



## AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DA ENZIMA AChE EM AGRICULTORES EXPOSTOS A PESTICIDAS AGRÍCOLAS

REIS, Gabriel<sup>1</sup>; MURUSSI, Camila<sup>1</sup>, SANTI, Adriana<sup>2</sup>; CLASEN, Bárbara<sup>2</sup>; LORO, Vânia<sup>2</sup>  
Lúcia; NAGEL, Andréia Saggin<sup>1</sup>; BORTOLOTTI, Josiane<sup>1</sup>; HORN, Roberta Cattaneo<sup>3</sup>

**Palavras-Chave:** agricultores, estresse oxidativo, pesticidas, AChE.

### Introdução

A exposição a pesticidas agrícolas leva à ocorrência de estresse oxidativo e acúmulo de radicais livres no organismo (ASTIZ et.al. 2011; MACIAG 2011). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas e a ação do sistema antioxidante, quando ocorre aumento dessas substâncias citotóxicas ocorrem danos permanentes na estrutura de macromoléculas como, por exemplo, DNA, RNA, proteínas e lipídios, acarretando perda de suas funções biológicas e desenvolvimento de várias doenças (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et.al., 2004; MACIAG, 2011). Dentro do sistema antioxidante estão as enzimas catalase (CAT), glutatona-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) entre outras (VASCONCELOS et.al., 2007).

O reconhecimento dessa relação levou ao desenvolvimento de biomarcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos. No caso do estresse oxidativo, os marcadores de balanço redox, não invasivos refletiriam o dano causado pelos radicais livres sobre o sistema biológico e a eficiência da defesa antioxidante de contrapartida (VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, a carbonilação de proteína e peroxidação lipídica refletem os efeitos dos pesticidas sobre organismos não-alvos e podem ser marcadores de exposição a estes xenobióticos (CATTANEO et al., 2010). Portanto, tendo em vista a possível ocorrência de estresse oxidativo e alterações no sistema antioxidante de agricultores expostos cronicamente a pesticidas agrícolas, torna-se necessária a avaliação

<sup>1</sup> Autor- Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Autor- Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Orientador - Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, RS, Brasil.



perfil oxidativo e da enzima acetilcolinesterase (AChE), principal indicador de intoxicação a pesticidas agrícolas.

### **Material e Métodos**

Primeiramente o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Cruz Alta sob protocolo nº 0071.0.417.000-11. Foram coletadas amostras de sangue de 15 agricultores da localidade Itaíba, município de Ibirubá – RS. Para o grupo controle foram coletadas de 15 indivíduos não são expostos ocupacionalmente a agrotóxicos. Para a realização da pesquisa todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário. As amostras de sangue foram coletadas com vacuntainer heparinizados através de punção venosa. Foi separada uma alíquota de sangue total para a determinação da CAT e então, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm e o soro foi separado para a realização dos demais parâmetros toxicológicos. A determinação da atividade da enzima AChE foi realizada de forma cinética segundo método de Ellman (1961). A peroxidação lipídica foi estimada pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em soro, segundo Jentzsch et al. (1996). A determinação da atividade da catalase foi realizada conforme o método descrito por Aebi (1984). Para a realização da dosagem de proteína carbonil foi utilizada a técnica de Levine et al. (1990), que se baseia na reação das proteínas com dinitrofenilidrazina (DNPH). Após a realização das análises, os resultados foram analisados e obteve-se a média e desvio padrão (SEM) de cada grupo. A comparação entre o grupo exposto e o controle foi realizada através do Teste *t*-student para dados paramétricos de grupos independentes, considerando diferenças estatisticamente diferentes com  $p \leq 0,05$ .

### **Resultados e Discussões**

Esse estudo mostra que os indivíduos expostos apresentaram uma redução significativa da atividade da enzima AChE. Em um estudo feito por Ogut et al. (2011) a atividade desta enzima não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo exposto. Já Almeida e Martins (2008), encontraram uma atividade enzimática inibida em 4% dos pacientes analisados. O resultado encontrado também está de acordo com Linares et al., (2005) que evidenciou níveis inferiores aos de referência verificados no grupo controle. A atividade da enzima diminuída em indivíduos expostos também foi demonstrada por Astiz et al. (2011) e Simoniello et al. (2010). Segundo Astiz et al. (2001), a dosagem de AChE é o principal marcador de exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos. Apesar das colinesterases estarem alteradas em patologias como alcoolismo e doenças hepáticas, é sabido



que a exposição frequente dos agricultores está relacionada com os níveis de inibição das enzimas (Linares et al., 2005), o que foi demonstrado no estudo pelos resultados obtidos.

A carbonilação das proteínas, o qual demonstra danos oxidativos em proteínas em condições de estresse oxidativo possui uma vantagem em relação sobre os produtos da lipoperoxidação, pois as proteínas oxidadas são mais estáveis (Dalle-Donne et al., 2003). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram níveis mais elevados de proteína carbonil no grupo exposto em relação ao controle (Figura 1), demonstrando assim a possível ocorrência de danos oxidativos nas proteínas. Este resultado está de acordo com o encontrado por Arnal et al. (2011) onde os níveis de proteína carbonil também se mostraram elevados no grupo exposto, porém os resultados desse parâmetro também se mostraram elevados em indivíduos fumantes em comparação com não fumantes, constituindo o tabaco como uma possível interferência para a análise dos níveis de proteína carbonil.

Dentre as moléculas que podem sofrer o ataque dos radicais livres os lipídeos são provavelmente os mais suscetíveis (Sánchez-Rodríguez et al., 2004). Segundo Lima e Abdalla (2001), uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do malondialdeído (MDA) que é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados principalmente o ácido aracdônico. O resultado encontrado neste estudo (Figura 2) é diferente do encontrado por Ranjbar et al. (2002) que demonstrou um aumento dos níveis de TBARS em formuladores de pesticidas comparando-se com o grupo controle. O aumento de TBARS no grupo exposto também foi demonstrado por Arnal et al. (2011), que também verificou que os níveis de TBARS podem ser influenciados pelo tabaco, fato que pode ter influenciado os resultados encontrados neste estudo, visto que no grupo exposto apenas dois indivíduos eram fumantes. Outro fator que pode ter influenciado é o fato de o TBARS não ser específico para detecção de produtos de lipoperoxidação, uma vez que outras substâncias presentes na amostra podem reagir com o ácido tiobarbitúrico (ANTUNES et al., 2008). Além disso, segundo Loureiro et al. (2002) as quantidades de TBARS em indivíduos considerados saudáveis variam entre 0 e 47,2 nmol/mL de sangue.

Outra forma avaliação da ocorrência do estresse oxidativo e a avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante como, por exemplo, da catalase (Sánchez-Rodríguez et al., 2004). Neste estudo, a atividade da catalase mostrou estar diminuída (Figura 3) o que também foi demonstrado por Simoniello et al., (2010), que estudou as alterações bioquímicas em trabalhadores rurais expostos a pesticidas.



## Conclusão

Analisando os resultados encontrados verificou-se que o uso intensivo e sem as devidas precauções de agrotóxicos por agricultores levou à intoxicação verificada pela inibição da enzima AChE a qual pode causar uma série de manifestações indesejáveis. Além disso, foi evidenciada a ocorrência de estresse oxidativo, pela diminuição da atividade da enzima CAT e pelo aumento das proteínas carboniladas. Assim, estes resultados mostram a importância de um maior cuidado na manipulação destes xenobióticos por parte dos agricultores, como também um maior monitoramento biológico destes trabalhadores expostos a pesticidas para prevenir possíveis intoxicações.

## Referências

AEBI, H. **Catalase in vitro**. *Methods Enzymology*, v.105, p.121-126, 1984.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**. *Biochemical Pharmacology*, v.7, p. 88-95, 1961.

JENTZSCH, A.M., **Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids**. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, p. 251–256, 1996.

LEVINE, R.L. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins**. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464 – 478, 1990.

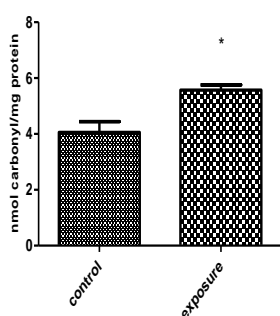


FIGURA 1: Níveis de proteína carbonil medidas em soro de agricultores expostos a agrotóxicos e do grupo controle. Os valores são expressos pela média  $\pm$  SEM (n=15). \*Diferenças significativas do grupo exposto comparadas ao grupo controle ( $P \leq 0,05$ ).

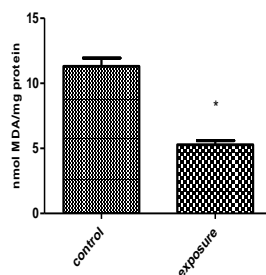


FIGURA 2: Lipoperoxidação medida pelos níveis de TBARS em soro de agricultores expostos a agrotóxicos e do grupo controle. Os valores são expressos pela média  $\pm$  SEM (n=15). \*Diferenças significativas do grupo exposto comparadas ao grupo controle ( $P \leq 0,05$ ).

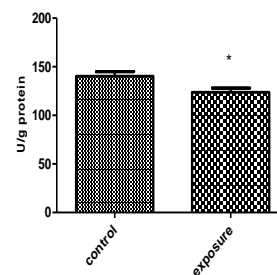


FIGURA 3: Atividade da enzima antioxidante CAT em soro de agricultores expostos a agrotóxicos e do grupo controle. Os valores são expressos pela média  $\pm$  SEM (n=15). \*Diferenças significativas do grupo exposto comparadas ao grupo controle ( $P \leq 0,05$ ).