvidas em outros processos metabólicos de xenobióticos, como por exemplo, a inativação de compostos como a procaína, a cocaína e a espirolactona e a ativação de compostos como o vinil acetato, o éster dimetílico do ácido succínico e o 1,3-dimetil 3-fenil 1-nitrosourea (Parkinson, 1996).

### 1.3.1 - ESTERASES B

Este grupo de enzimas tem como principais representantes a acetilcolinesterase verdadeira, colinesterase eritrocitária ou acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), e a pseudocolinesterase, colinesterase plasmática ou butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8). (Van Lith et al., 1991; Taylor, 1991)

A acetilcolinesterase encontra-se presente principalmente no tecido nervoso e sanguíneo e que hidrolisa o substrato acetilcolina 4 vezes mais rápido que o substrato butirilcolina. Ela é uma glicoproteína extracelular, que tem um importante papel na transmissão colinérgica permitindo um controle temporal da ativação sináptica pela rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Chatel et al., 1994). Tanto a acetilcolinesterase cerebral, quanto a presente em eritrócitos, são formas anfífilas da enzima, sendo as predominantes a forma tetramérica (tipo II – hetero – oligômeros ancorados a membrana plasmática por uma subunidade hidrofóbica de cerca de 20 KD), encontrada no cérebro, e a dimérica (tipo I – dímeros ancorados

por fosfatidilinositol), em eritrócitos humanos (Massoulié et al., 1993). Este dímero presente predominantemente em eritrócitos apresenta um peso molecular de aproximadamente 151 KD, composto por 2 subunidades iguais interligadas por pontes dissulfetos (Ott, 1985).

A butirilcolinesterase é encontrada principalmente no plasma sanguíneo, sendo esta sintetizada no fígado. Ela é uma glicoproteína tetramérica, contendo 4 subunidades idênticas, cada uma contendo um sítio ativo. O peso molecular deste tetrâmero está por volta de 342 KD. Esta enzima está envolvida no metabolismo de xenobióticos como a cocaína, succinilcolina, mivacurium, heroína e outras drogas (Pantuk, 1993; Parkinson, 1996).

Ainda é incerto o papel fisiológico da butirilcolinesterase, já que em pacientes inoculados com compostos anticolinesterásicos, a atividade desta enzima reduzida cerca de 95% sem o aparecimento de qualquer sintoma clínico ou distúrbio fisiológico detectável (Vorhaus e Kark, 1953). A deficiência desta enzima só é notada ao se administrar à droga succinilcolina (um bloqueador neuromuscular) a pacientes com atividades deficientes. Tem – se proposto que esta enzima esteja envolvida na detoxificação de certos ésteres de vegetais presentes na dieta e que também possa estar envolvida no metabolismo lipídico, já que a atividade desta enzima se encontra alterada (aumentada) em face de situações em que estes processos metabólicos se encontram de maneira anormal como hiperlipoproteinemia, obesidade e diabetes (Taylor, 1991; Van Lith et al., 1991).

### 1.3.2 - ESTERASES A

As esterases foram primeiramente descritas por Manzur (1946). Posteriormente estas foram classificadas basicamente em dois grupos: as esterases inibidas por organofosforados (B) e as que não eram inibidas por estes (A). (Aldridge, 1953). Apesar desta classificação ter sofrido algumas modificações e dela se basear em hidrólise de compostos xenobióticos, ela ainda serve como base para a classificação desta família de enzimas, já que em muitos casos não se conhece o substrato natural destas enzimas e conseqüentemente os processos metabólicos os quais estas estariam envolvidas.

O principal representante das esterases "A" é a enzima paraoxonase - hidrolase de ligações triésteres de ácido fosfórico com afinidade específica a organofosforados (EC 3.1.1.8) (Mackness et al., 1996; Walker, 1993).

Este grupo de enzimas é provavelmente o principal responsável pela detoxificação de agentes organofosforados em nosso organismo (Mackness, 1989). Em mamíferos, qualquer oxon que escape da detoxificação hepática, pode ser hidrolisado no sangue pela paraoxonase antes de chegar ao tecido nervoso. Alguns organofosforados como, por exemplo, o pirimifos - metiloxon, é rapidamente hidrolisado pela paraoxonase e estima - se que nenhuma molécula ativa deste pesticida chegue ao cérebro (Brealey et al., 1980).

Insetos geralmente possuem baixa ou nenhuma atividade paraoxonásica, o que explicaria a sua suscetibilidade a compostos organofosforados. Em estudos de toxicidade seletiva a estes agentes, demonstrou - se que pássaros eram muito mais susceptíveis a intoxicação por organofosforados do que mamíferos; isto é causado possivelmente pela ausência ou baixa atividade paraoxonásica encontrada em

pássaros. Isto provavelmente também deve explicar a suscetibilidade de répteis e peixes a intoxicação por organofosforados (Mackness et al., 1996; Brealey et al., 1980).

A paraoxonase humana possui peso molecular entre 43 - 45 KD e contém 4 cadeias de carboidrato por molécula, que representam cerca de 16 % do total deste peso. Um esquema da estrutura desta enzima se encontra na figura 3. Esta esterase está associada a uma lipoproteína de alta densidade (HDL) contendo apolipoproteína (apo) A-I e apo J. Estudos de hibridização *in situ* definem a localização do gene da enzima paraoxonase em q21 - q22, no braço longo do cromossomo 7, sendo que este gene está muito próximo do gene da fibrose cística e possui segregação conjunta com este. O DNA complementar para esta enzima indica uma proteína contendo 355 aminoácidos e indica também um alto grau de conservação da estrutura desta enzima, o que sugere um importante papel desta em algum processo metabólico. A seqüência genômica da paraoxonase permanece desconhecida. (Humbert et al., 1993; La Du et al., 1993; Adkins et al., 1993; Mackness et al., 1996; Ikeda et al., 1998).

Acredita - se que a paraoxonase seja sintetizada e excretada exclusivamente pelo fígado, entretanto não existe evidência direta disto, já que alguns trabalhos indicam que outros tecidos poderiam também contribuir para os níveis séricos de paraoxonase (Hasset et al., 1991).

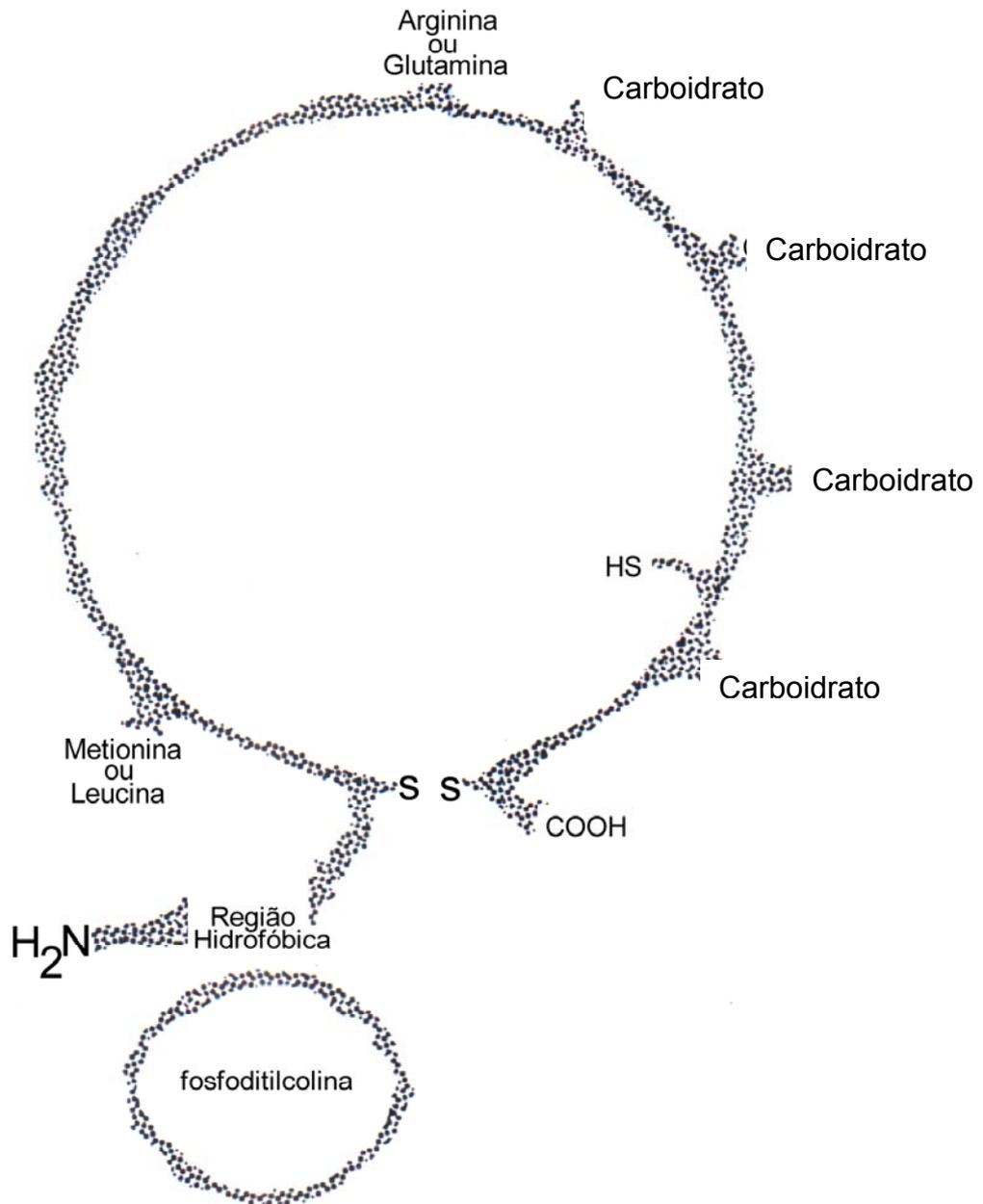
A função precisa da enzima paraoxonase em nosso organismo é ainda desconhecida (Heinecke e Lysis, 1998). Apesar da afinidade desta enzima por compostos organofosforados ser de extrema importância, esta provavelmente não é a função para a qual ela foi originalmente designada. Entretanto estudos *in vitro*

demonstram que ela pode reduzir significativamente a geração de peróxidos lipídicos durante a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sendo assim esta esterase pode estar ligada na proteção *in vivo* contra a arteriosclerose (Kim et al., 1998). Pode estar também correlacionada com processos ligados ao infarto no miocárdio em algumas populações (Antikainen et al., 1996; Sanghera et al., 1997; Kao et al., 1998; Sanghera et al., 1998) e a diabetes (Ruiz, 1997; Kao et al., 1998). Outros trabalhos também indicam uma possível atividade hidrolítica de endotoxinas de alguns protozoários (Smith et al, 1995).

Em humanos ainda não é bem clara a forma de como a paraoxonase age na detoxificação e na proteção a agentes organofosforados, apesar de já ter sido demonstrado que esta enzima em humanos é capaz de hidrolisar estes compostos e de estar envolvida na detoxificação dos mesmos. Em alguns animais esta enzima é um fator efetivo de proteção contra intoxicação por estes agentes tóxicos (Li et al., 1993; Li et al., 1995, Pond et al., 1995). O polimorfismo desta enzima, encontrado em humanos, tem potencial para ser um dos determinantes das diferentes suscetibilidades encontradas frente a intoxicações por organofosforados (Weber, 1995).

Estudos indicam que a paraoxonase possui um polimorfismo genético, que em populações européias, segue um modelo de segregação mendeliano simples, determinado por 2 alelos autossômicos, codominantes, seguindo os princípios de Hardy - Weinberg. Entretanto em algumas populações, esta distribuição é unimodal e não pode ser explicada pela equação de Hardy - Weinberg.

Figura 3: Representação esquemática da enzima paraoxonase, mostrando os sítios polimórficos, o segmento hidrofóbico N - terminal, a ponte dissulfeto e um resíduo sulfidril livre.



Fonte: La Du et al., 1993

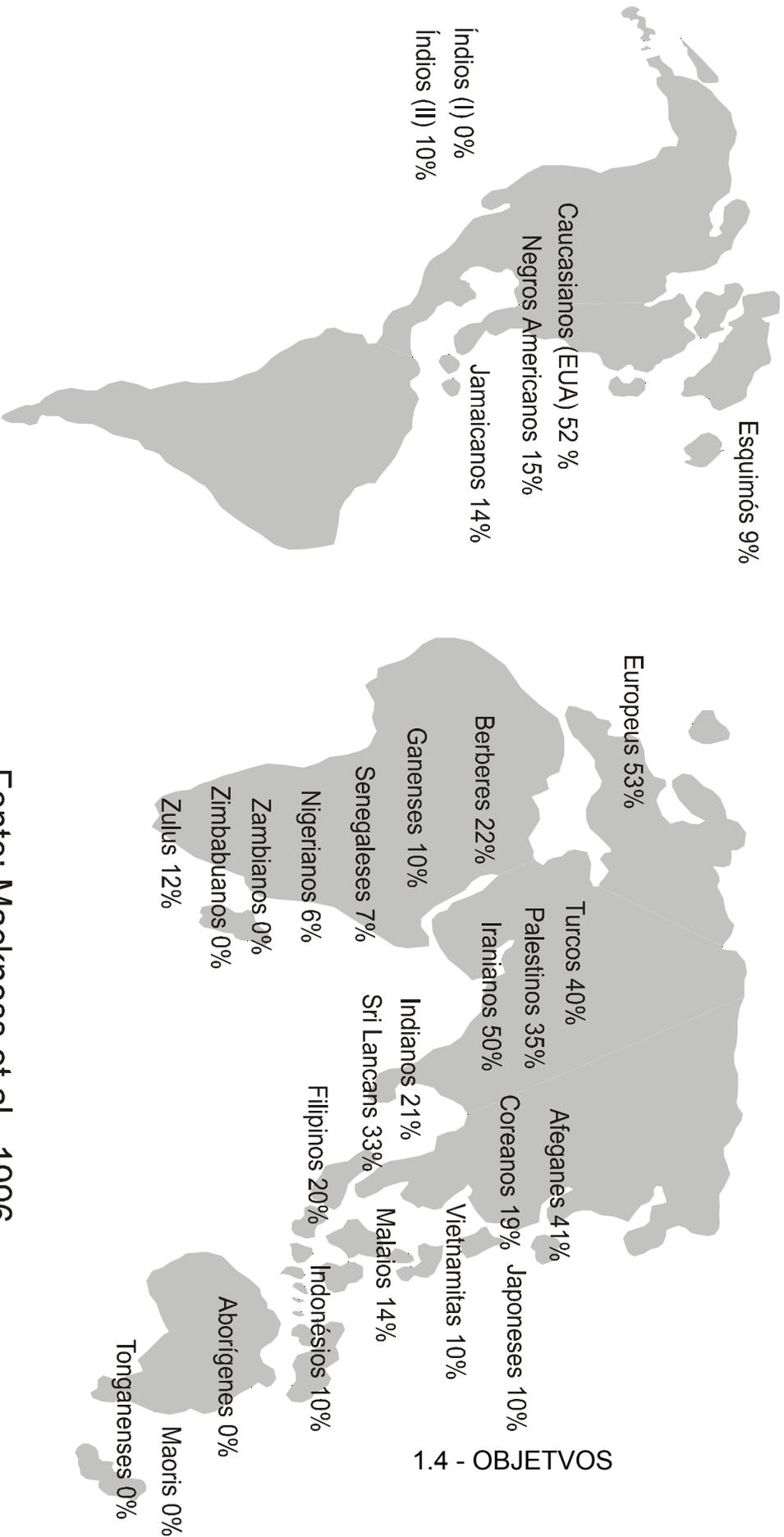
A perda dos fenótipos de baixa atividade parecem ser os responsáveis por este comportamento (Gelmacher et al., 1988; Mackness et al., 1996). Na figura 4 poderemos observar a distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade metabólica da enzima paraoxonase.

As bases moleculares do polimorfismo da enzima paraoxonase, frente a estimulação por NaCl e hidrólise de compostos organofosforados, pode ser a substituição de um aminoácido na posição 192 (ou 191 quando a alanina é definida como resíduo N - terminal). A izoenzima A (baixa atividade) tem uma glutamina na posição 192 e a B (alta atividade) uma arginina na posição 192. Uma outra substituição na posição 54 parece não afetar o efeito do polimorfismo (Humbert et al., 1993; Adkins et al., 1993.).

Existem algumas discrepâncias na nomenclatura deste polimorfismo. Adkins et al. (1993) utiliza - se do A para designar o fenótipo de baixa atividade (glutâmina na posição 192) e B para o fenótipo de alta atividade (arginina na posição 192), enquanto Humbert et al. (1993) se utiliza de 192QQ (baixa atividade) e 192RR (alta atividade).

Se levarmos em conta não só a provável participação, mas como também sua possível utilização como indicador preditivo, em processos arterioscleróticos, vasculares, na diabetes, na detoxificação de certas endotoxinas e nos mecanismos de hidrólise de organofosforados, mais estudos envolvendo a distribuição fenotípica da paraoxonase em populações humanas e de como e quando ela participa destes processos metabólicos, se tornam extremamente importantes e necessários.

Figura 4: Distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade da enzima paraoxonase.



Fonte: Mackness et al., 1996

Este trabalho visa principalmente observar o comportamento da enzima paraoxonase em uma população de trabalhadores rurais expostos a pesticidas organofosforados face a outras variáveis biológicas ou epidemiológicas. Além disso, objetivou-se também obter um perfil desta atividade em uma população não exposta, já que não existem dados no Brasil que possam subsidiar uma investigação sobre o perfil fenotípico desta enzima em populações brasileiras.

Outro objetivo deste trabalho seria a obtenção de dados preliminares para projetos futuros envolvendo a proposição da enzima paraoxonase como indicador de susceptibilidade humana a intoxicação por agentes organofosforados.

2 - MATERIAIS E

MÉTODOS

## 2.1 - REAGENTES

- Dietil - p - Nitrofenil - Fosfato (paraoxon), adquirido da sigma chemical company.
- Fenil acetato, adquirido da sigma chemical company.
- Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.2 - EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro Hewlett Packard - modelo HP 8451A.
- Potenciômetro Procyon - modelo 310.
- Centrífuga Excelsa Baby II - modelo 206R.
- Balança analítica Mettler - modelo AE200.
- Agitador magnético Thermolyne - modelo 37600 mixer.
- Placa agitadora Fisatom.
- Micropipetas Eppendorf modelos 10 - 100  $\mu$ L e 100 - 1000  $\mu$ L.
- Pipeta Finnpipett (1 - 5 mL).

## 2.3 - GRUPO DE INDIVÍDUOS

### 2.3.1 – População não exposta a agentes organofosforados

O grupo controle foi formado por 142 indivíduos moradores da cidade do Rio de Janeiro, com idade variando de 16 a 60 anos, cuja as amostras foram obtidas em bancos de sangue e das quais foram analisados dados a respeito do sexo , idade,

atividade das colinesterases (acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática) e da atividade da enzima paraoxonase.

### 2.3.2 – População exposta a agentes organofosforados.

Este grupo de indivíduos foi formado por 97 indivíduos trabalhadores rurais da região do Córrego de São Lourenço, município de Nova Friburgo - RJ, com idade variando de 16 a 60 anos. Estes trabalhadores eram expostos a pesticidas (incluindo organofosforados) e dados a respeito da: idade, sexo, indicadores bioquímicos (incluindo - se ai as atividades das colinesterases e da paraoxonase), condições sócio - econômicas, perfil clínico e ocupacional, incluindo forma de aplicação dos pesticidas, foram obtidos a fim de complementar nossos estudos a respeito do comportamento desta enzima em uma população exposta.

### 2.4 - OBTENÇÃO DE DADOS GEOGRÁFICOS, BIOQUÍMICOS, SOCIOECONÔMICOS, HISTÓRICO E PERFIL OCUPACIONAL E CLÍNICO NA REGIÃO DO CÔRREGO DE SÃO LOURENÇO, NOVA FRIBURGO - RJ.

Os dados geográficos e socioeconômicos da população em estudo foram obtidos no IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Economia), oriundos do ultimo censo na região. Dados relativos à natureza ocupacional, aspectos clínicos e demais dados bioquímicos foram obtidos a partir do banco de dados montado pelo grupo envolvido no projeto PAPES denominado "Destino dos agrotóxicos e fertilizantes no Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo - RJ", do qual esta tese faz parte.

## 2.5 - COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacumtainer<sup>®</sup> heparinizados. Estes foram centrifugadas a 4000 RPM por 20 minutos, separando-se a fração plasmática da fração celular. As amostras de plasma foram armazenadas em tubos Eppendorf<sup>®</sup> em alíquotas de cerca de 1 mL, no freezer (-20°C) até o momento de serem utilizados. A fração celular do sangue era descartada.

## 2.6 - DOSAGEM DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS PARAOXONASE E ARILESTERASE.

### 2.6.1 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA ARILESTERASE

A dosagem da atividade da enzima arilesterase foi anteriormente padronizada por este grupo de trabalho e esta foi elaborada a partir do método de Lorentz et al. (1979), modificado por Oliveira-Silva et al. (1998) e cujo meio reacional era composto por: 2983  $\mu$ L de tampão Tris - HCl 50 mM pH 8,5; 2,5  $\mu$ L de plasma sendo esta reação iniciada com 15  $\mu$ L de fenil acetato 1,2 M diluído em DMSO. Esta atividade era medida cineticamente por 2 minutos em  $\lambda=270$  nm. Esta atividade foi expressa em nmoles de produto formado (fenol) por minuto por mL de plasma (nmoles fenol/ min/ mL de plasma).

### 2.6.2 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE

A atividade da enzima paraoxonase (tanto a basal quanto a estimulada por NaCl) também anteriormente padronizada por este grupo de trabalho sendo esta realizada a partir do método de Eckerson et al. (1983a, 1983b), modificado por Moraes (1997). Sendo a atividade desta expressa em  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma.

#### 2.6.2.1 - DOSAGEM DA ATIVIDADE BASAL DA ENZIMA PARAOXONASE

O como o meio reacional desta dosagem era composto por 900  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 60 mM  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM pH 10,5 e 50  $\mu\text{L}$  de plasma humano fresco. A leitura desta amostra (produto formado, p-Nitrofenol), foi realizada cineticamente por 2 minutos com comprimento de onda de 410 nm.

#### 2.6.2.2 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE ESTIMULADA POR CLORETO DE SÓDIO (NaCl)

Para a atividade estimulada por sal, o meio reacional é composto por 400  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 60 mM  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM pH 10, 5, 500  $\mu\text{L}$  de NaCl 2 M.(solução preparada em tampão glicina 60 mM  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM pH 10,5) e 50  $\mu\text{L}$  de plasma humano fresco. Ambas as reações foram iniciadas pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de paraoxon 40 mM (em uma solução 50% tampão glicina 60 mM  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM pH 10, 5, 50 % metanol). A determinação desta atividade se dá através da medida cinética, por 2 minutos, do produto formado (p-Nitrofenol), analisando – a espectrofotometricamente em comprimento de onda de 410 nm.

## 2.7 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ENZIMA PARAOXONASE NA POPULAÇÃO ESTUDADA.

Nesse trabalho os fenótipos foram caracterizados, utilizando – se a metodologia proposta por Eckerson et. al. (1983a e 1983b), e foram agrupados de duas maneiras, um deles com uma distribuição bimodal (A e B) que se baseia no grau de estimulação por NaCl da enzima paraoxonase. E a outra se baseando em uma distribuição trimodal (fenótipos AA, AB e BB), no qual os principais parâmetros determinantes são a atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl e a atividade da enzima.

### 2.7.1 - DISTRIBUIÇÃO BIMODAL

Nesta distribuição iremos classificar a população baseados no percentual de estimulação por NaCl em relação a atividade basal da enzima paraoxonase, conforme a fórmula abaixo, onde indivíduos com percentual de estimulação igual ou superior a 60% serão considerados com alta capacidade hidrolítica (B) e indivíduos cujo estimulação for abaixo de 60% serão com baixa capacidade hidrolítica (A). Apesar desta classificação ser pouco utilizada, nós a realizamos neste trabalho, pelo fato de que nenhum dado a respeito da estimulação por NaCl da enzima paraoxonase em populações brasileiras tenha sido publicado.

$$\frac{pox(NaCl) - pox(basal)}{pox(basal)} \times 100\% = \%estimulação$$

*Legenda: Pox (NaCl)= Atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl; Pox (basal)= atividade basal da enzima paraoxonase (sem NaCl).*

## 2.7.2 - DISTRIBUIÇÃO TRIMODAL

Nesta outra forma de classificação (a mais utilizada) dos fenótipos da enzima paraoxonase a separação dos fenótipos se baseia na razão entre a atividade da paraoxonase estimulada por NaCl e a atividade da enzima arilesterase, onde consideraremos indivíduos AA os que apresentarem valor desta razão <14, AB os que apresentarem valor  $\geq 14$  e < 38 e BB os que apresentarem valores  $\geq 38$  como se segue na formula abaixo:

$$\frac{pox(NaCl)}{arilesterase} = Fenótipo$$

*Legenda: Pox (NaCl) = Atividade Paraoxonásica estimulada por NaCl; Arilesterase = Atividade Arilesterásica; fenótipo= Fenótipo obtido, onde cada fenótipo tem a sua faixa de valor.*

## 2.8 - BANCO DE DADOS, CÁLCULOS ESTATÍSTICOS E GRÁFICOS.

Para a confecção do banco de dados, foi utilizado o programa Access da Microsoft. Os cálculos estatísticos e elaboração dos gráficos foram realizados no programas Sigma Plot 3.0, SPSS 8.0 e EXCEL 97.

3 – RESULTADOS  
E  
DISCUSSÃO

### 3.1 - CONSIDERAÇÕES

Conforme anteriormente citado este trabalho foi parte do projeto PAPES (Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde) denominado: “Destino dos agrotóxicos e fertilizantes no Córrego de São Lourenço, município de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro”, cujo um dos objetivos principais era avaliar a saúde desta população sob o ponto de vista toxicológico, já que se trata de um grupo formado por 143 famílias, que tem a agricultura em regime familiar com amplo uso de pesticidas, tendo os organofosforados papel de destaque, como atividade econômica predominante, tornando-a assim uma população com níveis de exposição a agrotóxicos bastante elevados.

Neste projeto foram obtidos informações a respeito dos dados sócio econômicos, dos indicadores de efeito, epidemiológicos e clínicos desta população, a fim de se caracterizar o comportamento desta população face ao uso de pesticidas organofosforados.

Com estas avaliações um banco de dados foi confeccionado e a partir dele foi possível correlacionar variáveis epidemiológicas e clínicas com os dados obtidos a respeito das enzimas paraoxonase e arilesterase obtidos nesta dissertação.

Além disso, um outro grupo, moradores da cidade do Rio de Janeiro, foi avaliado com o objetivo principal de se caracterizar a distribuição fenotípica da enzima paraoxonase.

Abaixo se seguem os resultados obtidos nesta dissertação, que foram ordenados da seguinte maneira em uma primeira etapa efetuamos uma análise descritiva e de comparação de alguns dados em ambas as populações e as

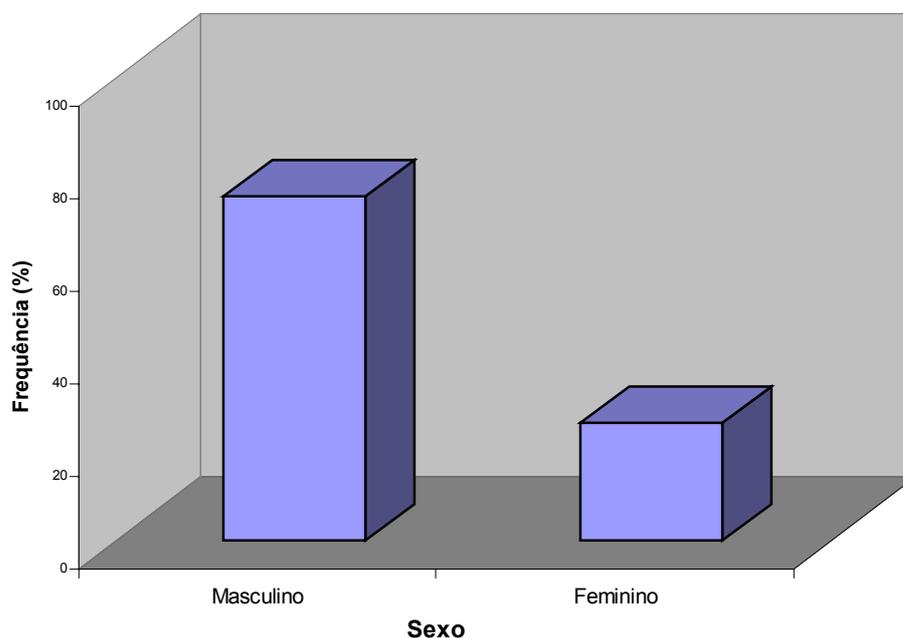
correlações entre as diversas variáveis e em uma segunda etapa a distribuição dos fenótipos da enzima paraoxonase foi obtida.

### 3.2 – ANÁLISES DESCRITIVAS

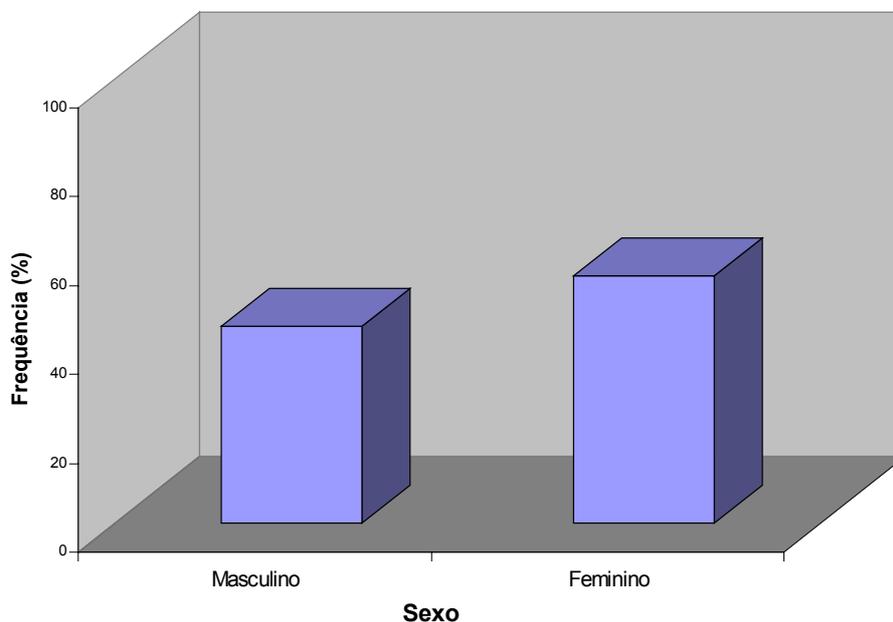
#### 3.2.1 - DISTRIBUIÇÃO DO SEXOS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO E DA POPULAÇÃO DE NOVA FRIBURGO.

A distribuição dos sexos na população de nova Friburgo se deu da seguinte maneira: 25,5 % era composta de mulheres e 74,5 % de homens (figura 5), enquanto que o grupo não exposto era formada por 44,4% de homens e 55,6% por mulheres conforme a figura 6.

**Figura 5 - Distribuição dos sexos na população de Nova Friburgo.**



**Figura 6 - Distribuição dos sexos na cidade do Rio de Janeiro.**



### 3.2.2 - DISTRIBUIÇÃO DE IDADE NOS GRUPOS ANALISADOS

Em ambas as populações a idade apresentou uma distribuição normal, apresentando no teste de Kolmogorov-Smirnov significância superior a 5 %, além dos teste de Kurtosis e Skewness, como podemos observar melhor no gráfico histograma de frequências (Figuras 7 e 8), apresentando média de 35,12 anos para a população do Córrego de São Lourenço e de 36,49 anos para a população do Rio de Janeiro, no qual podemos observar mais detalhadamente as análises descritivas relacionadas a estes dados na tabela 5.

Figura 7 – Distribuição da idade no Córrego de São Lourenço

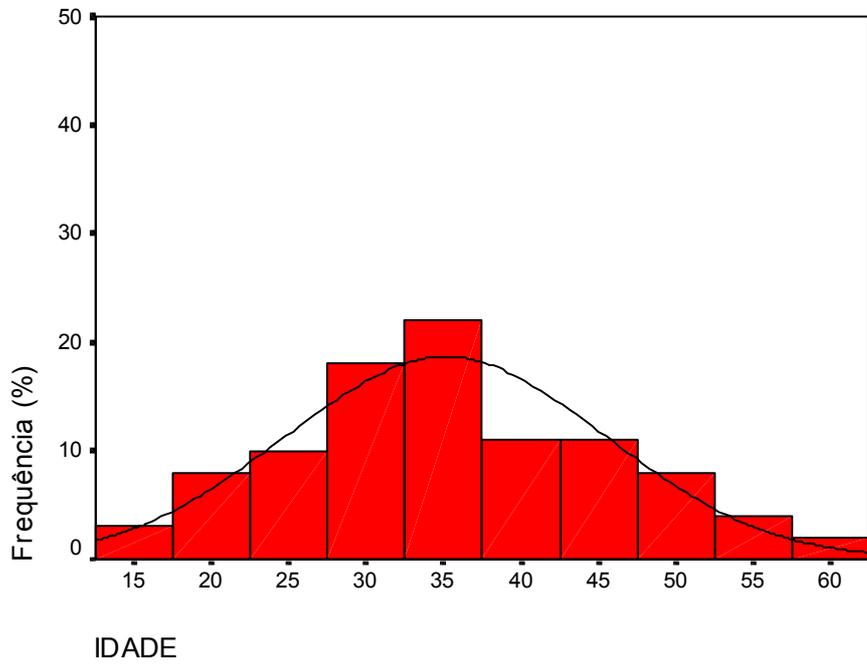
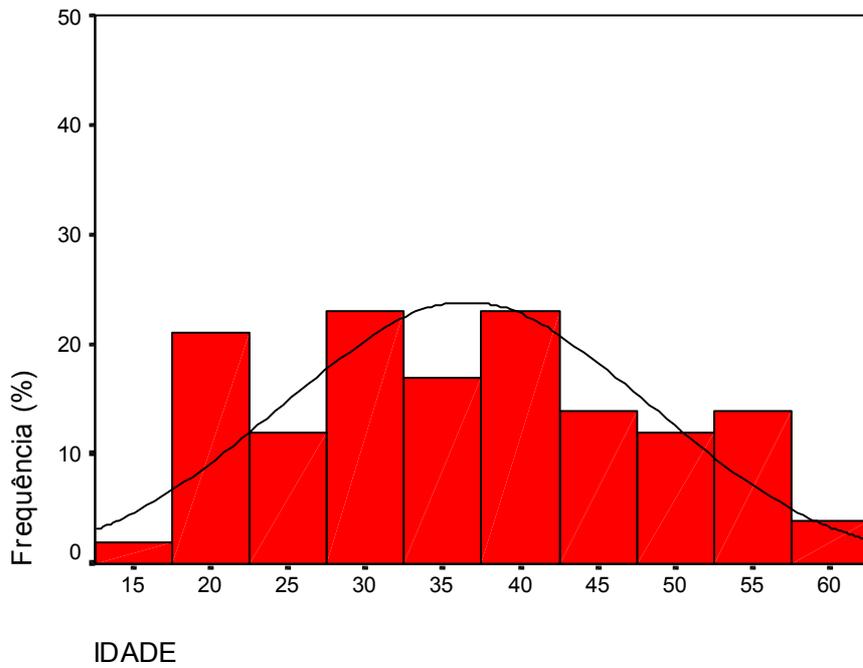


Figura 8 Distribuição da idade na cidade do Rio de Janeiro



*Tabela 5 - Análise descritiva das idades nas populações do Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo, RJ e da cidade do Rio de Janeiro – RJ.*

Análise descritiva da variável Idade (em anos)	Pop. Córrego de São Lourenço	Pop. Rio de Janeiro
Média	35,12	36,50
Intervalo de confiança (95%)	33,03 - 37,21	34,53 - 38,46
Mediana	34,00	36,00
Variância	107,44	140,45
Desvio padrão	10,36	11,85
Mínimo	15,00	17,00
Máximo	59,00	59,00
Teste de Skewness (erro padrão)	0,27 (0,24)	0,11 (0,20)
Teste de Kurtosis (erro padrão)	- 0,54 (0,48)	- 1,00 (0,40)

### 3.2.3 - ANÁLISE DESCRITIVA DAS ATIVIDADES DA ENZIMA ARILESTERASE NA POPULAÇÃO DO CÓRREGO DE SÃO LOURENÇO E NA POPULAÇÃO DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

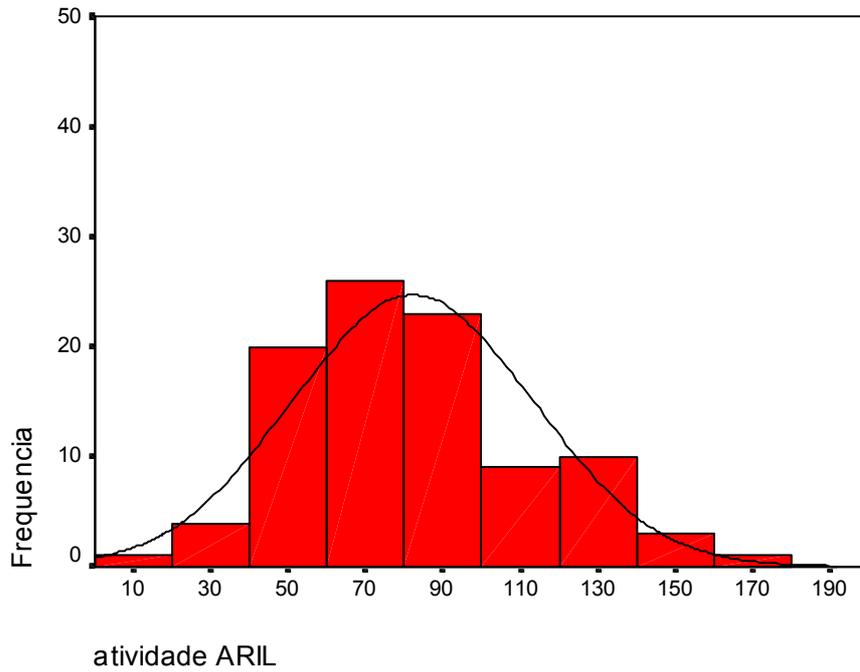
Esta é uma análise extremamente importante para este trabalho já que o conhecimento do comportamento estatístico desta enzima é de fundamental importância já que a atividade desta se faz necessária para a caracterização dos diferentes fenótipos da enzima paraoxonase frente a compostos organofosforados,

além do fato desta enzima ser uma esterase de comportamento catalítico semelhante ao da paraoxonase, sendo inclusive considerada por alguns autores (Adkins et al., 1993) apenas mais uma atividade da enzima paraoxonase, cujo perfil de atividade em uma população brasileira não tinha sido descrito até o presente trabalho.

Uma distribuição normal desta enzima foi encontrada (significância acima de 5 %), baseando-se nos testes de normalidade anteriormente citados em ambas as populações estudadas (figura 9 para a população do Córrego de São Lourenço e 10 para o grupo do Rio de Janeiro).

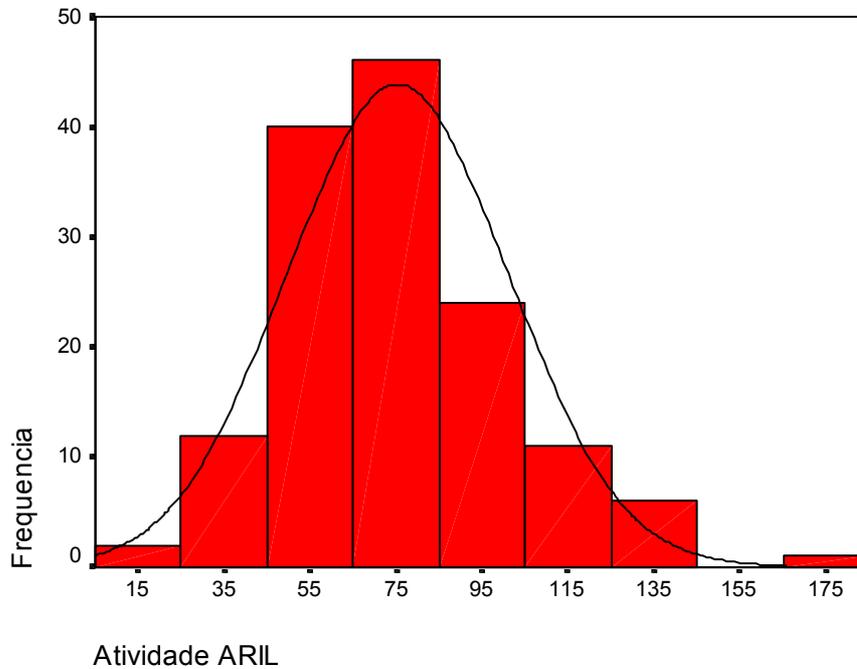
Em relação as médias obtidas encontramos os seguintes valores 82,14 para a população do Córrego de São Lourenço e de 75,35 para a população da cidade do Rio de Janeiro, ambas as atividades foram expressas em nmoles de fenol/ min/ mL de plasma, uma análise descritiva mais detalhada se encontra na tabela 6. Quanto a similaridade estatística dos grupos, o teste T de Student ( $T=1,83$ ), tabela 7, nos indica que as atividades da enzima arilesterase encontradas em ambos os grupos são estatisticamente diferentes, apesar de estar no limite de significância que poderia ser explicado pelos diferentes fenótipos encontrados, conforme veremos mais tarde.

Figura 9 – Distribuição da atividade da enzima arilesterase na pop. Da cidade de São Paulo



Legenda: Atividade ARIL – Atividade da enzima arilesterase expressa em nmoles de fenol/ min/ mL de plasma.

Figura 10 – Distribuição da atividade da enzima arilesterase na pop. Da cidade do Rio de Janeiro



Legenda: Atividade ARIL – Atividade da enzima arilesterase, expressa em nmoles de fenol/ min/ mL de plasma.

*Tabela 6 - Análise descritiva das atividades da enzima arilesterase na população de Nova Friburgo e da cidade do Rio de Janeiro.*

Análise descritiva da atividade da enzima Arilesterase ( $\mu$ moles de fenol/ min/ mL de plasma)	Nova Friburgo	Rio de Janeiro
Média	82,14	75,35
Intervalo de confiança (95%)	75,83 - 88,45	71,07 - 79,63
Mediana	76,99	75,00
Variância	979,92	664,45
Desvio padrão	31,30	25,78
Mínimo	6,02	14,62
Máximo	173,47	175,20
Teste de Skewness (erro padrão)	0,53 (0,25)	0,71 (0,21)
Teste de Kurtosis (erro padrão)	0,21 (0,48)	1,30 (0,40)

*Tabela 7 - Teste T de Student, entre as atividades da enzima arilesterase (expressa em  $\mu$ moles de fenol/ min/ mL de plasma) da população de Nova Friburgo e do Rio de Janeiro.*

Teste T de Student (nível de significância = 5%)	
Valor de T	1,83
Valor de P	0,070

### 3.2.4 - ANÁLISE DESCRITIVA DA ATIVIDADE BASAL E ESTIMULADA POR NaCl DA ENZIMA PARAOXONASE, NA POPULAÇÃO DO CÓRREGO DE SÃO LOURENÇO E DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

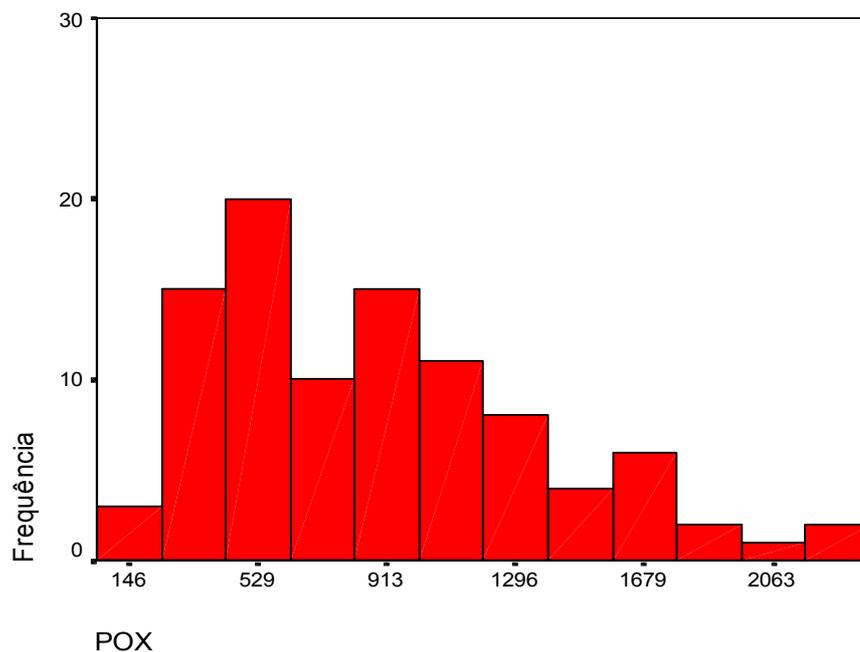
Neste tópico analisamos descritivamente a atividade da enzima paraoxonase (basal e estimulada por NaCl), esta análise é de grande importância, primeiro por ser tratar do principal objeto de estudo desta dissertação e também por este tipo análise nesta enzima em populações brasileiras, ser inédita até o presente momento, servindo assim como proveitosa fonte de dados não só para esta dissertação como também para futuros projetos envolvendo esta enzima em nossa população. Abaixo se seguem as análise tanto da atividade basal quanto da atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase.

#### - 3.2.4.1- *Atividade basal da enzima paraoxonase*

A atividade da basal enzima paraoxonase em ambos os grupos não apresentou distribuição normal em todos os testes realizados (significância abaixo de 5% no teste de Kolmogorov-Smirnov), figura 11, para a população do Córrego de São Lourenço e 12 para a população da cidade do Rio de Janeiro. Este padrão de distribuição da atividade basal da enzima paraoxonase era esperado, já que como exaustivamente citado esta é uma enzima polimórfica, e que ao observarmos os gráficos 11 e 12, vemos além de um deslocamento dos gráficos para a esquerda, pelo menos duas modas em cada gráfico, o que já descaracterizaria uma distribuição normal deste variável.

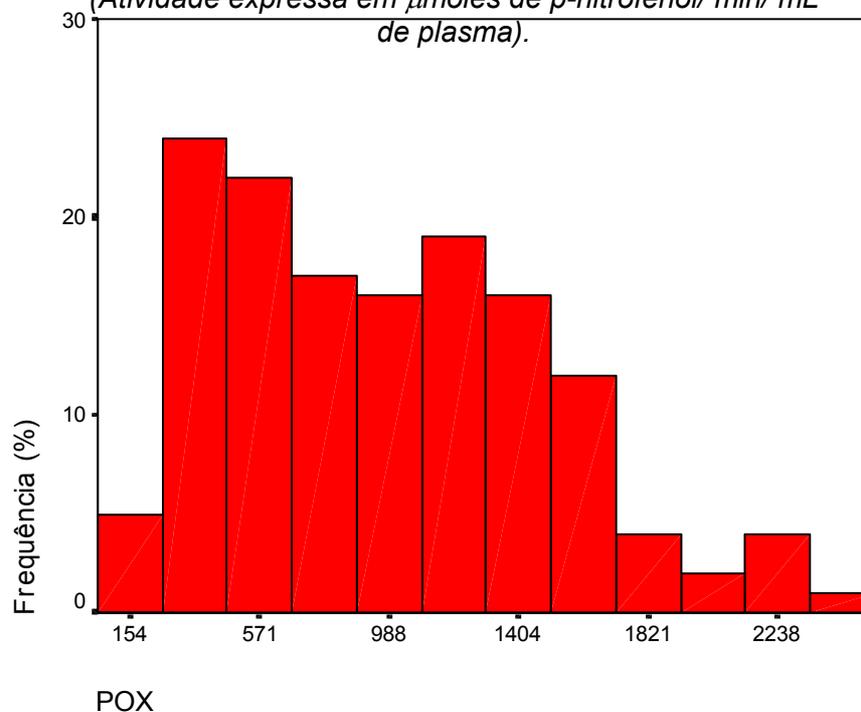
Em termos da média da atividade desta enzima, o valor para a população do Córrego de São Lourenço foi de 878,23 e para o grupo da cidade do Rio de Janeiro foi de 976,48, sendo a atividade expressa em  $\mu$ moles de *p* - nitrofenol/ min/ mL de plasma, poderemos observar mais detalhadamente os dados descritivos relativos a atividade da enzima paraoxonase nos grupos avaliados na tabela 8. Ao compararmos os grupos através do teste t de Student (tabela 9), observamos que os grupos são diferentes estatisticamente ( $T = -1,46$ ), o que poderia mais uma vez ser explicado pelos diferentes fenótipos.

*Figura 11 - Distribuição da atividade basal da enzima paraoxonase na população do Córrego de São Lourenço (Atividade expressa em  $\mu$ moles *p*-nitrofenol/ min/ mL de plasma).*



Legenda: Atividade POX - Atividade basal da enzima paraoxonase, expressa em  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/ min/ mL de plasma.

*Figura 12 - Distribuição da atividade basal da enzima paraoxonase na população da cidade do Rio de Janeiro. (Atividade expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma).*



*Legenda: Atividade POX - Atividade basal da enzima paraoxonase, expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma.*

*Tabela 8 - Análise descritiva da atividade basal da enzima paraoxonase nas populações do Córrego de São Lourenço e da cidade do Rio de Janeiro.*

Análise descritiva da atividade da enzima Paraoxonase ( $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma)	Pop. Córrego de São Lourenço	Pop. Rio de Janeiro
Média	878,23	976,48
Intervalo de confiança (95%)	779,49 - 976,96	889,06 - 1063,90
Mediana	822,24	901,64
Variância	240002,70	277682,7

Desvio padrão	489,90	526,96
Mínimo	133,28	128,92
Máximo	2329,79	2538,06
Teste de Skewness (erro padrão)	0,75 (0,24)	0,55 (0,20)
Teste de Kurtosis (erro padrão)	0,82 (0,48)	- 0,29 (0,40)

*Tabela 9 - Teste T de Student, entre a atividade basal da enzima paraoxonase (expressa em  $\mu$ moles de p-nitrofenol/ min/ mL de plasma) da população do Córrego de São Lourenço e da cidade do Rio de Janeiro.*

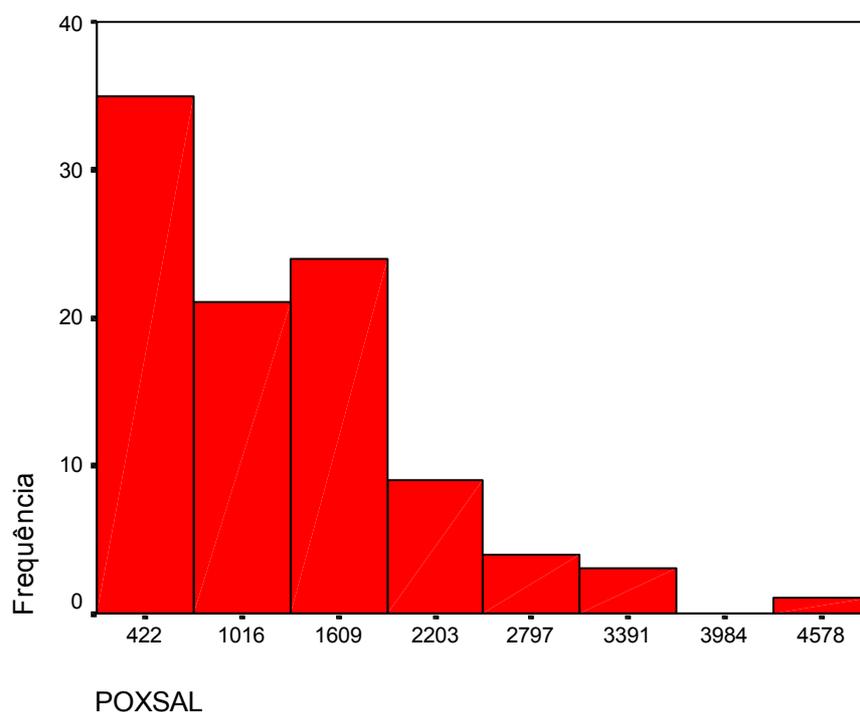
Teste T de Student (nível de significância = 5%)	
Valor de T	- 1,46
Valor de P	0,15

#### - 3.2.4.2 - Atividade da enzima paraoxonase estimulada por sal (NaCl)

Em termos de distribuição das atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl, conforme o esperado, os testes de normalidade (significância abaixo de 5%) não indicaram uma distribuição normal em ambos os grupos (figura 13 para a população do Córrego de São Lourenço e 14 para a população da cidade do Rio de Janeiro), mais uma vez isto pode ser explicado pelo polimorfismo da enzima paraoxonase, tanto da atividade basal quanto a da estimulada por NaCl, onde ao observarmos os gráficos (13 e 14) podemos perceber não só os deslocamentos detectados na última análise, mas como também a presença de mais de uma moda nos gráficos.

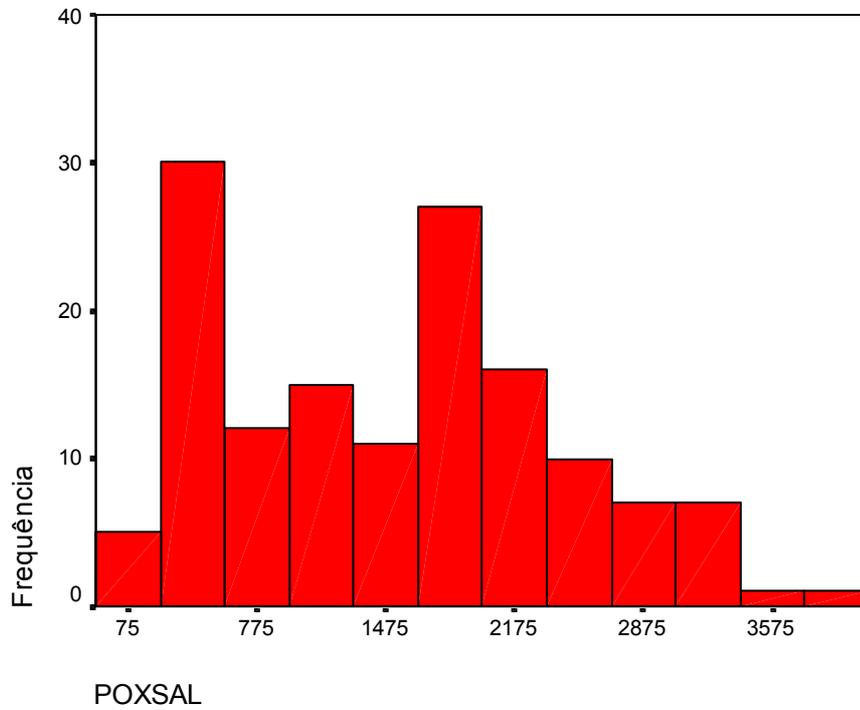
Em relação as médias encontradas obtivemos os seguintes valores para a enzima paraoxonase estimulada por NaCl, 1298,75  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/ min/ mL de plasma para a população do Córrego de São Lourenço e de 1522,66  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/ min/ mL de plasma para a população da cidade do Rio de Janeiro, os dados descritivos desta variável se encontram na tabela 10. Ao compararmos ambos os grupos através do teste t de Student ( $T = -1,89$ ), os resultados indicam que estes grupos possuem diferenças significantes entre eles (tabela 11), o que é explicado pelos diferentes fenótipos encontrados nestas populações.

*Figura 13 - distribuição das atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl na pop. do Córrego de São Lourenço.*



Legenda: Atividade POXSAL - Atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl, atividade expressa em  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/ min /mL de plasma.

Figura 14 - Distribuição da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl na população da cidade do Rio de Janeiro.



Legenda: Atividade POXSAL - Atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl, atividade expressa em  $\mu$ mole de *p*-nitrofenol/ min /mL de plasma.

*Tabela 10 - Análise descritiva das atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl nas populações de Nova Friburgo e do Rio de Janeiro.*

Análise descritiva da atividade da enzima Paraoxonase estimulada por NaCl ( $\mu$ moles de <i>p</i> -nitrofenol/ min/ mL de plasma)	Nova Friburgo	Rio de Janeiro
Média	1298,75	1522,66
Intervalo de confiança (95%)	1123,61 - 1473,89	1369,67-1675,64
Mediana	1143,28	1574,04
Variância	755138,30	850361,10
Desvio padrão	868,99	922,15
Mínimo	161,07	28,86
Máximo	4782,77	4062,53
Teste de Skewness (erro padrão)	1,18 (0,25)	0,30 (0,20)
Teste de Kurtosis (erro padrão)	1,87 (0,49)	- 0,73 (0,40)

*Tabela 11 - Teste T de Student, entre as atividades da enzima paraoxonase estimulada por NaCl (expressa em  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol/ min/ mL de plasma nas populações de Nova Friburgo e do Rio de Janeiro.*

Teste T de Student (nível de significância = 5%)	
Valor de T	- 1,89
Valor de P	0,060

### 3.2.5 - CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE COM OUTROS FATORES ANALISADOS.

A partir do projeto ao qual esta dissertação faz parte, obtivemos outros dados para que se avaliasse melhor o comportamento da enzima paraoxonase em uma população exposta e outra não exposta a pesticidas organofosforados, já que este tipo de estudo, em qualquer grupo populacional, não se encontra publicado até hoje.

Em um primeiro momento analisamos as correlações das enzimas envolvidas nesta dissertação, a paraoxonase, a paraoxonase estimulada por NaCl, arilesterase, acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática tanto na população do Córrego de São Lourenço, como na do Rio de Janeiro. Este tipo de análise se faz importante, já que todas são esterases estão envolvidas no metabolismo de pesticidas organofosforados. Assim sendo, segundo o teste de correlação de Pearson, a atividade basal da enzima paraoxonase teve correlação significativa com a atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase, enquanto que esta última atividade além da correlação citada, conforme mostrado na tabela 12.

Na população da cidade do Rio de Janeiro a atividade basal da enzima paraoxonase teve, segundo o teste de correlação de Pearson, correlação tanto com a atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl, como a da enzima arilesterase, conforme indicado na tabela 13.

Esta pequena diferença entre as correlações obtidas nos dois grupos poderiam ser explicados pelos diferentes perfis fenotípicos da enzima paraoxonase obtidos nesta dissertação e mostrados mais adiante.

Estes resultados da correlação, eram esperados devido ao fato que a atividade basal da enzima paraoxonase e a estimulada por NaCl, são na verdade a mesma enzima, diferenciado-se apenas na presença, e sua respectiva estimulação,

ou não de NaCl, e no caso da enzima arilesterase, esta possui a sua atividade ligada a da enzima paraoxonase, sendo até considerada por alguns autores como apenas mais uma das atividades da enzima paraoxonase (Mackness et al, 1996) e além disso, ela serve inclusive como um dos parâmetros utilizados para obtenção dos fenótipos da enzima paraoxonase.

**Tabela 12 – teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl e arilesterase da população do Córrego de São Lourenço.**

		POX	POXSAL	ARIL
POX	Correlação de Pearson	-	0,884 *	0,146
	Significância	0	0	0
	N	-	97	97
POXSAL	Correlação de Pearson	0,884 *	-	0,251 *
	Significância	0	0	0
	N	97	-	97
ARIL	Correlação de Pearson	0,146	0,251 *	-
	Significância	0	0	0
	N	97	97	-

\* Correlação significativa ao nível de 5%

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

**Tabela 13 – teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl e arilesterase da população da cidade do Rio de Janeiro.**

		POX	POXSAL	ARIL
POX	Correlação de Pearson	-	0,874 *	0,331 *
	Significância	-	0	0,153
	N	-	142	142
POXSAL	Correlação de Pearson	0,874 *	-	0,290 *
	Significância	0	-	0,013
	N	142	-	142
ARIL	Correlação de Pearson	0,331 *	0,290 *	-
	Significância	0	0	-
	N	142	142	-

\* Correlação significativa ao nível de 5%.

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

Como anteriormente citado a correlação entre as enzimas analisadas nesta dissertação e as colinesterases, se faz importante pelo fato que são esterases envolvidas no metabolismo de pesticidas organofosforados, e são também conhecidos indicadores biológicos de efeito para estes agentes. Então ao realizarmos o teste de correlação de Pearson destas enzimas (tabela 14 para a população da cidade do Rio de Janeiro e tabela 15 para a população do Córrego de São Lourenço), observamos que em ambas as populações nenhuma correlação foi encontrada, com exceção da correlação entre a atividade basal da enzima paraoxonase e a atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária encontrada na população do Córrego de São Lourenço. Propor qualquer conclusão a respeito desta correlação seria no mínimo precipitado, já que os dados obtidos aqui seriam insuficientes para se propor qualquer definição a respeito desta correlação. Uma suposição a respeito desta relação entre estas enzimas poderia estar ligada não a fatores genéticos ou ligados a exposição a pesticidas organofosforados, mas sim de alguma forma poderiam estar ligados aos tecidos envolvidos na síntese destas enzimas, seja por alguma doença ou por fatores alimentares presentes nesta população.

Tabela 14 – teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl, arilesterase, acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática da população da cidade do Rio de Janeiro.

		POX	POXSAL	ARIL	ACHE	BCHE
BCHE	Correlação de Pearson	0,065	0,069	0,093	-0,012	-
	Significância	0,445	0,415	0,269	0,888	-
	N	142	142	142	142	-
ACHE	Correlação de Pearson	-0,062	-0,030	0,007	-	-0,012
	Significância	0,462	0,726	0,934	-	0,888
	N	142	142	142	-	142

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

Tabela 15 – teste de correlação de Pearson entre as enzimas paraoxonase, paraoxonase estimulada por NaCl, arilesterase, acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática da população do Córrego de São Lourenço

		POX	POXSAL	ARIL	ACHE	BCHE
BCHE	Correlação de Pearson	0,032	0,161	-0,042	-	-0,097
	Significância	0,757	0,114	0,682	-	0,346
	N	97	97	97	-	97
ACHE	Correlação de Pearson	-0,234*	-0,130	0,056	-0,097	-
	Significância	0,021	0,205	0,588	0,346	-
	N	97	97	97	97	-

\* Correlação é significativa ao nível de 5%.

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

### 3.2.6 – COMPORTAMENTO DA ENZIMA PARAOXONASE EM UMA POPULAÇÃO EXPOSTA A PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

Uma análise entre os fenótipos, as atividades enzimáticas, dados relativos aos aspectos laborais desta população envolvendo a aplicação de pesticidas organofosforados, dados clínicos e epidemiológicos, foram realizados afim de se visualizar o comportamento da enzima paraoxonase em uma população exposta a agentes organofosforados e também coletar dados preliminares a respeito de um possível papel protetor desta enzima frente a compostos organofosforados em humanos.

Cabe ressaltar que esta análise foi realizada com 73 indivíduos, pelo fato destes dados estarem disponíveis somente para estes indivíduos.

Esta análise envolveu as seguintes variáveis: atividade paraoxonase (basal e estimulada por NaCl), atividade da arilesterase; nível de atividade das enzimas butirilcolinesterase e acetilcolinesterase, sendo este grupo separados em atividade acima ou abaixo do valor considerado normal; fenótipo trimodal (razão da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl sobre a atividade da enzima arilesterase, sendo AA o fenótipo de baixa atividade, AB o de atividade intermediária e BB o de alta atividade hidrolítica); fenótipo bimodal, que leva em conta o percentual de estimulação por NaCl da enzima paraoxonase, onde consideramos o fenótipo A, o que possui estimulação por NaCl menor que 60% e o fenótipo B os que possuem estimulação acima de 60%; avaliação clínica, onde os indivíduos são clinicamente considerados intoxicados ou não; e dados relativos as atividades envolvendo a utilização de pesticidas nesta população, estas variáveis levantadas foram: aplicação de pesticidas, contato da pele com pesticidas no processo de manuseio dos pesticidas, uso de equipamento de proteção tanto na aplicação de

pesticidas, quanto na mistura destes, hábitos de higiene após a jornada de trabalho (tomar banho e lavagem das mãos) e se o trabalhador já se sentiu mal aplicando pesticidas na lavoura.

Então ao realizarmos um teste t de amostras independentes entre as enzimas analisadas nesta dissertação (paraoxonase, basal e estimulada por NaCl e arilesterase) e o nível de atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática, observamos que não existe diferença estatística entre o grupo com atividade abaixo do valor considerado normal e o grupo com atividade acima, para os 3 grupos enzimáticos analisados (tabela 16).

*Tabela 16 – teste t de amostras independentes entre as enzima paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com nível de atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada.*

Teste t para igualdade de médias

	Valor de t	Graus de liberdade	Significância
POX	-1,203	69	0,233
POXSAL	-0,508	69	0,613
ARIL	-0,365	69	0,716

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

A tabela 17 nos mostra que o nível de atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária, também não possui influência na atividade das enzimas aqui analisadas.

*Tabela 17 – teste t de amostras independentes entre as enzima paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com nível de atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada.*

Teste t para igualdade de médias

	Valor de t	Graus de liberdade	Significância
POX	-0,955	69	0,343
POXSAL	-0,680	69	0,499
ARIL	-0,577	69	0,566

Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.

Ao relacionarmos as enzimas analisadas com a avaliação clínica dos trabalhadores do Córrego de São Lourenço, também não demonstraram nenhuma influência nas atividades avaliadas (tabela 18).

*Tabela 18 – teste t de amostras independentes entre as enzima paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com a avaliação clínica dos trabalhadores, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada.*

Teste t para igualdade de médias			
	Valor de t	Graus de liberdade	Significância
POX	0,332	69	0,741
POXSAL	0,493	69	0,624
ARIL	-0,395	69	0,694

*Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.*

Nenhuma relação entre as atividades analisadas e dados relativos as atividades envolvendo a utilização de pesticidas nesta população (aplicação de pesticidas, contato da pele com pesticidas no processo de manuseio dos pesticidas, uso de equipamento de proteção tanto na aplicação de pesticidas, quanto na mistura destes), hábitos de higiene após a jornada de trabalho (tomar banho e lavagem das mãos) e se o trabalhador já se sentiu mal aplicando pesticidas na lavoura, conforme nos mostra a tabela 19.

Ao realizarmos o teste de  $\chi^2$  e a análise de ODDS RATIO envolvendo o percentual de estimulação por NaCl da enzima paraoxonase, categorizado em indivíduos com percentual de estimulação menor que 60% (A) e indivíduos com percentual de estimulação maior que 60% (B), com os dados relativos as atividades envolvendo a utilização de pesticidas nesta população (aplicação de pesticidas, contato da pele com pesticidas no processo de manuseio dos pesticidas, uso de equipamento de proteção tanto na aplicação de pesticidas, quanto na mistura

destes), hábitos de higiene após a jornada de trabalho (tomar banho e lavagem das mãos) e se o trabalhador já se sentiu mal aplicando pesticidas na lavoura, não obtivemos nenhuma relação com significância estatística entre as variáveis.

Também não foi encontrado nenhuma relação quando confeccionamos um teste de  $\chi^2$  e a análise de ODDS RATIO utilizando a distribuição trimodal da enzima paraoxonase (AA, AB e BB) e os demais dados anteriormente relacionados.

Tabela 19 – teste t de amostras independentes entre as enzima paraoxonase (basal e estimulada por NaCl) e arilesterase, com a avaliação clínica dos trabalhadores, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada.

Teste t para igualdade de médias			
Aplica pesticidas em suas culturas?			
	Valor de t	Graus de liberdade	Significância
POX	-0,293	95	0,770
POXSAL	-1,076	95	0,285
ARIL	-1,824	95	0,071
Sua pele entra em contato com o pesticida?			
POX	0,777	95	0,439
POXSAL	1,086	95	0,280
ARIL	0,619	95	0,538
Usa equipamento de proteção durante a mistura de pesticidas?			
POX	1,074	95	0,286
POXSAL	0,624	95	0,534
ARIL	0,346	95	0,730
Usa equipamento de proteção durante a aplicação de pesticidas?			
POX	-0,940	95	0,350
POXSAL	-1,021	95	0,310
ARIL	-1,435	95	0,154
Lava as mão após a jornada de trabalho?			
POX	-0,450	86	0,654
POXSAL	-0,155	86	0,877
ARIL	-0,489	86	0,626
Toma banho após a jornada de trabalho?			
POX	0,682	95	0,497
POXSAL	0,786	95	0,434
ARIL	0,713	95	0,478

	Já passou mal aplicando pesticidas?		
POX	0,568	95	0,572
POXSAL	-0,168		0,867
ARIL	0,497		0,621

*Legenda: POX = atividade basal da enzima paraoxonase; POXSAL = atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase; ARIL = atividade da enzima arilesterase; N = Número de indivíduos analisados no teste.*

### 3.2.7 - Regressão linear e logística da enzima paraoxonase e seus respectivos fenótipos com os outros fatores avaliados

Neste tópico iremos avaliar o comportamento da enzima paraoxonase e seus respectivos fenótipos frente aos dados laboratoriais, clínicos e epidemiológicos, na população do Córrego de São Lourenço a fim de se avaliar a influência deste caractere frente a estes dados, para tal análise nos valeremos da regressão, tanto a linear, quanto a logística, dependendo da natureza da variável analisada.

Ao efetuarmos a regressão linear entre a enzima paraoxonase e os demais dados analisados, não obtemos nenhuma relação estatisticamente significativa entre eles, apesar de algumas variáveis analisadas se encontrarem próximas da fronteira de significância (tabela 20), o que indicaria uma necessidade de maiores estudos a respeito destas relações.

No caso da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl, a regressão linear não apresentou nenhuma correlação entre os dados, não apresentando nenhum dado na fronteira de significância da regressão (tabela 21), assim como também a enzima arilesterase (tabela 22).

Usando a regressão logística, os fenótipos trimodais baseados na razão da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl sobre a atividade da enzima arilesterase, não apresentaram nenhuma correlação com as demais variáveis (dados não apresentados).

Ao nos utilizarmos do percentual de estimulação por NaCl da enzima paraoxonase, categorizados em indivíduos com percentual de estimulação acima de 60% e indivíduos com percentual abaixo deste valor, para realizar uma regressão logística (tabela 23) com os outros dados anteriormente relacionados, foi encontrado uma relação positiva entre o percentual de estimulação por NaCl e a atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática e também averiguamos outras variáveis, que estão na fronteira de significância, variáveis como: a atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária e a aplicação de pesticidas na lavoura.

Uma conclusão mais precisa a respeito destas relações, seria impossível neste momento devido a falta de maiores dados, uma das suposições que poderia ser citada seria que, de certa forma o contato com agentes organofosforados, já que estas correlações foram apenas encontradas em uma população exposta a estes pesticidas, poderiam induzir um aumento na síntese da enzima paraoxonase, já que efeito semelhante já foi detectado no caso da enzima butirilcolinesterase plasmática, após episódios de intoxicação por agentes anticolinesterásicos. Mais uma vez para estudos mais detalhados a respeito desta resposta do organismo seriam necessárias para a obtenção de uma conclusão definitiva. Observamos também que nesta regressão logística foi achada também uma interação da variável atividade da enzima butirilcolinesterase com outras das variáveis analisadas, mais uma vez no mostrando uma inesperada relação desta enzima com os fenótipos baseado na estimulação por NaCl (dados não apresentados).

Tabela 20 – Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade basal da enzima paraoxonase.

Variável	B	Valor de t	Significância
Constante	2148,802	3,257	0,002
BCHE	32,061	0,437	0,664
ACHE	-321,539	-1,554	0,126
BCHETOX	375,568	1,620	0,111
ACHETOX	203,755	0,799	0,428
AVALCLIN	-220,632	-1,620	0,111
APLAGROT	-111,298	-0,582	0,563
CONTPELE	-205,959	-0,656	0,514
EPIMISTU	-310,235	-1,370	0,176
EPIAPLIC	191,350	1,352	0,182
LAVAMAO	-139,462	-1,141	0,259
BANHOAPO	-36,580	-0,233	0,817
MALPOSAP	-140,590	-1,085	0,283

*Legenda: BCHE=atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática; ACHE=atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária;*

*BCHETOX=categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática considerada normal; ACHETOX= categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária considerada normal;*

*AVALCLIN=avaliação clínica da população analisada, categorizando-os em intoxicado ou não intoxicado;*

*APLAGROT=categorização dos indivíduos que aplicam ou não pesticidas em suas culturas; CONTPELE= categorização dos indivíduos no qual a pele tem contato ou não com pesticidas durante o manuseio dos pesticidas organofosforados.*

*EPIMISTU= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a mistura dos pesticidas organofosforados;*

*EPIAPLIC= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a aplicação dos pesticidas organofosforados;*

*LAVAMAO= categorização dos indivíduos que lavam ou não as mãos após o manuseio de pesticidas organofosforados;*

*BANHOAPO= categorização dos indivíduos que tomam ou não banho após o manejo de pesticidas organofosforados;*

*MALPOSAP= categorização dos indivíduos que passaram mal ou não após a aplicação de pesticidas organofosforados.*

*Tabela 21 – Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade estimulada por NaCl da enzima paraoxonase.*

Variável	B	Valor de t	Significância
Constante	2293,003	2,157	0,035
BCHE	132,794	1,124	0,266
ACHE	35,859	0,108	0,915
BCHETOX	443,775	1,188	0,240
ACHETOX	369,092	0,898	0,373
AVALCLIN	-266,620	-1,215	0,229
APLAGROT	-41,727	-0,135	0,893
CONTPELE	-319,546	-0,632	0,530
EPIMISTU	-551,326	-1,511	0,136
EPIAPLIC	230,495	1,011	0,317
LAVAMAO	-204,558	-1,039	0,303
BANHOAPO	-94,349	-0,372	0,711
MALPOSAP	-118,732	-0,569	0,572

*Legenda: BCHE=atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática; ACHE=atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária;*

*BCHETOX=categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática considerada normal; ACHETOX= categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária considerada normal;*

*AVALCLIN=avaliação clínica da população analisada, categorizando-os em intoxicado ou não intoxicado;*

*APLAGROT=categorização dos indivíduos que aplicam ou não pesticidas em suas culturas; CONTPELE= categorização dos indivíduos no qual a pele tem contato ou não com pesticidas durante o manuseio dos pesticidas organofosforados.*

*EPIMISTU= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a mistura dos pesticidas organofosforados;*

*EPIAPLIC= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a aplicação dos pesticidas organofosforados;*

*LAVAMAO= categorização dos indivíduos que lavam ou não as mãos após o manuseio de pesticidas organofosforados;*

*BANHOAPO= categorização dos indivíduos que tomam ou não banho após o manejo de pesticidas organofosforados;*

*MALPOSAP= categorização dos indivíduos que passaram mal ou não após a aplicação de pesticidas organofosforados.*

*Tabela 22 – Regressão linear das variáveis analisadas em relação com a atividade da enzima arilesterase.*

Variável	B	Valor de t	Significância
Constante	70,836	1,829	0,073
BCHE	-1,525	-0,354	0,724
ACHE	14,697	1,210	0,231
BCHETOX	-0,258	-0,019	0,985
ACHETOX	12,998	0,868	0,389
AVALCLIN	-0,163	-0,020	0,984
APLAGROT	2,906	0,259	0,797
CONTPELE	-6,996	-0,380	0,706
EPIMISTU	-7,634	-0,574	0,568
EPIAPLIC	4,638	0,558	0,579
LAVAMAO	-1,005	-0,140	0,889
BANHOAPO	0,440	0,048	0,962
MALPOSAP	1,526	0,201	0,842

*Legenda: BCHE=atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática; ACHE=atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária;*

*BCHETOX=categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática considerada normal; ACHETOX= categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária considerada normal;*

*AVALCLIN=avaliação clínica da população analisada, categorizando-os em intoxicado ou não intoxicado;*

*APLAGROT=categorização dos indivíduos que aplicam ou não pesticidas em suas culturas;*

*CONTPELE= categorização dos indivíduos no qual a pele tem contato ou não com pesticidas durante o manuseio dos pesticidas organofosforados.*

*EPIMISTU= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a mistura dos pesticidas organofosforados;*

*EPIAPLIC= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a aplicação dos pesticidas organofosforados;*

*LAVAMAO= categorização dos indivíduos que lavam ou não as mãos após o manuseio de pesticidas organofosforados;*

*BANHOAPO= categorização dos indivíduos que tomam ou não banho após o manejo de pesticidas organofosforados;*

*MALPOSAP= categorização dos indivíduos que passaram mal ou não após a aplicação de pesticidas organofosforados.*

*Tabela 23 – Regressão logística das variáveis analisadas em relação com os fenótipos bimodal baseados no percentual de estimulação por NaCl.*

Variável	B	Significância	ODDS Ratio
BCHE*	0,8872	0,0463*	2,4284
ACHE	3,8370	0,1062	3,1726
BCHETOX	0,1083	0,9476	1,1143
ACHETOX	0,8932	0,5805	2,4429
AVALCLIN	-0,2289	0,7866	0,7954
APLAGROT	1,4667	0,1660	4,3333
CONTPELE	-7,1002	0,8124	0,0008
EPIMISTU	-1,0521	0,4704	0,3492
EPIAPLIC	0,1525	0,8634	1,1647
LAVAMAO	0,5383	0,5572	0,5837
BANHOAPO	0,3427	0,7141	0,7099
MALPOSAP	0,7031	0,3587	2,0200
Constante	-1,4115	0,9626	-

\* Regressão significativa ao nível de 5%.

*Legenda: BCHE=atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática; ACHE=atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária;*

*BCHETOX=categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima butirilcolinesterase plasmática considerada normal; ACHETOX= categorização de indivíduos com valor acima ou abaixo do valor da atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária considerada normal;*

*AVALCLIN=avaliação clínica da população analisada, categorizando-os em intoxicado ou não intoxicado;*

*APLAGROT=categorização dos indivíduos que aplicam ou não pesticidas em suas culturas; CONTPELE= categorização dos indivíduos no qual a pele tem contato ou não com pesticidas durante o manuseio dos pesticidas organofosforados.*

*EPIMISTU= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a mistura dos pesticidas organofosforados;*

*EPIAPLIC= categorização dos indivíduos que usam ou não equipamento de proteção individual durante a aplicação dos pesticidas organofosforados;*

*LAVAMAO= categorização dos indivíduos que lavam ou não as mãos após o manuseio de pesticidas organofosforados;*

*BANHOAPO= categorização dos indivíduos que tomam ou não banho após o manejo de pesticidas organofosforados;*

*MALPOSAP= categorização dos indivíduos que passaram mal ou não após a aplicação de pesticidas organofosforados.*

### 3.3 - DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA DA ENZIMA PARAOXONASE NAS POPULAÇÕES DO CÓRREGO DE SÃO LOURENÇO E DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Baseando - se na metodologia utilizada por Eckerson et. al. (1983a e 1983b), no qual o fenótipo é dado pela razão da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl (figura 15 para o Córrego de São Lourenço e figura 16 para a população da cidade do Rio de Janeiro) e a atividade da enzima arilesterase, os seguintes perfis fenotípicos foram encontrados na população do Córrego de São Lourenço (tabela 24): cerca de 44% dos indivíduos apresentava o fenótipo AA (baixa capacidade hidrolítica), aproximadamente 52% apresentava a tipologia AB (capacidade hidrolítica intermediária) e por volta de 4% dos indivíduos apresentava o tipo BB (alta capacidade hidrolítica) da enzima paraoxonase, o que nos mostra um perfil de distribuição bastante diferenciado em relação ao perfil encontrado na cidade do Rio de Janeiro, RJ (tabela 25). O qual possuiu a seguinte distribuição: aproximadamente 36% dos indivíduos apresentaram o fenótipo AA, 52% foram do tipo AB e 12 % do tipo BB, o que nos mostra uma diferença acentuada, principalmente no diz respeito ao fenótipo BB entre estas populações, que poderia ser explicado pelo fato não só de a população do Córrego de São Lourenço ser um grupo semi-isolado geograficamente, mas como também pelo fato de ser uma população que na sua maioria, possui uma origem étnica bem definida (Europa), o que já não acontece na cidade do Rio de Janeiro – RJ. Estudos a respeito dos fenótipos da enzima paraoxonase em outras regiões brasileiras seriam necessários a fim de se traçar um perfil definitivo desta enzima na população brasileira.

Figura 15 – Razão entre a atividade da enzima paraoxonase e da enzima arilesterase (fenótipo), na população do Córrego de São Lourenço.

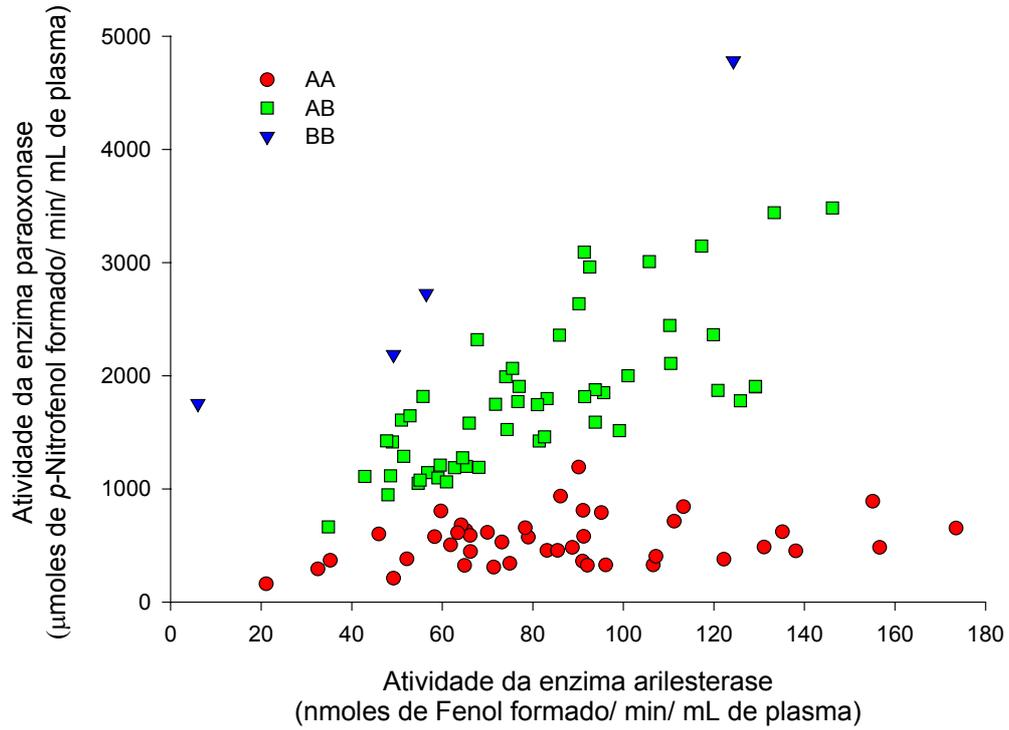
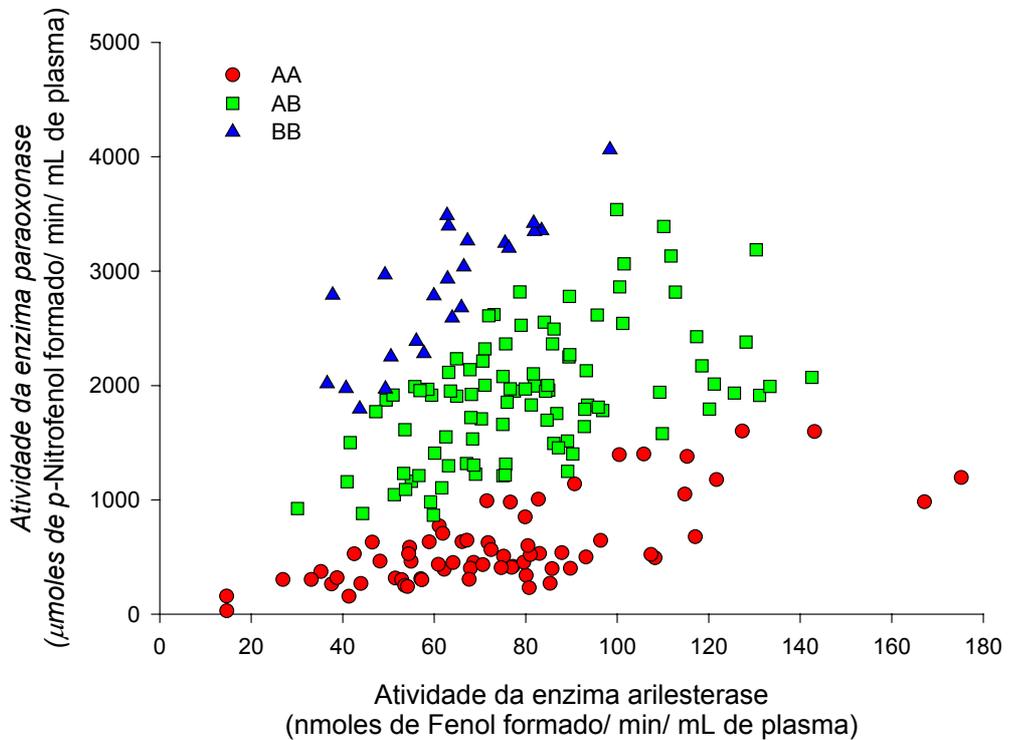


Figura 16 – Razão entre a atividade da enzima paraoxonase e da enzima arilesterase (fenótipo), na população do Córrego de São Lourenço.



*Tabela 23 – Distribuição dos fenótipos da população do Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo – RJ.*

Fenótipo	Frequência (%)
AA (baixa capacidade hidrolítica)	44,18
AB (capacidade hidrolítica intermediária)	51,96
BB (alta capacidade hidrolítica)	3,92

*Tabela 24 – Distribuição dos fenótipos da população da Cidade do Rio de Janeiro, RJ.*

Fenótipo	Frequência (%)
AA (baixa capacidade hidrolítica)	36,17
AB (capacidade hidrolítica intermediária)	51,60
BB (alta capacidade hidrolítica)	12,23

#### 4 – CONCLUSÕES

A partir dos dados aqui apresentados, além de ser o primeiro trabalho de caracterização dos fenótipos da enzima paraoxonase em populações brasileiras, podemos concluir que estudos mais refinados a respeito não só do comportamento da enzima, mas como também da quantificação da exposição a pesticidas organofosforados são necessários para a elucidação do papel protetor e do seu consequente uso como indicador de susceptibilidade humana, se fazem necessários.

4 -

REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

Albert, L. A. (1988) *Curso Básico de Toxicología Ambiental*. Noriega Editores, 2ª ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO)/ Organización Panamericana de Salud (OPAS)/ Organización Mundial de Salud (OMS), Metepec, México

Adkins, S., Gan, K. N., Mody, M., La Du, B. N. (1993) Molecular Basis for the Polymorphic forms of Human Serum Paraoxonase / Arylesterase: Glutamine or Arginine at Position 191, for the respective A or B Allozymes. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 598 - 608

Aldridge, W. N. (1953) Serum Esterases: an Enzyme Hydrolyzing Diethyl *p*-Nitrophenyl Phosphate (E 600) and its Identity with the A - Esterase of Mammalian Sera. *Biochem. J.* 53: 117 - 124

Antikainen, M., Murtomäki, S., Syväne, M., Pahlman, R., Tahvanainen, E., Jauhiainen, M., Frick, M. H., Ehnholm, C. (1996) The Gln - Arg191 Polymorphism of the Human Paraoxonase Gene (HUMPONA) is Not Associated with the Risk of Coronary Artery Disease in Finns. *J. Clin. Invest.* 98: 883 - 85.

Bernard, A. M. (1995). Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendations for application in population studies. *Toxicol.* 101: 65 – 71

Brealey, C. J., Walker, C. H., Baldwin, C. B. (1980) A - Esterase Activities in Relation to the Differential Toxicity of Pirimiphos - Methyl to Birds and Mammals. *Pestic. Scien.* 11: 546 - 54

Chatel, J. M., Anselmet, A., Vallette, F. M., Massoulié, J. (1994) Multilevel Regulation of Acetylcholinesterase Biosynthesis and Maturation. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 735 - 40

Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P. (1996) *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story*. Dutton Books, New York. 306 pp.

Costa, L. G., McDonald, B. E., Murphy, S. D., Omenn, G. S., Richeter, R. J., Motulsk, A. G., Furlong, C. E. (1990) Serum Paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and Chlorpyrifos - oxon Toxicity in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103: 66 - 76

Costa, L. G., Manzo, L. (1995) Biochemical Markers of Neurotoxicity: Research Strategies and Epidemiological Applications. *Toxicol. Lett.* 77: 137-44

Cremlin, R. (1978). *Pesticides – Preparation and Mode of Action*. Ed. John & Sons, London.

Cunha, J. C. (1996) Padronização da Metodologia Para Avaliação de Colinesterase Eritrocitária: Otimização das Técnicas Para Monitoramento da Exposição Ocupacional a Pesticidas Organofosforados. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana. 68 pp.

Ecobichon, D. J. (1996). Toxic Effects of Pesticides. In: Klassen, D. Casarett & Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5<sup>th</sup> ed. Pergamon Press Inc., New York

Eckerson, H. W.; Romson, J.; Wyte, C. & La Du, B. N. ( 1983a ) The human serum Paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 214 – 227

Eckerson, H. W.; Wyte, C. & La Du, B. N. ( 1983b ) The human serum Paraoxonase/Arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 1126 – 1138

Elman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr., V.; Featherstone, M. ( 1961 ) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7 : 88 - 95

Fait, A. (1994) Introduction: General Structure of the Manual. *Toxicology* 91:1-3.

Ferrer, A. e Cabral, R. (1995). Recants Epidemics of Poisoning by Pesticides. *Toxicol. Lett.* 82/83: 55-63.

Forget, G. (1991). Pesticides and the Third World. *J. Toxicol. Environ. Health.* 32: 11-31

Geldmacher, V., Mallinckodt, M., Diepgen, T. L. (1988) The Human Paraoxonase Polymorphism and Specificity. *Toxicol. Env. Chem.* 18: 79 - 196

Goodman, L. S. e Gilman, A. G. (1988) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 7<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Hasset, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinsk, C. J., Furlong, C. E. (1991) Characterization of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: the Mature Protein Retains its Signal Sequence. *Biochem.* 30: 10141 - 49.

He, F. (1993). Biological Monitoring of Occupational Pesticides Exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*: S69 – S70.

Heinecke, J. W., Lusic, A. J. (1998) Paraoxonase - Gene Related Polymorphisms Associated with Coronary Heart Disease: Support for the Oxidative Damage Hypothesis? *Am. J. Genet.* 62: 20 - 4.

Henao, S. e Corey, G. (1986). Serie Vigilancia 2: *Plaguicidas Organofosforados e Carbamicos*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO)/ Organización Panamericana de Salud (OPAS)/ Organización Mundial de Salud (OMS), Metepec, México.

[http://www.mitretek.org/ofere/energy/cw\\_page/cwagente.html](http://www.mitretek.org/ofere/energy/cw_page/cwagente.html)

Humbert, R., Adler, D. A., Distecke, C. M., Hasset, C., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E. (1993) The Molecular Basis of the Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism. *Nature Genet.* 3: 73 - 6

Ikeda, Y., Suehiro, T., Inoue, M., Nakauchi, Y., Morita, T., Arii, K., Ito, H., Kumon, Y., Hashimoto, K. (1998) Serum Paraoxonase Activity and its Relation Ship to Diabetic Complications in Patients with Non - Insulin - Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism.* 5: 598 - 602

Jeyaratnam, J. (1990) Acute Pesticide Poisoning: A Major Global Health Problem. *Rapp. Trimest. Sanit Mond.* 43: 139-144

Jeyaratnam, J. e Maroni, M. (1994). Organophosphorous Compounds. *Toxicology* 91: 15-27.

Kandel, E.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. (1991). *Principles of Neural Science*, 3<sup>rd</sup> Ed Appleton & Lange, International Edition.

Kao, Y., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., Silink, M. (1998) A Variant of Paraoxonase (PON1) Gene is Associated with Diabetic Retinopathy in IDDM. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 83 (7): 2589 - 92

Kim, J. Q., Song, J., Park, Y. B. (1998) Molecular Bases of Coronary Heart Disease in Korea. *Journal of Korean Medical Science.* 13 (1): 1 - 15 (Feb).

La Du, B. N., Adkins, S., Kuo, C., Lipsig, D. (1993) Studies on serum Paraoxonase/ Arylesterase. *Chem - Biol. Interactions.* 87: 25 - 34

Larine, L. (1987) *Toxicologia*. Ed Manole LTDA. São Paulo.

Li, W. F., Furlong, C. E., Costa L. G. (1995) Paraoxonase Protects Against Chlorpyrifos Toxicity in Mice. *Toxicol. Lett.* 76: 219 - 26.

Li, W., Costa, L. G., Furlong, C. E. (1993) Serum Paraoxonase Status: A Major Factor in Determining Resistance to Organophosphates. *J. Toxicol. Env. Health.* 40: 337 - 46.

Lowry, L. K. (1995) Role of Biomarkers of Exposure in the Assessment of Health Risks. *Toxicol. Lett.* 77: 31-38

Mackness, M. I., (1989). A – Esterases enzymes looking for a role? *Biochem. Pharmacol.* 38(3): 385 – 390

Mackness, M. I., Mackness, B., Durrington, P. N., Connelly, P. W., Hegele, R. A. (1996) Paraoxonase: Biochemistry, Genetics and Relationship to Plasma Lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*. 7 (2): 69 - 76 Apr.

Main, A. R. (1976). Structure and Inhibitors of Cholinesterase. In: Goldberg, A. M. e Hamin, I. *Biology of Cholinergic Function*. Raven Press, New York.

Manzur, A. (1946) An Enzyme in Animal Tissue Capable of Hydrolyzing the Phosphorusfluorine Bond of Acyl Fluorophosphates. *J. Biol. Chem.* 164: 271-89

Marrs, T. C. (1993). Organophosphate Poisoning. *Pharmac. Ther.* 58: 51-66

Massoulié, J., Sussman, J., Bom, S., Silman, I. (1993) Structure and Function of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Progr. Brain Res.* 98: 139 - 46

McConnell, R. (1994). Pesticides and related Compounds. In: L. Rosenstock and R Cullen, *textbook Clinical Occupational and Environmental Medicine*, W. B. Saunders Co.

Meyer, A. (1998). Padronização de Metodologia para a Determinação de Pesticidas Organofosforados em Plasma Humano, Utilizando Cromatografia Líquida de alta Eficiência. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana. 90 pp.

Moraes, F. F. M. (1997) Padronização da dosagem da atividade da enzima paraoxonase em camundongos. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana. 80 pp.

Mowbray, T. R. (1975). *Pesticide Use in South Pacific*. UNEP (Regional Seas Reports and Studies, nº 89) Nairobi.

Nutley, B. P. e Cocker, J. (1993) Biological Monitoring of Workers Occupationally Exposed to Organophosphorous Pesticides. *Pesticide Science*. 38:315-22

Oliveira - Silva, A.L.; Moreira, J. C.; Menezes, A. C.; Oliveira - Silva, J. J.; Lima, J. S. (1998) Determinação dos Aspectos Cinéticos da Enzima Arolesterase (E.C.3.1.1.2) em Plasma Humano. Trabalho apresentado na XIII Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE).

Ott, P. (1985) Membrane Acetylcholinesterase: Purification, Molecular Properties and Interactions with Amphiphilic Environments. *Biochem. Et Biophys. Acta*. 822: 375 - 92

Pantuk, E. J. (1993) Plasma Cholinesterase: Gene and Variations. *Anesth. Analog.* 77: 380 - 86

Parkinson, A. (1996). Biotransformation of Xenobiotics In: Klassen, D. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5<sup>th</sup> ed. Pergamon Press Inc., New York

Pimentel, D. (1996). Green Revolution Agriculture and Chemical Hazards. *The Science of the Total environmental* 188 (suppl. 1): S86 – S98

Pond, A. L., Chambers, H. W., Chambers, J. E. (1995) Organophosphate Detoxification Potential of Various Rat Tissues via A - Esterases and Aliesterase Activities. *Toxicol. Lett.* 78: 245 - 52

Rozman, K. K. e Klassen, C. D. (1996). Absorption, Distribution and Excretion of Toxicants. In: Klassen, D. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5<sup>th</sup> ed. Pergamon Press Inc., New York

Raheel, M. (1988). Dermal Exposure to Pesticides: The Barrier Effectiveness of Protective Clothing. *Journal of Environmental Health*, 51(2): 82-84.

Ruiz, J. (1997) Diabetes Mellitus and the Late Complications: Influence of the Genetic Factors. *Diabetes & Metabolism.* 23: 57 - 63.

Sanghera, D. K., Aston, C. E., Saha, N., Kamboh, M. I. (1998) DNA Polymorphism in Two Paraoxonase Genes (PON1 and PON2) Are Associated with the Risk of Coronary Heart Disease. *Am. J. Genet.* 62: 36 - 44

Sanghera, D. K., Saha, N., Aston, C. E., Kamboh, M. I. (1997) Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 (6): 1067 - 73.

Sherma, J. (1995) *Pesticides. Anal. Chem.* 67:1R - 20R

Smith, A. B., Esko, J. D., Hajduk, S. L. (1995) Killing of Trypanosomes by the Human Haptoglobin - Related Protein. *Science.* 268: 284 - 86.

Soreq, H., Gnatt, A., Loewenst, Y., Neville, L. F. (1992) Excavations into the active - site gorge of cholinesterases. *TIBS.* 17: 353 - 58.

Taylor, P. (1991) The Cholinesterases. *The J. Biol. Chem.* 266 (7): 4025-28

Valle, L. B. (1988). *Farmacologia Integrada.* Ed. Atheneu. São Paulo.

Van Lith, H. A.; Van Zutpen, L. F. M.; Beynen, A. C. (1991) Butyrylcholinesterase Activity in Plasma of rats and Rabbits Fed High - Fat Diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 98A (2): 339 - 42

Vorhaus, L. J. e Kark, R. M. (1953) Serum Cholinesterase in Health and Disease. *Am. J. Med.* (Jun) 707 - 719

Walker, C. H. (1993) The Classification of Esterases which Hydrolyze Organophosphates: Recent Developments. *Chem - Biol. Interactions.* 87: 17 - 24

Weber, W. W. (1995) Influence of Heredity on Human Sensitivity to Environmental Chemicals. *Environ. Molec. Mutagen.* 25 (suppl 26): 102 - 14

WHO / UNEP. (1990). *Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture.* Geneva: World Health Organization/ United Nations Environment Program.