

# **Avaliação poder de inibição da acetilcolinesterase promovido pelo praguicida aldicarbe e seus metabólitos utilizando método enzimático de triagem rápido, seguro e de baixo custo**

***André Rinaldi Fukushima***

***Graduado em Farmácia pela Universidade São Judas Tadeu, Mestre em Ciências Farmacêuticas pela USP e Doutor em Patologia Experimental e Comparada pela USP.***

***E-mail: fukushima@usp.br***

***Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov***

***Graduada em Medicina Veterinária pela USP, Doutora em Oncologia pela FAP.***

***Virginia Martins Carvalho***

***Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de Guarulhos, Especialização em Docência em Saúde pela UFRGS, Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela USP, Doutora em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela USP, Pós Doutorado em Toxicologia Experimental pela USP.***

***Adriana de Siqueira***

***Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná, Mestre em Ciências pelo Programa de Patologia Experimental e Comparada pela USP, Doutora em Ciências pelo Programa de Patologia Experimental e Comparada pela USP.***

***Everton Barbosa Bertaglia***

***Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade São Judas Tadeu, Mestre em Ciências pelo Programa de Patologia Experimental e Comparada pela USP.***

***Vagner Gonçalves Junior***

***Graduado em Farmácia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie, Mestre em Patologias Experimental e Comparada pela USP, Doutor em Patologia Experimental e Comparada pela USP.***

***Maria Aparecida Nicoletti***

***Graduada Farmácia e Bioquímica pela UNESP, Especialização em Farmácia Homeopática pela USP e em Gestão da Assistência Farmacêutica pela UFSC, Mestre em Fármaco e Medicamentos pela USP, Doutora em Fármaco e Medicamentos pela USP.***

***Paulo César Maiorka***

***Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria, Mestre em Patologia Experimental e Comparada pela USP, Doutor em Patologia Experimental e Comparada pela USP.***

***Helenice de Souza Spinosa***

***Graduada em Medicina Veterinária pela USP, Mestre em Fisiologia pela USP, Doutora em Fisiologia pela USP.***

***Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol10ed3.288>***

**Resumo**

As intoxicações letais, estão comumente relacionadas com a área médico-legal; alguns xenobióticos ocupam lugar de destaque como os principais responsáveis pela ocorrência de intoxicações sendo de amplo conhecimento que os praguicidas, como o aldicarbe, são responsáveis por intoxicações exógenas, intencionais ou não intencionais, em virtude de sua ampla toxicidade e dificuldade para realização de análises toxicológicas em amostras biológicas. Para tanto, foi empregada a metodologia enzimática desafiando a enzima acetilcolinesterase com o aldicarbe e seus metabolitos por meio do ensaio de Elman's objetivou-se no presente estudo a avaliação do poder de inibição da acetilcolinesterase pelo aldicarbe, bem como por seus metabolitos de forma comparativa. Como resultados, pudemos observar o ensaio de Elman's foi efetivo em verificar o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase do aldicarbe e seus dois metabolitos ativos, o aldicarbe-sulfoxido

e aldicarbe-sulfona mostrando que o aldicarbe tem um elevado poder de inibição da enzima, seguido pelo aldicarbe-sulfoxido e posteriormente pelo aldicarbe-sulfona. Portanto, pode-se concluir que existe potencial para o desenvolvimento de um método de triagem com a finalidade de sugerir a presença de agentes anticolinesterásicos, contribuindo para um diagnóstico rápido, bem como em casos de morte suspeita de intoxicação, auxiliando no diagnóstico da causa da morte.

**Palavras-chave:** Aldicarbe. Metabolitos. Teste enzimático.

## **Evaluation of the inhibition of acetylcholinesterase promoted by the pesticide aldicarb and its metabolites using enzymatic method of rapid, safe and low cost screening**

### ***Abstract***

Lethal intoxications are commonly related to the medical-legal area; Some xenobiotics occupy a prominent position as the main responsible for the occurrence of intoxications and it is widely known that pesticides, such as aldicarb, are responsible for exogenous poisonings, intentional or unintentional, due to their wide toxicity and difficulty in carrying out toxicological analyzes In biological samples. The enzymatic methodology challenging the enzyme acetylcholinesterase with aldicarb and its metabolites using the Elman's assay was used in the present study to assess the inhibition power of acetylcholinesterase by aldicarb as well as its metabolites in a comparative way. As results, we could observe the Elman's assay was effective in verifying the inhibition potential of the aldicarb acetylcholinesterase enzyme and its two active metabolites, aldicarb-sulfoxide and aldicarb-sulfone showing that aldicarb has a high inhibition power of the enzyme, followed By aldicarb-sulfoxide and then by aldicarb-sulfone. Therefore, it can be concluded that there is potential for the development of a screening method with the purpose of suggesting the presence of anticholinesterase agents, contributing to a rapid diagnosis, as well as cases of suspected intoxication death, helping to diagnose the cause of death.

**Keywords:** Aldicarb. Metabolites. Enzymatic assay.

Recebido em 03/02/2017 Aceito em 15/03/2017

## Introdução

Os praguicidas organofosforados e carbamatos são agentes anticolinesterásicos largamente empregados na agricultura como inseticidas para o controle das pragas agrícolas, em medicina veterinária para o controle de endo- e ectoparasitas e também são utilizados em saúde pública para eliminação e controle de vetores transmissores de enfermidades endêmicas.

O aldicarbe, em particular, é um praguicida carbamato de uso agrícola comercializado no Brasil até outubro de 2012, quando, então, teve o seu registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cancelado (Ato 54 de 9 de outubro de 2012). Isso ocorreu devido ao seu uso irregular como raticida doméstico (“chumbinho”), causando intoxicações graves e letais, tanto em seres humanos como em animais (MOLINA, 2012).

Embora tenha sido retirado do comércio, a ocorrência de óbitos de animais causados pelo aldicarbe ainda é observada no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), o que pode configurar como crime contra os animais, devido às intoxicações tanto acidentais quanto propositalmente relacionados com esse praguicida. Para o toxicologista envolvido nestas situações, os testes de triagem são importantes para nortear as análises toxicológicas e contribuir para a confirmação dos achados necroscópicos, sendo amplamente utilizados nos laboratórios de toxicologia. Ainda, os testes de triagem são de grande importância clínica no pronto atendimento emergencial que requer um resultado rápido e confiável, auxiliando o clínico no tratamento correto e urgente, além de contribuir para o bom prognóstico do quadro de intoxicação. A avaliação da atividade das colinesterases tem se mostrado útil como teste de triagem rápida para indicar exposição aos agentes anticolinesterásicos, como os praguicidas organofosforados e carbamatos (LESSENGER; REESE, 1999).

Os agentes anticolinesterásicos, por inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), promovem o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, causando a potencialização

da neurotransmissão colinérgica (BALLARD et al., 2005). A inibição enzimática se dá através da ligação do agente anticolinesterásicos com a porção esteárica da enzima por meio da esterificação da hidroxila da serina e/ou interação com o domínio ativo da porção alfa aniônica (WEINER et al., 2009).

Um dos métodos mais utilizados para a determinação da atividade da AChE é o método de *Ellman* (ELLMAN et al., 1961), por ser um método rápido, simples, preciso e com medição direta da atividade enzimática, seja em sangue ou tecidos (ASKAR; KUDI; MOODY, 2011). Este método é baseado na reação entre a tiocolina, um dos produtos da hidrólise enzimática do substrato sintético iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de butiriltiocolina (BTCl), com o grupo sulfidril do cromógeno ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB ou reagente de *Ellman*). Ocorre, então, a formação do 5-tioácido-2-nitrobenzoico que promove a formação de um composto de coloração amarela, o qual pode ser mensurado através da quantificação da absorvância a 410 nm (ELLMAN et al., 1961; SINKO et al., 2007).

Há disponível no comércio *kits* para avaliação direta da atividade da AChE endógena (Colinesterase K049 - *Boclin*; Sistema de teste colinesterase – CMW Saúde&Tecnologia; H *QuantiChrom*<sup>TM</sup> acetilcolinesterase-kit colorimétrico – Gênese). Por outro lado, há também *kits* que utilizam a AChE para auxiliar a quantificação de outras substâncias, como, por exemplo, a testosterona; é o caso do *kit* Cayman *Chemicals*. Esse *kit*, em particular, emprega a AChE de enguia elétrica que possui a característica de ser uma enzima de ultrarrápida ação (ELLMAN et al., 1961).

A AChE pode ser empregada também com bioindicador da presença de anticolinesterásicos tanto em amostras simples (água), como complexas (matrizes biológicas). A utilização de um biossensor amperométrico, que tem como princípio a imobilização da AChE em um eletrodo do tipo *screen-printing*, mostrou-se bastante eficiente na investigação de teores de praguicidas carbamatos em águas (MARQUES, MARQUES & NUNES, 2006). Esse mesmo princípio foi empregado para avaliação da presença de praguicidas anticolinesterásicos em frutas e legumes (PICÓ, 2014).

Considerando que a AChE de enguia elétrica possui ultrarrápida ação e que pode ser empregada como bioindicador da presença de anticolinesterásicos em diferentes amostras, o objetivo do presente trabalho é propor um método de triagem

rápido, seguro e de baixo custo, utilizando o *kit* Cayman *Chemicals* como fonte de AChE, para indicar a presença do aldicarbe e seus metabólitos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi empregado o *kit* Cayman. *Chemical's ACE™ EIA* (Cayman Chemicals®). O reagente *tracer* – testosterona marcada com acetilcolinesterase de enguia elétrica – foi aplicado como fonte de AChE, enquanto o cromógeno revelador, DTNB, foi aplicado tanto como substrato enzimático e como revelador. O reagente de *Ellman* bem como a testosterona marcada foram reconstituídos seguindo as recomendações do *kit*.

A leitura foi feita em um espectrofotômetro da marca *Thermo Scientific* do modelo *Multiskan EX*, a 410 nm.

### Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi feito em triplicada, empregando uma microplaca de 96 poços, sendo pipetados em cada cavidade 200  $\mu$ L de reagente de *Ellman* nos poços A1, B1, C1 e D1 (Fig.3.1). Nos poços das colunas subsequentes (2 - 12) foram pipetados 125  $\mu$ L do reagente de *Ellman*. Em seguida, nos poços A1, B1, C1 e D1 foram pipetados 50  $\mu$ L dos reagentes testes, ou seja, aldicarbe, aldicarbe-sulfona, aldicarbe-sulfóxido e acetilcolina, respectivamente. A seguir, foi feita uma diluição seriada, com o ponto máximo da curva de concentração de 200  $\mu$ g/mL de cada reagente teste e proporções de 1:2 de um poço para outro até o décimo segundo poço, conforme mostra a figura 3.1.

O *tracer* foi diluído no reagente de *Ellman* de maneira que a cada 30  $\mu$ L pipetados contivessem 5  $\mu$ L de *tracer*. Todos os poços receberam *tracer* exceto os indicados por C- (controle negativo). Após isso, ocorreu a incubação em um agitador (DAIGGER – modelo *multi-microplate genie*) com velocidade de 500 rpm, a temperatura ambiente e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro com filtro de 410 nm, em 60 e 90 minutos.

**Figura 3.1** – Esquema de diluições seriadas utilizadas numa microplaca de 96 poços para a realização do ensaio enzimático de inibição da atividade da colinesterase. O ponto máximo da curva de concentração é de 200 µg/mL e proporções de 1:2 de um poço para outro até o décimo segundo poço.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
B	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
C	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
D	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
F				C+	C+							
G		C-	C-									
H												
I												

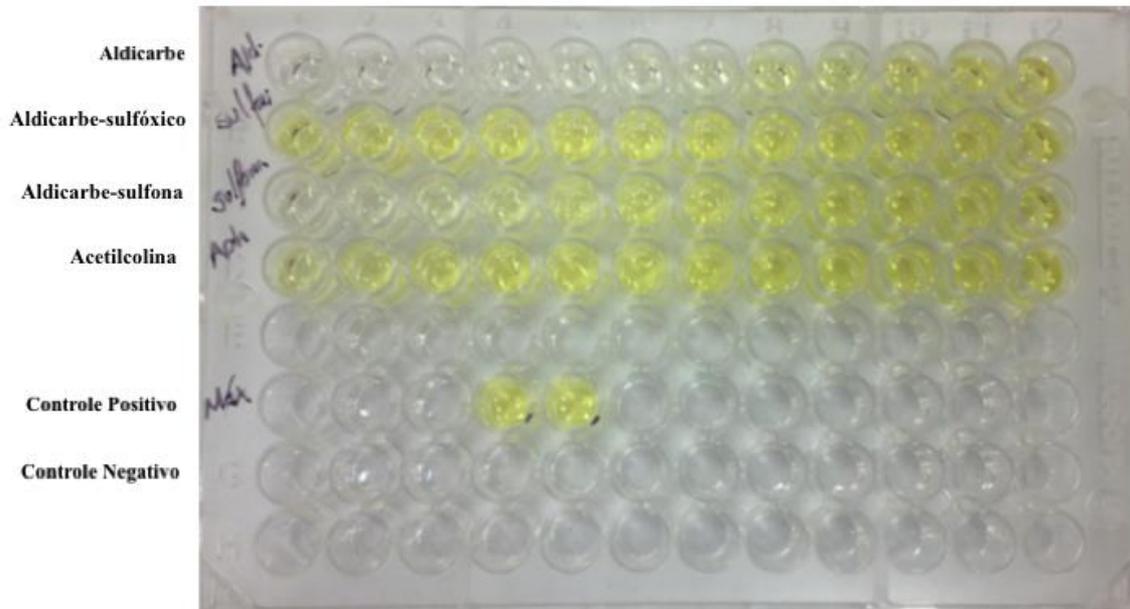
C+ = controle positivo; C- = controle negativo

Fonte: Fukushima (2015)

## RESULTADOS

A figura 3.2 mostra uma microplaca com 96 poços após 90 minutos de incubação, utilizando o reagente de *Ellman* como cromorreagente. Note que a medida que reduz a concentração do aldicarbe e de seus metabólitos, aumenta a intensidade da cor amarela, indicando menor inibição enzimática.

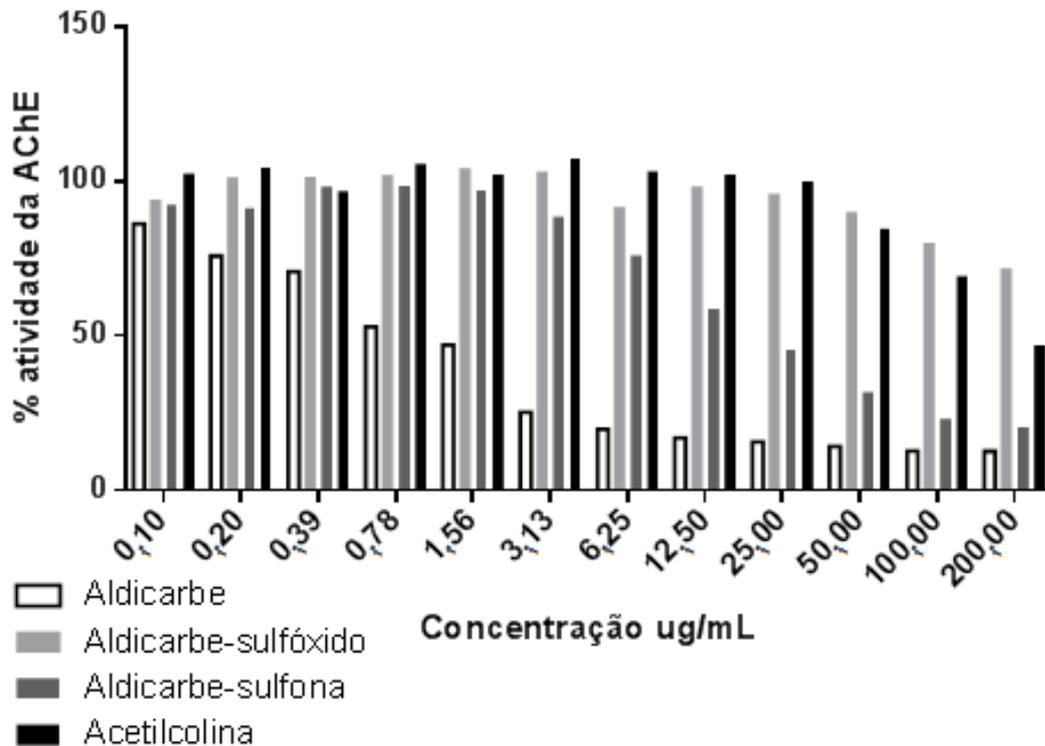
**Figura 3.2** – Fotografia da microplaca após 90 minutos de incubação, utilizando o reagente de *Ellman* para avaliar a atividade da acetilcolinesterase submetida à exposição ao aldicarbe e aos seus metabólitos.



Fonte: Fukushima (2015)

A figura 3.3 representa a atividade da enzima AChE medida em absorbância (em porcentagem) em função da concentração do aldicarbe e de seus metabólitos. Note que o aldicarbe-sulfóxido pouco interferiu na atividade da AChE, enquanto o aldicarbe-sulfona apresenta redução da atividade enzimática mais evidente a partir da concentração de 12,5  $\mu\text{L}$ .

**Figura 3.3** – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em absorbância expressa em porcentagem, em função da variação de concentração do Aldicarbe e de seus metabólitos.



Fonte: Fukushima (2015)

## DISCUSSÃO

Muito embora existam testes utilizando o reagente de Ellman robotizados e miniaturizados (JÄRVINEN et. al, 2010) para a avaliação da atividade das colinesterases, não foi encontrado em literatura nenhum que utilizasse a AChE de enguia elétrica. Nesse sentido, o emprego desta enzima teria a vantagem de execução simples e oferecer resultado rápido da suspeita de intoxicação, com baixo custo e aplicável em laboratórios e clínicas de pequeno porte, como método de triagem.

No presente estudo a medida da atividade da AChE foi avaliada na presença do Aldicarbe, bem como seus dois principais metabólitos ativos, o Aldicarbe-sulfóxido e o Aldicarbe-sulfona. Esse método se mostrou eficiente para avaliar a inibição da atividade da AChE causada, em particular, pelo Aldicarbe e pelo Aldicarbe-sulfona.

Embora os resultados encontrados, referente a inibição do aldicarbe-sulfóxido não mostrem uma potente inibição enzimática causada por este metabólito no período de até 90 minutos, sabe-se que sua toxicidade se deve a inibição mais tardia da AChE (BURGESS et al., 1994), prolongando assim esse efeito sobre o organismo do animal exposto ao aldicarbe.

Em relação a custos, essa técnica enzimática, quando comparada a outros métodos de triagem como a cromatografia em camada delgada (CCD), a primeira apresenta menor custo e menor impacto ao meio ambiente, uma vez que não são utilizados solventes orgânicos, os quais necessitam de descarte apropriados para evitar danos ambientais.

Vale destacar que os testes enzimáticos são valorosas ferramentas de triagem em análises forenses, porém é necessária a padronização de todas as figuras de mérito sugeridas pelos instrumentos legais, uma vez que pequenas alterações nas concentrações da enzima, pode causar respostas diferente a um mesmo agente inibidor. Essa padronização pode ser realizada, utilizando enzimas de diferentes fontes em várias condições com características diversas.

O presente trabalho é o primeiro passo para o estudo de amostras fortificadas em soro ou plasma, bem como outras matrizes simples ou complexas, validando este método de triagem para indicar a presença de agentes anticolinesterásicos, o que auxiliaria no monitoramento da presença destes agentes tóxicos, contribuindo para um diagnóstico rápido, norteador o clínico quanto ao tratamento do animal intoxicado e, no caso de óbito, auxiliando na detecção da *causa mortis*.

## **CONCLUSÕES**

As análises enzimáticas são poderosas ferramentas no diagnóstico de intoxicações, bem como importantes instrumentos na área forense, em virtude de suas características, como o baixo custo, rápida execução da análise e gerar mais um resultado em direção ao resultado da análise.

O método utilizando foi eficiente na avaliação da inibição da atividade da AChE causada, em particular, pelo aldicarbe e pelo aldicarbe-sulfona, sendo possível concluir que o aldicarbe-sulfóxido pouco interferiu na atividade da AChE, enquanto o aldicarbe-sulfona apresenta redução da atividade enzimática mais evidente a partir da

concentração de 12,5 µL mostrando o potencial de toxicidade tardio quando comparada ao aldicarbe.

Existe potencial para o desenvolvimento de um método de triagem com a finalidade de sugerir a presença de agentes anticolinesterásicos, contribuindo para um diagnóstico rápido, bem como em casos de morte suspeita de intoxicação, auxiliando no diagnóstico da causa da morte.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **REFERÊNCIAS**

MOLINA, D. Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro, ANVISA, 2012 Acesso em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/agrotoxico+utilizado+como+chumbinho+e+retirado+do+mercado+brasileiro> Acesso em: 12 maio 2015.

LESSENGER, J.E., REESE, B.E., Rational use of cholinesterase activity testing in pesticide poisoning. J. Am. Board Farm. Pract 12, 307-314, 1999.

BALLARD C. G., GREIG N. H., GUILLOZET-BONGAARTS A. L., ENZ A., DARVESH S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. Curr. Alzheimer Res. 2, 307–318, 2005

WEINER D. M., LEVEY A. I., BRANN M. R., Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America. 87 (18), 7050–7054, 2009. doi: 10.1073/pnas.87.18.7050

ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., FEATHERSTONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95. 1961

MARQUES, C. V. V. C. O.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Biossensores acetilcolinesterase mutantes. *Acta Toxicol. Arg.*, v. 13, p. 1-7, 2005.

PICÓ M. A, BLASCO C, Y., Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trend Environ Anal Chem* 2, 11-24, 2014.

JÄRVINEN P. P., A. FALLARERO, S. GUPTA, G. C. MOHAN, A. I. HATAKKA, AND P. M. VUORELA, "Miniaturization and validation of the Ellman's reaction based acetylcholinesterase inhibitory assay into 384-well plate format and screening of a chemical library," *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, vol. 13, no. 3, pp. 278–284, 2010.

BURGESS LW, SUMMERELL BA, BULLOCK S, GOTT KP, BACKHOUSE D. *Laboratory manual for Fusarium research*. Sydney: University of Sydney;. 116–117. 1994