

MARIANE GONÇALVES SANTOS

**ANÁLISE DE DIETIL TIOFOSFATO E DIETIL DITIOFOSFATO
URINÁRIOS EMPREGANDO MISPE GC-MS E ESTUDO DAS
CORRELAÇÕES DESSES METABÓLITOS COM
COLINESTERASES SANGUÍNEAS E FREQUÊNCIA DE
MICRONÚCLEOS EM RATOS EXPOSTOS A DISSULFOTON**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Alfenas/MG
2012

MARIANE GONÇALVES SANTOS

**ANÁLISE DE DIETIL TIOFOSFATO E DIETIL DITIOFOSFATO
URINÁRIOS EMPREGANDO MISPE E GC-MS E ESTUDO
DAS CORRELAÇÕES DESSES METABÓLITOS COM
COLINESTERASES SANGUÍNEAS E FREQUÊNCIA DE
MICRONÚCLEOS EM RATOS EXPOSTOS A DISSULFOTON**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Aprovada em: ___/___/_____

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de
Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges
Instituição: Universidade Federal de São
João Del-Rey – UFSJ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Vanessa B. Boralli Marques
Instituição: Universidade Federal de
Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: _____

Dedico este trabalho com gratidão e amor:

*Aos meus pais, Marilene e Martinho,
ao meu irmão, Brener e a
minha filha, Júlia.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus e a Nossa Senhora por todas as bênçãos.
- À minha mãe, por sua presença infinita e incondicional durante todas as etapas de minha vida.
- A meu pai, pelo apoio e estímulo.
- À minha filha Júlia, orgulho de minha vida, pela amizade, amor, admiração, pelos momentos de descontração e por sempre me presentear com um sorriso nos momentos mais difíceis.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por me receber como orientada, tornando possível a realização deste sonho e permitindo meu crescimento pessoal e científico.
- Aos colegas e amigos do laboratório, Patrícia, Antônio Felipe, Lara, Isabela e Ricardo pelo companheirismo e colaborações.
- Aos amigos Olímpia, Patrícia, André e Talita, por todos os nossos momentos juntos e pelas demonstrações de sincera amizade.
- Aos colegas e amigos: professores (Profa. Dra. Vanessa B. Boralli Marques, Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara) e funcionários (Márcia e Andressa), bolsistas e monitores do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos.
- Aos professores da UNIFAL-MG, Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva e Profa. Dra. Luciana Azevedo, pelas contribuições a este trabalho.
- À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade em realizar este mestrado.

*"Ouse, arrisque, não desista jamais
e saiba valorizar quem te ama, esses
sim merecem seu respeito.
Quanto ao resto, bom, ninguém nunca
precisou de restos para ser feliz."*

(Clarice Lispector)

RESUMO

Um método analítico constituído por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi desenvolvido para análise de metabólitos dialquil fosfatos (dietil tiosfato - DETP e dietil ditiosfato - DEDTP) em amostras de urina. Um polímero de impressão molecular (MIP) foi sintetizado utilizando-se 4-vinilpiridina como monômero funcional e etileno glicol dimetacrilato como reagente de ligação cruzada. A etapa de condicionamento foi realizada da seguinte forma: 3 mL de acetonitrila, 3 mL de tampão fosfato dibásico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 11,0 e 2 mL de água foram percolados por um cartucho de polipropileno contendo o MIP. A etapa de extração foi executada utilizando 1,0 mL de amostra de urina com pH previamente ajustado para 3,0. Finalmente, os analitos foram eluídos com 3 mL de acetonitrila e derivatizados com uma solução de 2,3,4,5,6-brometo de pentafluorobenzil a 3% em acetonitrila, a temperatura ambiente durante 1h. A amostra foi analisada por GC-MS. Curvas de calibração analítica para DETP e DEDTP foram construídas utilizando-se uma mistura de urina de diferentes indivíduos voluntários e em seis níveis de concentração. O método foi linear na faixa de $10\text{-}500 \mu\text{g L}^{-1}$, com $r = 0,99$ e limite de detecção de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, para ambos os analitos. A precisão intra-dias e inter-dias foram avaliadas com base na porcentagem de desvio padrão relativo (%RSD) e todos os resultados foram inferiores a 15% para ambos os analitos. O método foi preciso, exato, com boa recuperação e robustez. Posteriormente o método foi utilizado para determinar as concentrações de DETP e DEDTP em amostras de urina de ratos expostos a dissulfoton. Além da concentração de dialquil fosfatos, foram determinadas a atividade de colinesterase sanguínea e a incidência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos destes mesmos animais, a fim de se estabelecer uma relação entre a dose de exposição ao dissulfoton e os parâmetros avaliados. Observou-se que a atividade de colinesterase plasmática não reflete muito bem a correlação entre a dose de exposição e efeito, ao contrário da colinesterase eritrocitária. A concentração de dialquil fosfatos refletiu uma boa correlação com a dose de exposição. Através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, foi possível observar que, a semelhança de outros praguicidas organofosforados (OF), o dissulfoton é capaz de causar mutagenicidade.

Palavras chave: impressão molecular, dialquil fosfatos, extração em fase sólida, cromatografia de gases e espectrometria de massas, organofosforados, colinesterases, dissulfoton, testes para micronúcleos.

ABSTRACT

An analytical method constituted by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was developed for analyses of benzene metabolites (diethyl thiophosphate - DETP and diethyl dithiophosphate - DEDTP) in human urine samples. A molecularly imprinted polymer (MIP) for DETP was synthesized using 4-vinylpyridine as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as cross linker. The conditioning step of the MISPE was processed flowing through the MIP cartridge 3 mL of acetonitrile, 3 mL of dibasic phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹ pH 11 and 2 mL of water. The extraction step was executed using 1.0 mL of urine sample with pH previously adjusted to 3.0. Finally, the analytes were eluted with 3 mL of acetonitrile and derivatized with 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide 3% at room temperature during 1h. The sample was analyzed by GC-MS. Analytical calibration curves for DETP and DEDTP were constructed using a pool of urine sample and for six levels of concentration. The method was linear from 10 to 500 µg L⁻¹, with $r = 0.99$ and limit of detection of 3.0 µg L⁻¹, for both analytes. The within-day and between-day precisions were evaluated (as percentage of RSD) and all results were < 15% for both analytes. The method was accurate, with good recovery and robustness. Later this method was used to determine the concentrations of DETP and DEDTP in urine samples of rats exposed to disulfoton. Besides the concentration of dialkyl phosphates, it was determined blood cholinesterase activity and the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in the same animals, in order to establish a relationship between the dose of exposure and the evaluated parameters. It was observed that the plasma cholinesterase activity did not reflect very well the correlation between exposure dose and effect, unlike the erythrocyte cholinesterases. The concentration of dialkyl phosphates gave a good correlation with exposure dose. By the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes was possible to observe that, similarly to other organophosphates pesticides (OPs), disulfoton can causes mutagenicity.

Keywords: MIP, dialkyl phosphates metabolites, SPE, gas chromatography mass spectrometry, organophosphates, cholinesterase, disulfoton, micronucleated polychromatic erythrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química geral dos organofosforados.....	13
Figura 2.	Estrutura química do dissulfoton.....	14
Figura 3.	Metabólitos dialquil fosfatos e suas constantes de ionização.	19
Figura 4.	Esquema genérico da síntese de MIP.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

DAPs	Dialquil fosfatos
DEDTP	Dietil ditiofosfato
DEP	Dietil fosfato
DETP	Dietil tiofosfato
DMDTP	Dimetil ditiofosfato
DMP	Dimetil fosfato
DMTP	Dimetil tiofosfato
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
MIP	Polímeros de impressão Molecular
MNPCEs	Micronúcleos em eritrócitos policromáticos
OF	Organofosforados
PCEs	Eritrócitos Policromáticos
POF	Praguicidas Organofosforados
SPE	Extração em fase sólida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	<i>Organofosforados.....</i>	12
2.2	<i>Indicadores de exposição ocupacional a organofosforados.....</i>	17
2.3	<i>Avaliação da toxicidade genética: teste de micronúcleo.....</i>	19
2.4	<i>Métodos de análise de metabólitos em urina.....</i>	21
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	<i>Gerais.....</i>	25
3.2	<i>Específicos.....</i>	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	<i>Artigo I.....</i>	28
4.2	<i>Artigo II.....</i>	48
5	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Os praguicidas ocupam uma posição especial entre vários agentes químicos aos quais o homem pode estar exposto. Estes são deliberadamente difundidos no ambiente. O ideal é que as ações prejudiciais dos praguicidas sejam altamente seletivas para os organismos alvos e indesejáveis e inócuas para os demais seres vivos. Entretanto a maioria das substâncias químicas utilizadas como praguicidas não é completamente seletiva. A falta de seletividade da ação de um praguicida representa um risco para o homem e outras formas de vida desejáveis presentes no ambiente. Assim, atividades que impliquem no uso de praguicidas devem ser vigiadas, controladas e selecionadas (MARONI et al., 2000).

Neste contexto destaca-se o uso dos praguicidas organofosforados (POF), que são produtos amplamente utilizados no combate a pragas na lavoura, sendo responsáveis por inúmeras intoxicações humanas, inclusive fatais, decorrentes de sua toxicidade aguda (MÍDIO; SILVA, 1995; OLIVEIRA; et al., 2001).

Os POF agem como inibidores das colinesterases sanguíneas, sendo que a depleção da atividade enzimática é usada como indicador na monitorização biológica de trabalhadores expostos a estes compostos (KALOYANOVA; EL BATAWI, 1991). Entretanto, a atividade das colinesterases pode sofrer interferências inerentes a exposição ou não ao POF, devido a variações enzimáticas que podem ocorrer de um indivíduo para outro. Assim, uma outra alternativa para avaliar a exposição de indivíduos a este toxicante seria a monitorização de seus produtos de metabolização na urina (os dialquil fosfatos), principal via de excreção destes metabólitos (YUCRA; et al., 2006).

Sabe-se que os POF são capazes de induzir mutagênese. Neste contexto, o teste de micronúcleos tem sido amplamente utilizado para detectar alterações cromossômicas *in vivo* e *in vitro*. Micronúcleos podem se originar a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos, bem como de todo cromossomo que esteja no processo de anáfase, durante a divisão de células nucleadas precursoras. Eles persistem no citoplasma por algum tempo e assim podem ser marcados na intérfase em eritrócitos policromáticos (PCEs). Um aumento na

frequência de micronúcleos em PCEs (MNPCEs) é, portanto, uma indicação de aneuploidia ou indução de clastogenicidade.

A quantificação de toxicantes/metabólitos em amostras biológicas requer estratégias altamente seletivas devido a complexidade dessas amostras. Estudos sobre o emprego de materiais seletivos na purificação de amostras biológicas têm se destacado na literatura, dentre os quais pode-se citar os polímeros de impressão molecular (MIP). Os MIP são polímeros sintéticos que se moldam tridimensionalmente à molécula de interesse, deixando cavidades impressas de acordo com a forma estrutural desta molécula (ANDERSSON, 2000). A associação de uma extração seletiva de analitos da matriz biológica com uma técnica sofisticada de análise como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), pode ser uma boa alternativa para a quantificação de analitos presentes em baixas concentrações em amostras complexas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Organofosforados

A exposição a produtos químicos com alto risco para a população é hoje uma preocupação geral. As exposições humanas podem ocorrer de forma involuntária através do contato com resíduos ambientais, ou de forma intencional como no suicídio, além da exposição ocupacional. Geralmente, resultam do contato de uma matriz física e quimicamente complexa, na qual o praguicida (ingrediente ativo) está incluído em quantidades variáveis (World and Health Organizaton (WHO), 1988). Diante disso, os institutos de saúde pública estão frequentemente avaliando os riscos de desenvolvimento de problemas de saúde, individuais e comunitários, oriundos da potencial exposição da população a contaminantes químicos ambientais (HERNÁNDEZ; SANCHO; POZO, 2004).

Nesse contexto, os estudos com praguicidas têm se destacado em virtude dos altos potenciais tóxicos, bem como pelas condições favoráveis de exposição a tais moléculas. A maioria dos estudos sobre os efeitos de praguicidas para a saúde tem se concentrado em exposições ocupacionais de formuladores e agricultores. Basicamente, os praguicidas são usados na agricultura com três objetivos: (i) obtenção de grandes produções, (ii) boa qualidade dos produtos e (iii) redução de trabalho. Sem dúvida, esses objetivos foram alcançados nessas últimas décadas. Grande parte dos praguicidas aplicados são dispersos dos locais de aplicação através de escoamento superficial, volatilização, dentre outros, resultando não somente em contaminação dos aplicadores, como também daqueles que acompanham o procedimento nos arredores do local de aplicação, principalmente crianças (AZAROFF, 1999).

Os POF representam uma das mais importantes classes de praguicidas. Esses são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico e tiofosfóricos, sendo representados, de forma geral, pela estrutura mostrada na Figura 1. Normalmente são líquidos de alta pressão de vapor e lipossolúveis, dissolvem-se nos solventes orgânicos nos quais são formulados. Também podem se apresentar na forma de

pós, granulados e concentrados emulsionáveis, sendo relativamente estáveis em pH neutro. Seu peso molecular varia de 183 a 466 (WHO, 1986; MÍDIO; SILVA, 1995).

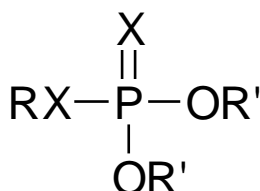


Figura 1. Estrutura química geral dos organofosforados. X = O ou S e R' = CH₃ ou CH₂CH₃.
Fonte: MÍDIO; SILVA, 1995.

Os POF são amplamente utilizados como praguicidas na agricultura, em ambientes residenciais para o controle de pragas e no controle de vetores de doenças. Dessa forma, tais compostos apresentam um potencial risco de exposição para a população (DE ALWIS; NEEDHAM; BARR, 2009). Por outro lado, esses compostos são rapidamente hidrolisados e oxidados no ambiente e em pH alcalino, e não se acumulam no organismo, sendo eliminados pela urina após biotransformação (WHO, 1986; VALE, 1998).

Os fosfatos (P=O) são ativos biologicamente, enquanto que o tiofosfatos (P=S) necessitam ser biotransformados para exercerem ação biológica. A forma P=O do composto pode ser chamada de OXON. Pelo fato da forma P=S ser intrinsecamente mais estável, alguns inseticidas são produzidos nesta forma, podendo ser convertidos em OXONS nos tecidos (WHO, 1986; VALE, 1998).

O dissulfoton é um inseticida/acaricida organofosforado sistêmico muito utilizado para o controle de insetos que se alimentam de seiva (SZETO; et al., 1983). O composto reduz o número de larvas, apresentando mortalidade deste inseto entre duas a quatro semanas após a aplicação (CLIVE, 1994).

O dissulfoton foi introduzido pela BAYER em 1956, apresentando toxicidade para um grande número de pragas. Após sua aplicação em solos, o praguicida e/ou metabólitos são absorvidos pela raiz e translocados para a folhagem (CHAPMAN et

al., 1994). Este produto foi classificado como relativamente tóxico (HARRIS; et al., 1988). Sua estrutura é mostrada na Figura 2.

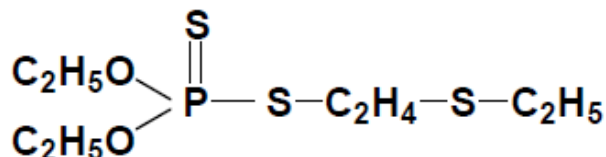


Figura 2. Estrutura química do dissulfoton: [O,O – dietil – S – [2 – (etilíio) etil] fosforoditioato].

Fonte: MARTIN et al., 1968.

Este composto apresenta-se na forma de óleo, cujo ponto de ebulição é de 128°C e pressão de vapor de $3,47 \times 10^{-5}$ Pa a 20°C. Sua solubilidade em água é de 12,0 mg L⁻¹ (MARTIN; et al., 1968).

O dissulfoton está classificado como pouco residual ou rapidamente decomposto, pois perde sua atividade no solo dentro de duas ou quatro semanas, o que não significa que tenha sido completamente inativado dentro deste período, pois seus produtos de degradação, como o dissulfoton sulfona, persistem por mais de 64 dias no ambiente (CLIVE; et al., 1994).

A absorção da maioria dos POF ocorre por difusão passiva. A pele, o trato respiratório e gastrointestinal são as principais vias de absorção destes compostos pelo organismo humano (KALOYANOVA; EL BATAWI, 1991; ECOBICHON, 1996). Na exposição ocupacional as principais vias de absorção são a dérmica e a respiratória, sendo a primeira mais expressiva em trabalhadores rurais (AZAROFF, 1999). A absorção gastrointestinal dos POF por trabalhadores expostos não é de grande importância. Geralmente a ingestão destes compostos ocorre em casos de tentativas de suicídio. Em estudos experimentais em ratos, a absorção da maioria dos POF administrados por essa via mostrou-se rápida e eficiente (HAYES, 1971; WHO, 1986).

Os POF são caracterizados pela instabilidade química e rápida biotransformação no organismo não possuindo efeito acumulativo. As reações de biotransformação e as que acontecem com constituintes do tecido ocorrem logo após a absorção. Estudos de triagem em animais usando material radioativo não fornecem nenhuma pista para a distribuição de compostos inalterados, sendo

possível determinar a via de excreção dos metabólitos e estimar a meia vida aproximada dos inseticidas no organismo, que é geralmente de poucas horas (WHO, 1986; KOLOYANOVA; EL BATAWI, 1991; MARONI; et al., 2000).

A via de biotransformação dos POF ocorre principalmente por oxidação, redução, hidrólise e conjugação. A oxidação pode resultar em produtos mais ou menos tóxicos. Em geral fosforotioatos requerem oxidação para a formação do metabólito ativo. A dessulfuração oxidativa constitui uma das principais vias de transformação dos POF, e é essencialmente a ativação do precursor fosforotioato ($P=S$) ao éster fosfato ($P=O$), com a formação de OXON, resultando em aumento da toxicidade e maior facilidade de excreção. Ao mesmo tempo, a forma OXON é mais facilmente hidrolisada e, portanto, facilmente excretada em mamíferos (WHO, 1986; LARINI, 1997).

A O-desalquilação oxidativa consiste na conversão dos triésteres a diésteres, e se trata de um processo de detoxificação. Vários fosfatos, exceto fosforotioatos, são biotransformados por essa via nos mamíferos. A desarilação oxidativa, ao contrário da O-desalquilação, parece ocorrer somente com fosforotioatos e não com fosfatos. A oxidação do grupo tioéter resulta em compostos mais ativos, com a formação de sulfóxidos e sulfonas que permanecem mais tempo no organismo (WHO, 1986; LARINI, 1997).

A oxidação de grupos alquila é um processo bem conhecido na biotransformação de muitos POF. Como exemplo, pode ocorrer a conversão da fenitrotiona ao derivado hidrossolúvel menos tóxico (WHO, 1986). A principal via de degradação dos ésteres fosforados é a hidrólise, que pode ser realizada por diferentes hidrolases teciduais como as carboxilesterases, fosforilesterases e carboxilamidases. A malationa é o POF mais conhecido por sofrer ação das carboxilesterase. O dimetoato é o único POF conhecido hidrolisado por amidases teciduais em mamíferos. (WHO, 1986; ECOBICHON, 1996).

As enzimas comumente conhecidas como A-esterases ou fosforilfosfatases são amplamente encontradas no fígado, plasma e intestinos de mamíferos, e produzem a maioria dos metabólitos urinários dos POF. A única reação de transferases envolvendo os POF requer a glutatona, que é substrato para inúmeras

transferases presentes no fígado e em alguns outros tecidos. A reação com glutathione gera produtos que são, na maioria dos casos, de baixa toxicidade (WHO, 1986; MARONI; et al., 2000).

As reações de Fase II envolvendo a conjugação de ácidos carboxílicos, alcoóis, fenóis e grupamentos aminas, iminas e sulfidrilas são bem conhecidas e aplicadas pelos compostos endógenos, como grupamentos formados após oxidação, hidrólise, e em outros relacionados à biotransformação de um POF. Cada reação de conjugação ajuda na eliminação dos produtos de degradação primária, que são usualmente destituídos de atividade anticolinesterásica. No entanto, podem causar outros efeitos tóxicos e se acumularem no organismo (WHO, 1986; QUE HEE, 1993; ECOBICHON, 1996).

A biotransformação da maioria dos POF geram dialquil fosfatos como produtos terminais. O processo de excreção pode ser subdividido de acordo com a velocidade das reações envolvidas, ocorrendo principalmente na urina, em menor quantidade nas fezes e ar expirado, com um pico de 48h declinando muito rapidamente (WHO, 1986; VALE, 1998; MARONI; et al., 2000).

Os POF agem inibindo de forma irreversível uma enzima envolvida na regulação da transmissão nervosa: a acetilcolinesterase, que é importante na regulação dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor. Embora esta classe de produto químico seja eficaz contra os insetos, elas podem causar efeitos tóxicos em outros organismos. Os POF contribuem, aproximadamente, com a metade dos inseticidas usados nos Estados Unidos (ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN FOOD, 2010).

A função normal da enzima é hidrolisar a acetilcolina que foi liberada na terminação nervosa colinérgica em resposta a um estímulo nervoso, impedindo seu acúmulo na fenda sináptica. A perda da atividade pode levar a uma variedade de efeitos resultantes de excessiva estimulação nervosa e culminando em parada respiratória e morte (MUTCH; et al., 1992; LOTTI, 1995; ECOBICHON, 1996). São inibidores que reagem com o fragmento serina do sítio ativo das colinesterases, permanecendo ligado a ele. O grupo hidroxila nucleofílico do fragmento serina, localizado no sítio ativo da acetilcolinesterase, reage com o fósforo do

organofosforado, originando uma ligação covalente. O resultado é a desativação da enzima, uma vez que o grupo hidroxila não está mais disponível para atacar o substrato da acetilcolina.

Uma vez efetuada a ligação covalente entre a enzima e o praguicida, podem ocorrer outros dois fenômenos: a) a liberação do sítio ativo da enzima (etapa lenta); b) formação de um complexo estável (etapa rápida). Por esta razão, diz-se que esta ligação é irreversível (KALOYANOVA; EL BATAWI, 1991; ECOBICHON, 1996; EYER, 1995; MÍDIO & SILVA, 1995).

Os sinais e sintomas típicos da intoxicação por POF se devem a instalação da crise colinérgica, resultando do acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas. Esse quadro sintomático pode variar quanto à intensidade, gravidade, rapidez de instalação e duração, dependendo da via de absorção, frequência e duração da exposição. Os sinais de intoxicação incluem todos aqueles resultantes da estimulação dos receptores muscarínicos, nicotínicos, da junção neuromuscular e do sistema nervoso central (ECOBICHON, 1996). Dependendo da severidade da intoxicação esses sintomas começam com o aparecimento de vômitos, dores abdominais, diarreia (principalmente no caso de ingestão), salivação e sudorese. O quadro progressivo é caracterizado por fraqueza muscular, geralmente começando nas faces e pálpebras, evoluindo para convulsões e finalmente paralisia. O tratamento das intoxicações por POF baseia-se principalmente no uso da atropina, antídoto sintomático e, com menor frequência, das oximas, antídotos específicos que reativam as colinesterases. (JEYARATNAM; MARONI, 1994).

2.2 Indicadores de exposição a organofosforados

A monitorização biológica é particularmente importante na avaliação da exposição aos praguicidas, devido às várias vias de exposição e à combinação de exposição ocupacional e não-ocupacional. Com o aumento contínuo do uso desses compostos na agricultura e a incidência de intoxicações, principalmente entre os

trabalhadores rurais, a necessidade de monitorização biológica tem aumentado nas últimas décadas.

A atividade da colinesterase sanguínea é usada como um bioindicador de exposição a POF. Este parâmetro baseia-se no fato de que os praguicidas organofosforados inibem a atividade tanto das colinesterases presentes nos eritrócitos e no plasma sanguíneo, como das colinesterases presentes no sistema nervoso. A inibição das colinesterases está altamente correlacionada à intensidade e duração da exposição aos POF. Após a intoxicação, a redução da atividade enzimática se prolonga por volta de 30 dias no plasma e 100 dias nos eritrócitos, correspondendo ao tempo de síntese hepática das pseudocolinesterase e à vida média das células vermelhas (COYE; et al., 1986; JEYARATNAM; MARONI, 1994).

A redução de 50% da atividade de colinesterase no soro é um indicador de toxicidade aguda para organofosforado. A colinesterase eritrocitária sofre uma depleção mais lenta e por isso é uma medida de exposição crônica a organofosforados (MARONI; FAIT, 1993).

Apesar do monitoramento de colinesterase ter a vantagem de fornecer uma medida da resposta fisiológica de exposição ao POF, também oferece desvantagens como, por exemplo, a variação enzimática intra e inter individual, e a influência de outros praguicidas (por exemplo, os carbamatos). Por outro lado, a existência de flutuações entre uma análise e outra na mesma amostra de sangue, contribui para a variabilidade intra-individual. Da mesma forma, a ausência de padrões iniciais de comparação dificulta saber se a diminuição da atividade enzimática ocorre devido a exposição ao praguicida ou se é um valor normal para aquele indivíduo. Outros fatores também podem afetar as atividades das colinesterases (idade, sexo, raça, estado nutricional e patologias). A colinesterase eritrocitária é menos afetada que a colinesterase plasmática, a não ser em condições que deterioremem a membrana da célula vermelha (COYE; et al., 1986; JEYARATNAM; MARONI, 1994; MARONI; et al., 2000).

Uma abordagem alternativa para monitoramento biológico à exposição de POF baseia-se na análise de seus metabólitos dialquil fosfatos (DAPs) (Figura 3), mais comumente dosados na urina. Nos últimos anos, a dosagem de DAPs tem se tornado um método comum para a avaliação da exposição a POF em investigações

epidemiológicas. Vários estudos recentes têm reportado associações com os efeitos tóxicos usando DAPs como biomarcadores de exposição. São eles: dimetil fosfato (DMP), dietil fosfato (DEP), dimetil tiofosfato (DMTP), dietil tiofosfato (DETP), dietil ditiofosfato (DEDTP), dimetil ditiofosfato (DMDTP) (YUCRA; et al., 2006).

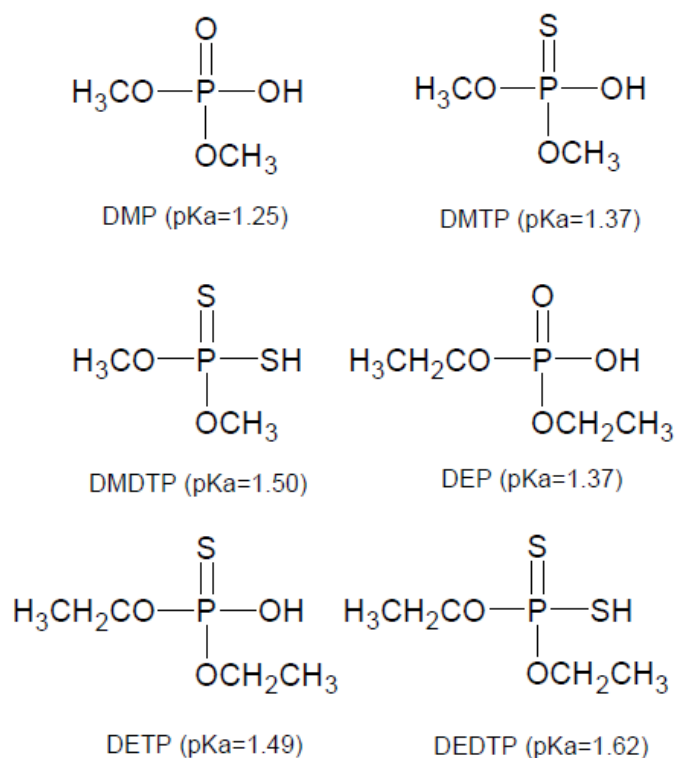


Figura 3. Metabólitos dialquil fosfatos e suas constantes de ionização (pKa).
Fonte: DE ALWIS; NEEDHAM; BARR, 2009.

2.3 Avaliação da toxicidade genética: teste de micronúcleo

O teste de micronúcleo foi desenvolvido inicialmente para ser um teste de triagem para identificação de substâncias químicas que promovessem danos ao material genético celular ao nível cromossômico (KRISHNA; HAYASHI, 2000). A substância-teste era administrada no animal em tratamento sub-agudo e seu efeito era mensurado pela contagem da frequência de células micronucleadas na leitura das lâminas de esfregaços da medula óssea (KRISHNA; HAYASHI, 2000). A técnica

envolvia o uso de linfócitos do sangue periférico e de culturas destes a partir do sangue periférico. O uso deste teste foi ampliado para o monitoramento de populações expostas a agentes potencialmente danosos ao material genético e é usado também em ensaios voltados para a avaliação da genotoxicidade de substâncias químicas (MACGREGOR; et al., 1987; HEDDLE, 1983; ASHBY; TINWEL, 1996; OECD, 1997; KRISHNA; HAYASHI, 2000; NORPPA, 2003; OECD, 2004).

O ensaio do micronúcleo tem algumas importantes vantagens quando comparado ao teste de aberrações cromossômicas tais como a maior facilidade de quantificação do desfecho e menor tempo necessário para treinamento de pessoal especializado (NORPPA, 2003). Os dois desfechos, no entanto, são relacionados e o estudo de Hayashi et al. (1983), mostrou a relação existente entre as aberrações cromossômicas e o aparecimento dos micronúcleos. O princípio do teste é simples: durante a anáfase, fragmentos de cromossomos ou, por vezes, cromossomos inteiros e cromátides acêntricas não acompanham os elementos cujos centrômeros são orientados pelo fuso celular. Após a telófase esses elementos que não foram orientados pelo fuso celular dão origem, nas células filhas, a núcleos secundários (satélites) e bem menores que os principais (KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Os micronúcleos aparecem como pequenos grânulos extranucleares que contêm esses elementos fragmentados (ou não) de cromossomos não incluídos em nenhum dos núcleos das células filhas durante a anáfase. Os micronúcleos derivam, portanto, de fenômenos aneugênicos e clastogênicos e servem, igualmente, para evidenciar esses fenômenos (NORPPA, 2003).

Esses fenômenos, embora resultem de mecanismos diferentes, apresentam desfecho parecido, dependendo da técnica histológica usada para evidenciar os mesmos: pequenos grânulos que exibem a mesma coloração do núcleo. Os grânulos são normalmente redondos, com bordas bem resolvidas, e raramente apresentam-se ovais ou em forma de meia-lua, mas, por serem menores que os núcleos celulares, recebem o nome de micronúcleos (OECD, 1997; NORPPA, 2003). Segundo Fenech et al. (2003) seus diâmetros variam entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo principal, quando contados em cultura de linfócitos binucleados isolados de sangue periférico.

Os fragmentos que originam o micronúcleo podem também resultar da ação de agentes químicos que perturbem o fuso celular, produzindo aneuploidia

(alteração numérica) no lugar de aberração cromossômica, que constitui uma alteração estrutural (HAYASHI; et al., 1984).

Como os agentes genotóxicos atuam sobre todas as células, indiferentemente, a ocorrência de micronúcleo em eritrócitos (um tipo de célula normalmente anucleada) é um fenômeno que facilita sua identificação e sua contagem. Os elementos não orientados pelo fuso, que não se integraram ao núcleo, tampouco serão expulsos da célula em uma fase posterior (KRISHNA; HAYASHI, 2000). O aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos refletirá, portanto, o aumento de dano induzido ao cromossomo.

Os eritrócitos podem ser divididos em dois tipos: imaturos (jovens, policromáticos, ou policromados) e maduros (normocromáticos ou normocromados). A ocorrência de micronúcleos nos eritrócitos maduros não parece estar diretamente relacionada com o tratamento agudo *in vivo*. Recomenda-se que, nos tratamentos agudos e sub-agudos, apenas os eritrócitos policromáticos sejam considerados. Quando o tratamento é mais prolongado, em testes sub-crônicos e crônicos, pode-se contar também a frequência de eritrócitos maduros micronucleados como indicador de toxicidade (OECD, 1997).

A técnica de coloração usada na identificação do micronúcleo, assim como o treinamento dos técnicos envolvidos na leitura das lâminas, apresenta menor influência na variação da quantificação do desfecho, mas é recomendável que cada laboratório possua seu próprio histórico de registro para o tratamento e as respostas obtidas em cada teste (FENECH; et al., 2003).

2.4 Métodos de análise de metabólitos em urina

A determinação dos metabólitos na urina é um procedimento eletivo para monitorização de POF uma vez que a coleta da amostra ocorre de forma não invasiva. Entretanto a medida de dialquil fosfatos na urina requer métodos analíticos mais sofisticados, que permitam a detecção de baixas concentrações, como por exemplo GC-MS (JEYARATNAM; MARONI, 1994). A primeira amostra de urina colhida de manhã pode representar fielmente a exposição diária total. Contudo, há

também desvantagens como a variação da concentração dos metabólitos em função da diluição da urina, problema esse facilmente resolvido pela correção com creatinina ou densidade urinária (YUCRA; et al., 2006).

A determinação direta de DAPs por cromatografia líquida não tem sido muito comum, devido à dificuldade de se separar os analitos. A maioria dos métodos de análise é baseada na separação e quantificação dos metabólitos DAPs derivatizados por cromatografia em fase gasosa. Uma preparação convencional da amostra envolve duas etapas: uma etapa de extração que isola os metabólitos da matriz urinária seguida por uma derivatização. A elevada polaridade e hidrossolubilidade dos DAPs muitas vezes representam um problema considerável para isolá-los de uma matriz urinária polar. Para resolver este problema, muitos métodos de extração foram testados no passado, incluindo: extração líquido-líquido, troca-iônica, destilação azeotrópica e liofilização. Muitas vezes estes métodos eram demorados e requeriam trabalho intensivo. Ademais, alguns métodos não conseguiram fornecer extratos limpos, afetando a subsequente derivatização e interferindo na análise por GC (cromatografia gasosa), necessitando portanto, de pré ou pós-limpeza (DE ALWIS; NEEDHAM; BARR, 2009) .

A extração em fase sólida (SPE) tem apresentado sucesso para pré-concentrar metabólitos de POF a partir de uma matriz urinária em divinil benzeno-estireno, um polímero à base de material adsorvente, que após uma lavagem ácida produz um eluato relativamente limpo contendo os metabólitos que foram derivatizados, dando boas recuperações dos produtos alquilados. Resinas poliméricas macroreticulares de divinil benzeno-estireno também servem como bom suporte sólido para reações de derivatização analítica. Combinada com a sua alta área superficial e adsorção elevada, que permite a adsorção dos analitos por vinculação hidrofóbica, os polímeros divinil benzeno-estireno provaram ser bons materiais para permitir a extração e a derivatização simultâneas em solução aquosa de uma variedade de classes de compostos (DE ALWIS; NEEDHAM; BARR, 2009).

Outra forma de realizar uma pré-concentração dos analitos na etapa de preparo de amostra é usar materiais adsorventes seletivos e com alta capacidade de retenção como os polímeros de impressão molecular (MIP). O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Linus Pauling para formação de

anticorpos, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos. A partir desta concepção, surgiu a idéia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA; 2005; MAGALHÃES; et al., 2007; DIAS; et al., 2008)

A síntese de MIP (Figura 4) é basicamente dividida em três etapas. Inicialmente, a molécula modelo (MM) forma um complexo com os monômeros funcionais. Em seguida, o reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar são adicionados, promovendo assim a polimerização com formação dos sítios seletivos. Por fim, a MM é retirada do polímero, liberando o sítio seletivo (com forma e tamanho complementares a MM) (ORTELLI; et al., 2002). Nessa etapa, o MIP já poderá ser utilizado em procedimentos de extração.

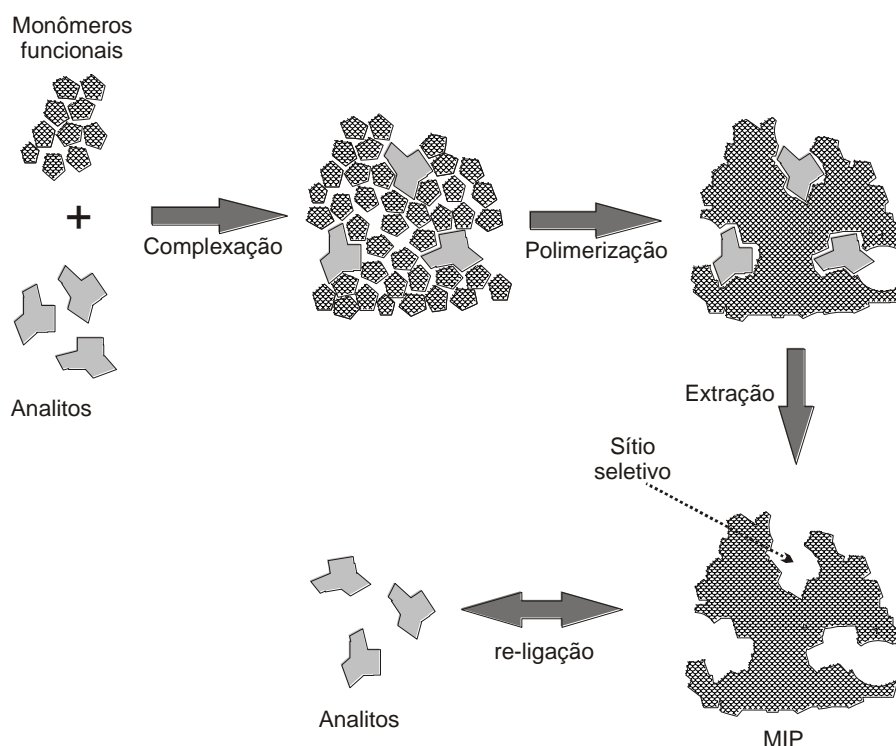


Figura 4. Esquema genérico da síntese de MIP.
Fonte: Do autor.

As interações entre analito e MIP podem ser de natureza covalente ou não-covalente. Entretanto, na grande maioria dos trabalhos relata-se o uso de MIP não covalentes devido à maior facilidade de desligamento da MM do polímero (HAUPT, 2001). É importante destacar que outras moléculas também podem ligar-se ao MIP tanto no sítio específico como também fora dele. Essas ligações são normalmente mais fracas, facilitando a eliminação de interferentes por processos de lavagem. Contudo, quando o interesse é de reter mais de uma molécula, procedimentos mais brandos de lavagem são requisitados. Por fim, destaca-se a ampla faixa de aplicação da tecnologia MIP, com ênfase para procedimentos de SPE em amostras complexas, onde os mais diversos tipos de analitos podem ser extraídos (FIGUEIREDO; et al., 2007; FIGUEIREDO; ARRUDA, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

- a) Estabelecer uma linha de pesquisa na área de análise de metabólitos de praguicidas em amostras biológicas de ratos expostos a POF.
- b) Ampliar a aplicação da tecnologia de impressão molecular na área de Toxicologia Analítica, mais especificamente sintetizando e aplicando um MIP em estudos referentes à análise de metabólitos de organofosforados em amostras de urina.
- c) Avaliar a correlação entre a concentração de dialquil fosfatos, atividade de colinesterase sanguínea e frequência de MNPCs em ratos expostos a dissulfoton.

3.2 Específicos

- a) Otimizar as condições de derivatização e separação de DETP e DEDTP por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.
- b) Sintetizar um MIP para DETP.
- c) Otimizar as condições experimentais para a extração simultânea de DETP e DEDTP amostras de urina.
- d) Avaliar o potencial pré-concentrador do MIP para a melhoria da sensibilidade na extração de DETP e DEDTP.
- e) Validar a metodologia de acordo com o FDA.
- f) Aplicar a metodologia para a extração/separação/quantificação de DETP e DEDTP em amostras de urina de ratos expostos de forma aguda ao dissulfoton.
- g) Avaliar e correlacionar as concentrações de dialquil fosfatos encontradas com a atividade de colinesterase sanguínea e a incidência e frequência de

micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCEs) nestes mesmos animais.

4 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 1 artigo científico (número mínimo), sendo representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa, tendo o mestrando como primeiro autor.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, sob a forma de dois artigos submetidos para publicação em periódicos na área de Farmácia.

4.1 Artigo I

O artigo I, intitulado “**Molecularly imprinted solid phase extraction of urinary diethyl thiophosphate and diethyl dithiophosphate and analysis by gas chromatography mass spectrometry**” consistiu em desenvolver e validar uma metodologia analítica baseada em extração em fase sólida molecularmente impressa e GC-MS para identificar e quantificar metabólitos dialquil fosfatos (DETP e DEDTP) em amostras de urina. Este trabalho será submetido a um periódico da área a ser definido pela aluna e pelo orientador.

Molecularly imprinted solid phase extraction of urinary diethyl thiophosphate and diethyl dithiophosphate and their analysis by gas chromatography mass spectrometry

Mariane Gonçalves Santos, Ricardo Vilela Vitor, Felipe Lopes Andrade, Isarita Martins, Eduardo Costa Figueiredo*

Toxicants and Drug Analysis Laboratory - LATF, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas - Unifal-MG, 700 Gabriel Monteiro da Silva street, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3299 1342; Fax: +55 35 3299 1067

E-mail: eduardocfig@yahoo.com.br

Abstract

An analytical method involving molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was developed for the analysis of organophosphates metabolites (diethyl thiophosphate - DETP and diethyl dithiophosphate - DEDTP) in human urine samples. A DETP imprinted polymer was synthesized using 4-vinylpyridine as the functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker. The conditioning step of the MISPE was conducted by running 3 mL of acetonitrile, 3 mL of 0.1 mol L⁻¹ dibasic phosphate buffer at pH 11 and 2 mL of water through the molecularly imprinted polymer (MIP) cartridge. The extraction step was executed using 1.0 mL of a urine sample, with the pH previously adjusted to 3.0. Finally, the analytes were eluted with 3 mL of acetonitrile and derivatized with 3% 2,3,4,5,6 pentafluorobenzyl bromide solution at room temperature for 1 h. The sample was analyzed by GC-MS in the SIM (selected ion monitoring) mode. Analytical calibration curves for DETP and DEDTP were constructed using a pool of urine samples and six levels of concentration. The method was found to be linear from 10 to 500 µg L⁻¹, with $r > 0.99$ and a limit of detection of 3.0 µg L⁻¹ for both analytes. The within-day and between-day precisions were evaluated (as % RSD), and all the results were < 15% for both analytes. The method was accurate, with good recovery and robustness.

Keywords: *MIP, dialkyl phosphate metabolites, SPE, pentafluorobenzyl bromide, gas chromatography mass spectrometry, organophosphates*

Introduction

Organophosphate pesticides (OPs) have been widely and effectively used as insecticides, with many applications in agricultural and residential settings [1]. In humans, these compounds are metabolized to dialkyl phosphates (DAPs) and excreted in the urine (80–90% of the total dose within 48 h) [2, 3]. Urinary DAPs, such as dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP), diethyl thiophosphate (DETP), dimethyl dithiophosphate (DMDTP) and diethyl dithiophosphate (DEDTP), are commonly used as biomarkers of organophosphate exposure [4,5]. Fig. 1 shows the chemical structure of DETP and DEDTP, the DAPs that were studied in this work.

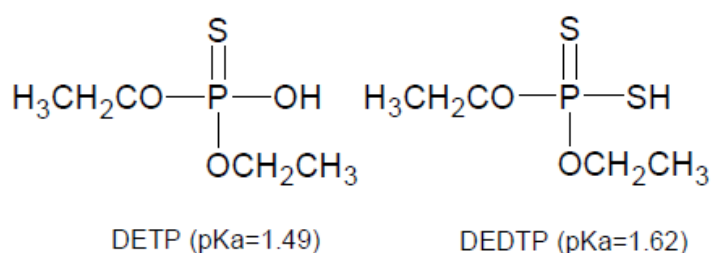


Fig 1. DETP na DEDTP metabolites and their pKa values.

The determination of DAPs by liquid chromatography has not been a common strategy due to the difficulty in separating these metabolites by this technique [5]. Several methods based on the gas chromatographic determination of the derivatized DAP metabolites can be easily found in the literature [3-5]. However, due to the presence of several concomitants in the urine samples, the use of efficient extraction techniques is necessary to avoid interference problems during the derivatization and chromatographic analyses. In this way, some specific techniques can be pointed out, such as liquid-liquid extraction [6–9], solid phase extraction [10, 11], ionic exchange extraction [12], extractive derivatization [13], azeotropic distillation [14–16] and lyophilization [17–20], among others. However, when unspecific methods are used, some concomitants may remain [14]. An efficient alternative for circumventing this problem is the use of selective sorbents such as molecularly imprinted polymers

(MIPs) [21-23]. MIPs are cross-linked synthetic polymers obtained by the copolymerization of a functional monomer with a cross-linker in the presence of a template molecule (print molecule). After polymerization, the polymer is washed, and the recognition sites are complementary to the template molecules in size, shape and chemical functionality. The imprinted polymer is able to selectively rebind the template molecule (analyte) and other molecules with analogous structures [24, 25].

MIPs have been extensively used in the solid phase extraction of several analytes in different matrices [26-29]. This work proposes an analytical method to simultaneously determine DETP and DEDTP levels in urine by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) following analysis by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

Experimental

Chemicals and solutions

All the organic solvents, such as acetonitrile, tetrahydrofuran, hexane and methanol were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The solutions were prepared with deionized water (18.2 M Ω cm) from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, USA). For the MIP synthesis, DETP was used as the template, 4-vinylpyridine was used as the functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) was used as the crosslinking reagent and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) was used as the initiator (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). HPLC grade acetonitrile was used as the solvent. A solution of methanol:acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) at a ratio of 9:1(v/v) was used during the washing of the MIP to remove the template. Stock solutions of DETP and DEDTP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared at 1.0 mg L⁻¹ in HPLC grade acetonitrile, placed in an amber flask and kept at -20°C for up to 30 days. Working solutions of 1 to 500 μ g L⁻¹ were prepared daily by diluting the standard solution in methanol. A solution of 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in acetonitrile was used as the derivatization reagent.

Gas chromatography and mass spectrometry conditions

The electron ionization (70 eV) mass spectrometric analysis was performed using a GC-MS QP-2010 from the Shimadzu[®] Corporation (Kyoto, Japan) equipped with a BPX5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm i.d.) capillary column (SGE, Argent Place, Ringwood, Victoria, Australia). Pure helium (99.999%) with a column flow of 1.53 mL min^{-1} was used as the carrier gas. A 2 μL aliquot of the standard/sample was injected in the splitless mode and analyzed under the following conditions. The initial temperature of the column was maintained at 140°C for 1 min, raised to 230°C at 40°C min^{-1} and maintained at 230°C for 1 min. The column temperature was then raised to 260°C at 20°C min^{-1} , raised to 300°C at 40°C min^{-1} and maintained at 300°C for 0.5 min. The injector, interface and ion source temperatures were 270, 300 and 230°C, respectively. The quantitative analysis was achieved in selected ion monitoring mode (SIM) with an event time of 0.2 s for each analyte. The ions at m/z 350 and m/z 366 were used to quantify DETP and DEDTP, respectively. The ions at m/z 350, 274 and 213 as well as the ions at m/z 366, 185 and 157 were employed to confirm the identity of DETP and DEDTP, respectively. The data files were acquired with the GCMS-Solution software[®].

MIP synthesis

The synthesis of the DETP-imprinted polymer was based on non-covalent interactions between the template and the functional monomer. In a 25 mL glass flask, 1 mmol of DETP and 4 mmol of 4-vinylpyridine were dissolved in 6 mL of acetonitrile chloroform; this solution was sonicated for 4 h at room temperature. After 5 min, 16 mmol of EGDMA and 0.75 mmol of AIBN were added, and the mixture was purged with nitrogen in the ultrasonic bath for 10 min. The flask was sealed and immersed into a water bath at 65°C for 24 h. After polymerization, the monolith obtained was mechanically ground, and the particle size was selected using a steel sieve (75-106 μm). The particles were transferred to a glass flask and washed in an ultrasonic bath with 4:1 (v/v) methanol/acetic acid for 1.5 h. The washing procedure was repeated 10 times, and the washing solution was renewed for each repetition. The polymer particles were dried at 70°C, and 50 mg were packed in polypropylene

cartridges. The non-imprinted polymer (NIP) was synthesized in the same way as the MIP, in the absence of the template.

Sample preparation and MISPE procedure

The urine sample handling was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (n^o: 296/2010).

Initially, 3 mL of acetonitrile, 3 mL of 0.1 mol L⁻¹ dibasic phosphate buffer at pH 11.0 and 2 mL of water were flowed through the MIP cartridge at 1 mL min⁻¹ during the conditioning step. Then, 1.0 mL of human urine sample/standard at pH 3.0 (adjustment with 1.0 mol L⁻¹ nitric acid aqueous solution) was percolated through the cartridge at 1 mL min⁻¹, and DETP and DEDTP were selectively extracted. Finally, the analytes were eluted with 3 mL of acetonitrile, and the extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream. The derivatization reaction was performed according to the procedure described by De Alwis et al. [5], with some modifications. K₂CO₃ (15.0 mg) and 250 µL of 3% PFBBBr solution (v/v in acetonitrile) were added to the tube containing the residue from the MISPE. The extract was allowed to stand for 1 h at room temperature for the derivatization reaction. Then, the derivatized extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in 100 µL of tetrahydrofuran before the GC-MS analysis.

Validation study

The developed method was validated in accordance with the US FDA guidelines (2001) [30]. The following validation parameters were evaluated: linearity, sensitivity, precision, accuracy, recovery, detection and quantification limits and robustness. This study was performed using a pool of blank human urine samples spiked with DETP and DEDTP at concentrations ranging from 10 to 500 ng mL⁻¹. The linearity and sensitivity were established through the calibration curve obtained by a sextuplicate analysis of DETP and DEDTP at six concentration levels (10, 50, 100, 200, 350 and 500 ng mL⁻¹). Linearity and sensitivity were expressed as the correlation coefficient (r) and the slope of the calibration curve, respectively. Intra-

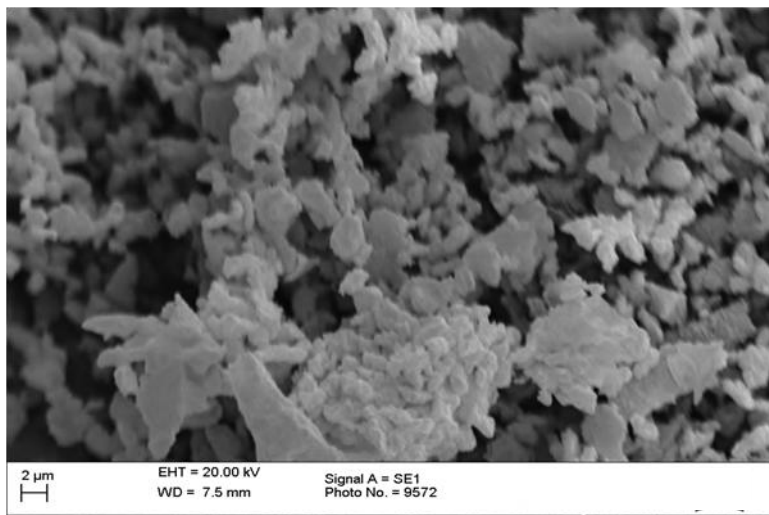
assay precision and accuracy were assessed with five replicates of each concentration level (50, 200 and 500 ng mL⁻¹) on the same day. Inter-assay precision and accuracy were evaluated by three replicates analyzed at each concentration level (50, 200 and 500 ng mL⁻¹) on separate days. The results were expressed as percent relative standard deviations and percent relative errors for precision and accuracy, respectively. The recovery was calculated using the extraction efficiency by comparing the responses obtained after the analysis of a fortified blank urine sample (n=3) and a fortified extract obtained after the MISPE procedure (with a blank urine sample). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation (SD) and slope (S) of the calibration curve and in accordance with the following formulas: LOD=3.3 (SD/S) and LOQ=10 (SD/S). Ruggedness was evaluated using the Youden approach, which is based on a fractional factorial design.

Results and discussion

MIP characterization

The synthesis provided approximately 3 g of material. The morphological structure of the MIP and NIP can be determined from Fig. 2, which shows the scanning electron microscopy (SEM) images of the materials. The MIP showed higher porosity than the NIP. This characteristic is important in extraction procedures because it favors interactions between the analytes and the absorbent [31].

A



B

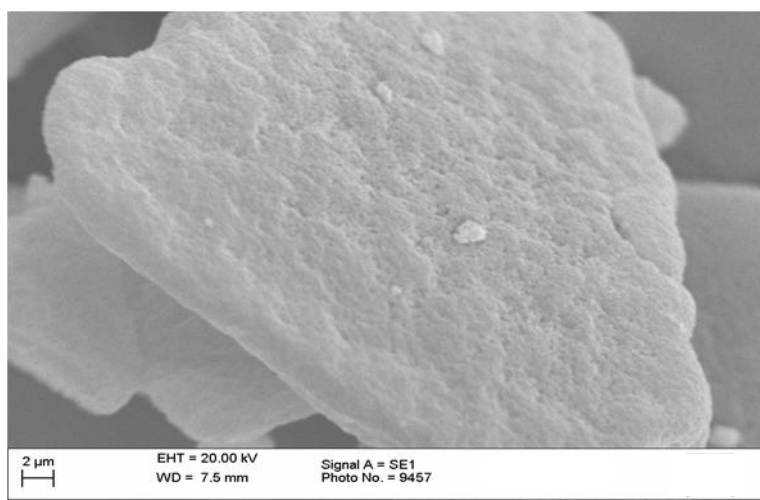


Fig 2. Scanning electron micrographs of the MIP (A) and the NIP (B).

The extraction capabilities of the MIP and NIP were also investigated. DETP aqueous solutions, ranging in concentration from 0.1 to 7.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, were extracted as described in the above section titled “Sample preparation and MISPE procedure”, and the mass of the DETP retained in the polymer was calculated. Fig 3 shows the adsorption isotherm for DETP in the polymers. It indicates that the adsorption for both the materials increased when the DETP concentration increased. As observed, the MIP had the highest adsorption capacity, probably because its interactions with DETP were based on molecular recognition, whereas only non-specific interactions

prevailed between the NIP and DETP [31, 32]. In addition, a linear Langmuir model was employed to describe the adsorption behavior of DETP in the MIP. A good fit was observed ($r = 0.97$), as shown in Fig. 4, and the adsorptive maximum capacity was $67 \mu\text{g g}^{-1}$ (calculated as the inverse of the slope). Thus, there is a uniform distribution of the analytes around the polymer that form a monolayer on the MIP surface [33]. After saturation, the DETP has more affinity for the solvent than for other molecules already adsorbed [34].

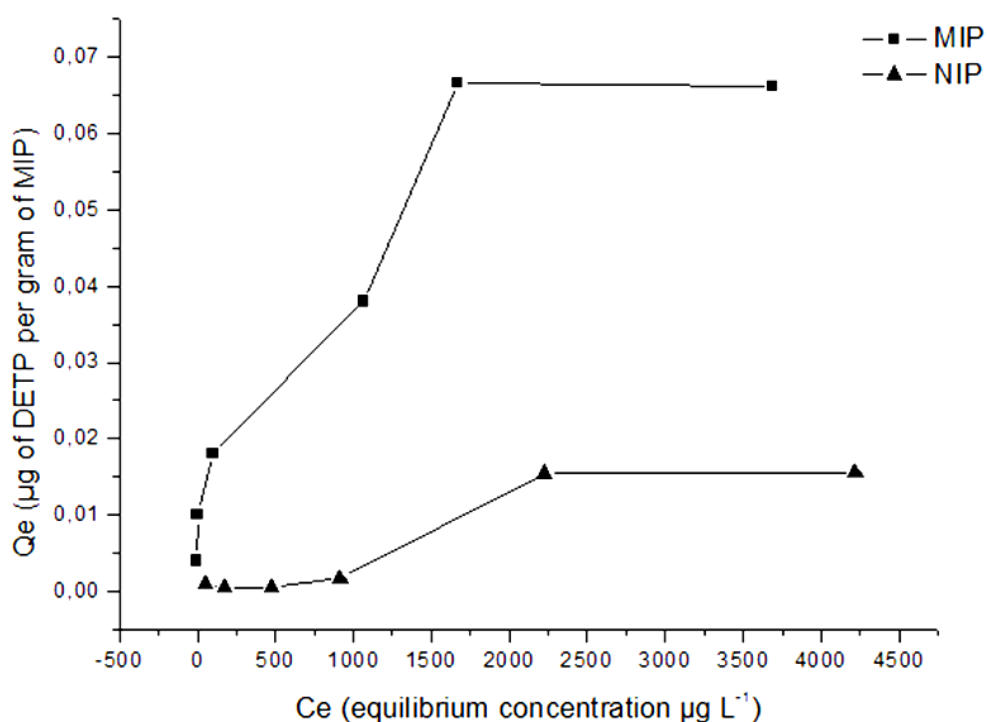


Fig 3. Adsorption isotherms of DETP for the MIP and the NIP.

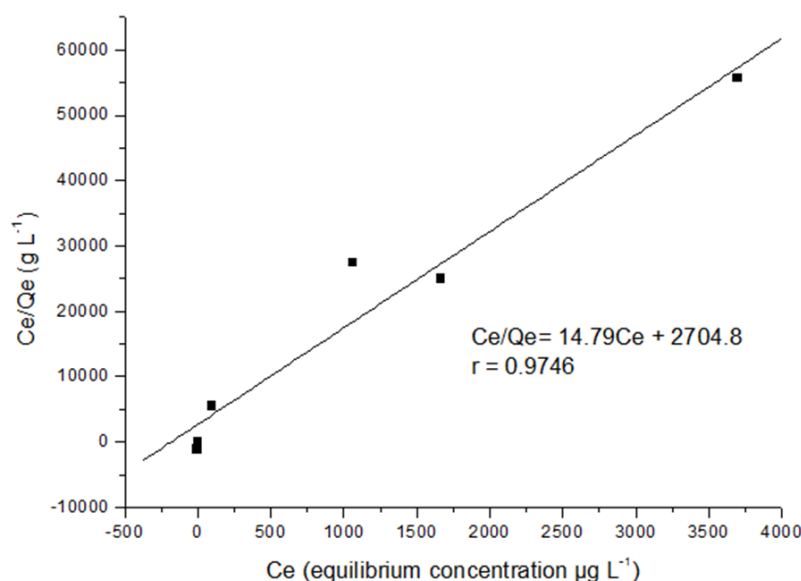


Fig 4. Langmuir adsorption isotherm of DETP for the MIP.

Optimization of the MISPE conditions

The following variables were evaluated in a univariate manner: urine pH, mass of the polymer and nature/volumes of the solvents for the conditioning and elution steps. The starting conditions were as follows: a cartridge with 50 mg of MIP, conditioning with 3 mL of acetonitrile, loading with 1 mL of urine at physiological pH and elution with 1 mL of acetonitrile.

Initially, the ideal pH of the standards/samples was investigated with a 0.1 mol L⁻¹ nitric acid aqueous solution to adjust the pH from 1 to 9. Different behaviors were observed for both analytes. DETP was best extracted in an acidic medium (pH smaller than 3.0), while DEDTP was best extracted in a basic medium (pH larger than 6.0). Thus, the extraction was optimized at pH 3.0, where satisfactory recovery values were obtained for both analytes (13 and 17% for DETP and DEDTP, respectively). It is probable that electrostatic interactions prevail between the analytes and the functional monomer at this pH range, once the DETP, DEDTP and 4-vinylpyridine are in their ionized forms.

The mass of the MIP in the cartridge (25, 50, 100 and 150 mg) was evaluated in terms of recovery, and for DETP, non-significant changes were observed when the

mass of the MIP increased (recoveries of 18, 20, 23 and 25% for 25, 50, 100 and 150 mg of the MIP, respectively). For DEDTP, recoveries of 16, 30, 9 and 4% were obtained for 25, 50, 100 and 150 mg of the MIP, respectively. In this way, 50 mg of the MIP was selected as the working condition.

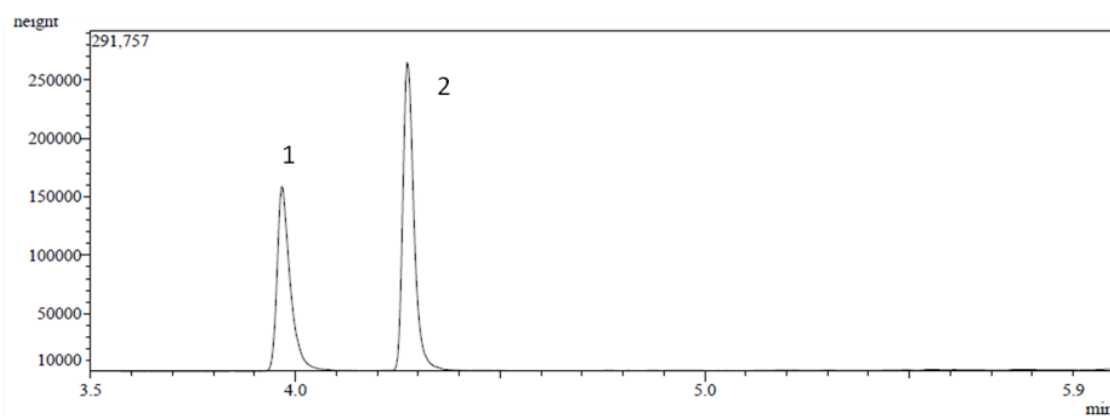
The choice of elution solvent is very important to guarantee the efficient elution of the analytes from the MIP. To evaluate this effect, ethyl acetate, tetrahydrofurane, acetonitrile and methanol were tested, and recoveries of 17, 20, 23 and 28% and 8, 17, 30 and 13% were obtained for DETP and DEDTP, respectively. As observed, the best recoveries were obtained with methanol and acetonitrile for DETP and acetonitrile for DEDTP. Because acetonitrile is slightly more lipophilic than methanol, it was more efficient for eluting DEDTP. It is also slightly more lipophilic than DETP due to the presence of an SH group [35]. Additionally, because the MIP was imprinted with DETP as a model, the interactions between the polymer and DEDTP are slightly weaker, and it was more easily eluted. Therefore, acetonitrile was selected as the elution solvent, and its volume during each elution step was also investigated from 0.5 to 3.0 mL. An increase in recovery (from 6 to 29% for DETP and from 9 to 32 % for DEDTP) was observed when the volume was increased (from 0.5 to 3.0 mL), possibly because larger volumes were more efficiently distributed in the MIP cartridge, and a more effective elution was processed. A 3.0 mL volume was selected for further experiments. Volumes larger than 3.0 mL were not appraised due to the long time necessary to dry the extract before the derivatization step.

Conditioning solutions are necessary to prepare the adsorbent for the next extraction, mainly by the elimination of analytes and concomitants coming from previous extractions. First, 3 mL of acetonitrile was used as the conditioning solution; however, the complete removal of the analytes (from the previous extraction) was not guaranteed with this solution, especially for DEDTP, resulting in a memory effect. As observed during the sample optimization of the pH, the interactions between the MIP and DEDTP were weaker in a basic medium. Thus, different alkaline solutions of 0.1 mol L⁻¹ of dibasic phosphate buffer at pH ranging from 6.0 to 11.0 was passed through the MIP (3 mL) as a second conditioning step (after acetonitrile). Almost complete cleaning was obtained with 0.1 mol L⁻¹ dibasic phosphate buffer at pH 11.0. Finally, 2 mL of water was passed through the MIP (after phosphate buffer), and the

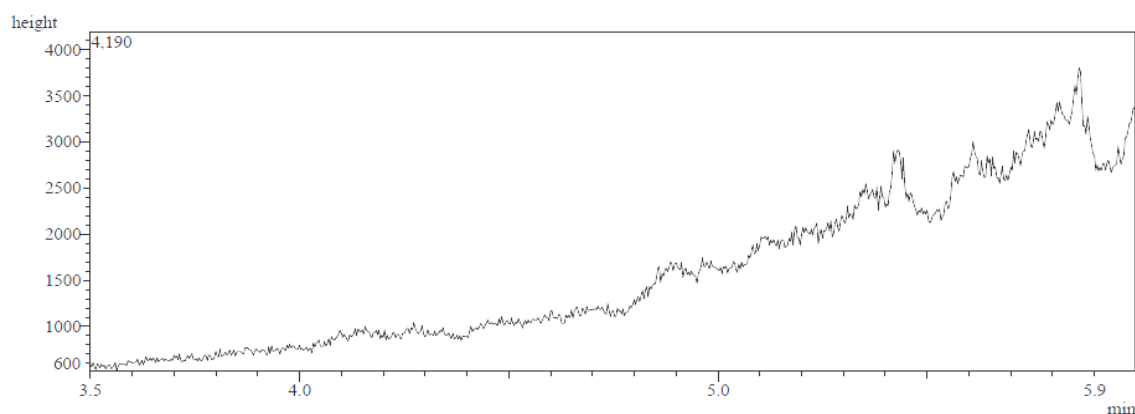
analytes and others concomitants were completely eliminated from the polymer, avoiding the memory effect.

Fig. 5 shows the chromatograms obtained after MISPE optimization for 500 ng mL⁻¹ of DETP and DEDTP aqueous standard, a blank urine sample and a blank urine sample fortified with 500 ng mL⁻¹ of DETP and DEDTP. As observed, the selectivity of MISPE was evidenced due to the absence of concomitant peaks when the blank urine sample was analyzed by SIM. Figs. 6A and 6B show the mass spectra for DETP and DEDTP, respectively.

A



B



C

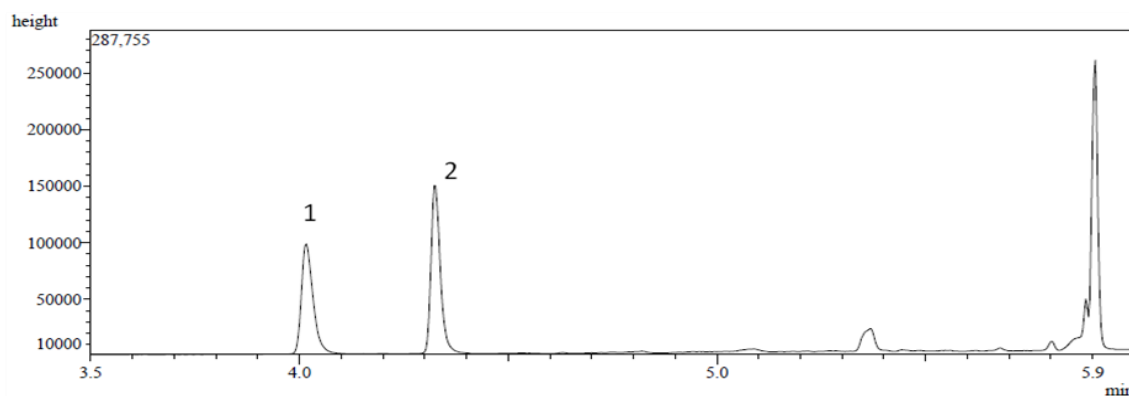
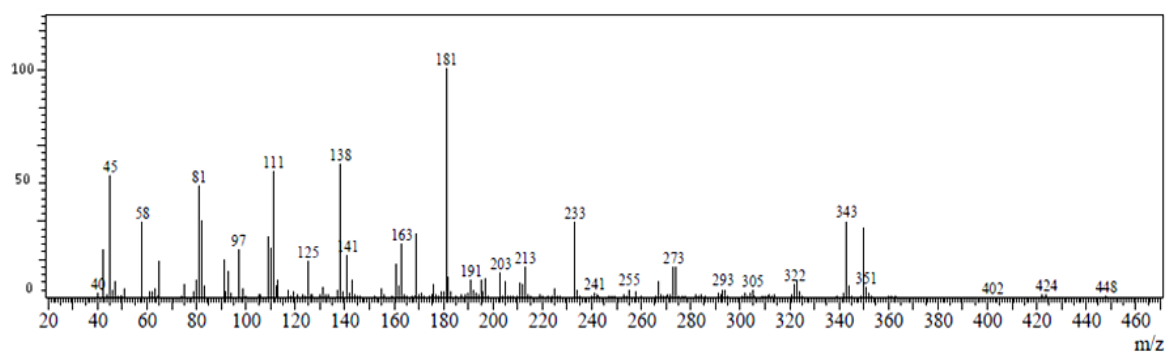


Fig 5. Chromatograms obtained after MISPE optimization in the SIM mode (monitored using the ions at m/z 350 and m/z 366) for 500 ng mL^{-1} DETP and the DEDTP aqueous standard (A), blank urine sample (B) and blank urine sample fortified with 500 ng mL^{-1} of DETP and DEDTP (C). 1 - DETP and 2 - DEDTP.

A



B

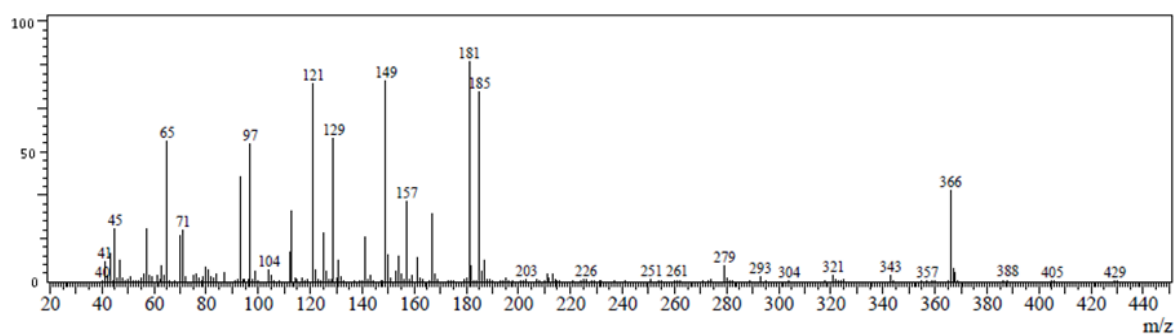


Fig 6. Mass spectra obtained in the SCAN mode for DETP (A) and DEDTP (B).

Confidence parameters and method application

Table 1 shows the linear range, correlation coefficient, slope, LOD, LOQ and recovery for the DETP and DEDTP analysis by MISPE and GC-MS. All the parameters were obtained in accordance with FDA recommendations [30]. As observed, the results attest to the good performance of the present method for the DETP and DEDTP analysis in human urine samples. In addition, within-day and between-day precision and accuracy produced acceptable relative standard deviations and relative errors according to FDA recommendations [30], as demonstrated in Table 2. The same MIP cartridge was used during all the optimization and validation steps, and non-significant differences were observed in the analytical signal until ca. 150 cycles. The robustness assessment, through changes made in the nominal conditions, reflects the changes that can occur when a method is transferred to other laboratories, analysts, or equipment [36]. In this context, the Youden approach [36] allowed us to assess the robustness of the method and noted the influence of each parameter in the final result. The variables evaluated are described in Table 3, which also demonstrates the factorial combination for assay and the formula to evaluate the variation effect. The results are presented in Table 4. All the variables evaluated showed an influence in the $\pm 10\%$ range, attesting to the robustness of the method. Human fortified urine samples were analyzed by the proposed method, and the results are presented in Table 5.

Table 1
Validation parameters of the MISPE GC-MS method for the determination of DETP and DEDTP in urine

Validation parameters	DETP	DEDTP
Linear range / ng mL ⁻¹	10-500	10-500
Correlation coefficient (r)	0.9978	0.9925
Slope/ mL ng ⁻¹	591.96	1014
LOD/ ng mL ⁻¹	3.0	3.0
LOQ /ng mL ⁻¹	10.0	10.0
Recovery (extraction efficiency)/ %	28.9 ^a 29.4 ^b 29.7 ^c	32.7 ^a 31.9 ^b 32.3 ^c

^aFor 50 ng mL⁻¹ (n=5); ^bfor 200 ng mL⁻¹ (n=5) and ^cfor 500 ng mL⁻¹ (n=5)

Table 2
Precision and accuracy for the MISPE GC-MS analysis of DETP and DEDTP in urine samples.

		DETP			DEDTP		
Within-day (n = 5)	NC ^a / ng mL ⁻¹	50	200	500	50	200	500
	AC ^b / ng mL ⁻¹	50.4	217.9	505.8	53.5	171.2	496.2
	Precision (RSD ^c /%)	13.5	7.6	11.2	11.0	14.2	12.7
	Accuracy (E ^d /%)	0.8	9.0	7.1	2.2	-14.4	-0.8
Between-day (n = 4,3)	NC/ ng mL ⁻¹	50	200	500	50	200	500
	AC/ ng mL ⁻¹	47.2	194.7	501.4	51.1	170.2	503.4
	Precision (RSD/%)	9.3	12.2	6.9	5.3	3.8	3.2
	Accuracy (E/%)	-5.6	-2.6	0.3	2.2	-14.9	0.7

^anominal concentration, ^banalyzed concentration, ^ccoefficient of variation and ^drelative error.

Table 3
Analytical parameters and its variations evaluated by Youden test

Analytical parameters	Nominal (+)	Variation (-)	Factorial combination for assay								Formula to variation effect
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Injector temperature (°C)	270.0	255.0	+	+	+	+	-	-	-	-	(a+b+c+d)/4– (e+f+g+h)/4
Source temperature (°C)	230.0	219.0	+	+	-	-	+	+	-	-	(a+b+e+f)/4– (c+d+g+h)/4
Interface temperature (°C)	300.0	285.0	+	-	+	-	+	-	+	-	(a+c+e+g)/4– (b+d+f+h)/4
Total flow rate (mL min ⁻¹)	20.0	19.0	+	+	-	-	-	-	+	+	(a+b+g+h)/4– (c+d+e+f)/4
Sample pH	3.0	2.85	+	-	+	-	-	+	-	+	(a+c+f+h)/4– (b+d+e+g)/4
Elution volume (mL)	3.0	2.8	+	-	-	+	+	-	-	+	(a+d+e+h)/4– (b+c+f+g)/4
Derivatization reagent volume (mL)	0.25	0.24	+	-	-	+	-	+	+	-	(a+d+f+g)/4– (b+c+e+h)/4
Result			a	b	c	d	e	F	g	h	

Table 4
Effects of the analytical parameters used to evaluate the robustness in the DETP and DEDTP concentrations.

Analytical parameters	Parameter value in the resulting DETP (%)	Parameter value in the resulting DEDTP (%)
Injector temperature (°C)	-1.3	5.5
Source temperature (°C)	3.4	3.4
Interface temperature (°C)	7.5	4.0
Total flow rate (mL min ⁻¹)	5.4	1.2
<i>Sample pH</i>	1.7	3.3
Elution volume (mL)	0.5	3.7
Derivatization reagent volume (mL)	3.8	3.1

Table 5
Human fortified urine samples analyzed by the proposed method.

Samples	NC ^a ng mL ⁻¹	DETP		DEDTP	
		AC ^b / ng mL ⁻¹	E ^c /%	AC/ ng mL ⁻¹	E/ %
1	75	73.8	-1.60	70.7	-5.73
2	150	152.2	1.47	148.6	-0.93
3	250	256.6	2.64	243.9	-2.44
4	400	399.4	-0.15	403.1	0.78
5	500	504.2	0.84	500.3	0.06

^anominal concentration, ^banalyzed concentration, ^crelative error

Conclusions

The developed chromatographic method involving molecularly imprinted polymer solid-phase extraction and GC-MS was appropriate for the analysis of DETP and DEDTP in urine samples. Good figures of merit were attained, such as low LOQ, a wide linear range and good precision and accuracy. Additionally, other characteristics of this method should be emphasized, such as its high selectivity, high MIP cartridge lifetime, use of small sample volumes, possibility of MISPE

mechanization and implementation for routine DAP monitoring in occupational exposure to organophosphate pesticides.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, Brazil) - projects CDS - APQ-01323-09 and CDS - APQ-01612-10, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil) for their financial support.

References

- [1] P.G. Bardin, S.F. van Eeden, J.A. Moolman, A.P. Foden, J.R. Joubert, *Arch. Intern. Med.* 154 (1994) 1433-1441.
- [2] M. Maroni, A. Fait, *Toxicology*, 78 (1993) 1975-1991.
- [3] C. Wu, P. Liu, L. Zheng, J. Chen, Z. Zhou, *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 2575–2581.
- [4] R. Bravo, W.J. Driskell, R.D. Whitehead Jr., L.L. Needham, D.B. Barr, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 245-252.
- [5] G.K.H. De Alwis, L.L. Needham, D.B. Barr, *Talanta.* 77 (2009) 1063–1067.
- [6] D.E. Bradway, R. Moseman, R. May, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26 (1981) 520-523.
- [7] Z. Vasilic, V. Drevenkar, V. Rumenjak, B. Stengl, Z. Frobe, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22 (1992) 351-357.
- [8] T. Shafik, D.E. Bradway, H.F. Enos, A.R. Yobs, *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 625-629.
- [9] J. Hardt, J. Angerer, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 678-684.
- [10] S.S. Park, H. Pyo, K.-J. Lee, S.-J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* 19 (1998) 45-50.

- [11] C. Weisskopf, J. Sieber, in: S.G.Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt, J.C. Reinert, *Biological Monitoring for Pesticide Exposure. Measurement, Estimation, and Risk Reduction*, Am. Chem. Soc. 16 (1989) 206-214.
- [12] C.D. Brokopp, J.L. Wyatt, J. Gabica, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26 (1981) 524-529.
- [13] A. Miki, H. Tsuchihashi, K. Ueda, M.Y. Yamashita, *J. Chromatogr. A.* 718 (1995) 383-389.
- [14] C. Aprea, G. Sciarra, L. Lunghini, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 559-563.
- [15] T.F. Moate, C. Lu, R.A. Fenske, R.M. Hahne, D.A. Kalman, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 230-236.
- [16] W.J. Driskell, M. Shih, L.L. Needham, D.B. Barr, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 6-10.
- [17] J.E. Davies, J.C. Peterson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 837 (1997) 257-268.
- [18] N. Kupfermann, H. Schmoldt, J. Steinhart, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 242-248.
- [19] A.N. Oglobline, G.E. O'Donnell, R. Geyer, G.M. Holder, B. Tattam, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 153-157.
- [20] R. Bravo, L.M. Caltabiano, G. Weerasekera, R.D. Whitehead, C. Fernandez, L.L. Needham, A. Bradman, D.B. Barr, *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* 14 (2004) 249-259.
- [21] K. Mosbach, O. Ramstrom, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 163-170.
- [22] C.S. Magalhães, J.S. Garcia, A.S. Lopes, E.C. Figueiredo, M.A.Z. Arruda, in: M.A.Z. Arruda (Ed.), *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, New York 2007.
- [23] D. Ortelli, S. Rudaz, S. Souverain, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 222-228.
- [24] S.G. Hu, L. Li, X.W. He, *Anal. Chim. Acta.* 537 (2005) 215-222.
- [25] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 1742-1778.
- [26] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 477-486.
- [27] E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 143-154.
- [28] E.C. Figueiredo, M.A.Z. Arruda, *Br. J. Anal. Chem.* 1 (2010) 36-41.

[29] E.C. Figueiredo, C.R.T. Tarley, L.T. Kubota, S. Rath, M.A.Z. Arruda, *Microchem. J.* 85 (2007) 290-296.

[30] US FDA—United States Food and Drug Administration, *Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation*. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville (2001).

[31] X. Hu, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A.* 1147 (2007) 1-9.

[32] J. He, R. Lv, H. Zhan, H. Wang, J. Cheng, K. Lu, F. Wang, *Anal. Chim. Acta.* 674 (2010) 53-58.

[33] O.S. Amuda, A.A. Giwa, I.A. Bello, *Biochem. Engineer. J.* 36 (2007) 174-181.

[34] M. Radhika, K. Palanivelu, *J. Hazard. Mater.* 138 (2006) 116-124.

[35] J.E. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, first ed, Rio de Janeiro, 2001.

[36] W.J. Youden, E.H. Steiner, *Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*, Washington, 1975.

4.2 Artigo II

O artigo II, intitulado “**An estimate of exposure to disulfoton by the determination of blood cholinesterase activity, concentration of dialkyl phosphates and incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in rats**” consistiu em aplicar a metodologia analítica desenvolvida em um estudo que avalia a dose de exposição ao dissulfoton, a concentração de dialquil fosfatos, a atividade de colinesterase sanguínea e a incidência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos em ratos. Este trabalho será submetido a um periódico da área a ser definido pela aluna e pelo orientador.

An estimate of exposure to disulfoton by the determination of blood cholinesterase activity, concentration of dialkyl phosphates and incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in rats

Mariane Gonçalves Santos¹, Ricardo Vilela Vitor¹, Maurício Gustavo Nakamura¹, Luana de Souza Morelini², Rafaela Scalco Ferreira², Alexandre Giusti Paiva³, Luciana Azevedo², Isarita Martins¹, Eduardo Costa Figueiredo^{1*}.

¹Toxicants and Drug Analysis Laboratory - LATF, ²Nutritional and Toxicological Analysis *in vivo* Laboratory, ³Physiology Laboratory.

Federal University of Alfenas - Unifal-MG, 700 Gabriel Monteiro da Silva street, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3299 1342; Fax: +55 35 3299 1067

E-mail: eduardocfig@yahoo.com.br

Abstract

Organophosphates (OPs) are widely used as insecticides in agriculture and residential settings. These compounds are harmful to health and the blood cholinesterase (ChEs) activity has been commonly used to represent the level of each exposure, according to the fact that the OPs pesticides inhibit the activity of these enzymes. In addition, OPs are biologically metabolized to dialkylphosphates (DAPs) and the determination of these metabolites in urine has been also reported as a sensitive bioindicator for assessment of OPs exposure. Another possible effect of these pesticides is their capability to induce mutagenesis. The *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test allows an effective assessment of both chromosomal damage and chromosome loss induced by chemicals, because it is simpler and faster than traditional chromosome analysis. In this paper, a study was processed to verify the correlation between the disulfoton dose with blood ChEs activity, urinary DETP and DEDTP concentration and frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs). Four groups of rats (n=12) were exposed to 0, 2.82, 4.70 and 6.58 mg kg⁻¹ body weight of disulfoton and the blood ChEs activity, urinary diethyl thiophosphate (DETP) and diethyl dithiophosphate (DEDTP) concentrations and frequency of MNPCEs were determined. It was observed that the plasma ChEs activity decreased from 2.85% to 0.52% and the erythrocyte ChEs activity decreased from 35.9 to 3.3% when the disulfoton dose was increased from 0 to 6.58 mg kg⁻¹ body weight (correlation of 0.99). Urinary DETP concentrations as well as the MNPCEs frequency increased from 0 to 6.58 µg mL⁻¹ and from 0 to 1.4 %, respectively, when the disulfoton dose was increased from 0 to 6.58 mg kg⁻¹ body weight. Based on the above is possible to suggest that the determination of dialkylphosphates metabolites reflects well the dose of exposure to disulfoton. It is also possible to observe that, like other organophosphates pesticides, disulfoton is able to induce mutagenicity in acute exposure. This is especially important when it comes to victims of accidental ingestion or attempted suicide.

Keywords: *dialkyl phosphate, cholinesterase, organophosphates, pesticides, disulfoton, micronucleated polychromatic erythrocytes.*

Introduction

Organophosphates (OPs) are potent and effective anti cholinergic insecticides, and remain the largest class of insecticides sold worldwide. They are widely and effectively used in agriculture, and to a lesser extent, in domestic pest control [1]. Among them we can mention the disulfoton (O,O-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] phosphorodithioate) (Figure 1), which is widely used in coffee crops in Brazil. In addition, these compounds can be responsible for serious problems of intoxication, and, for this fact, efficient bioindicators are welcome to monitor the level of exposure to OP, as well as the more probable effects resulting from each one.

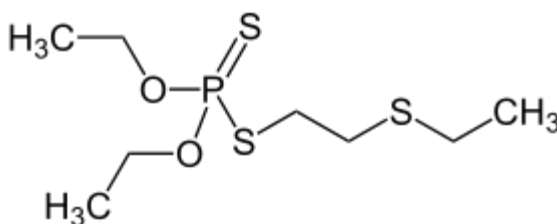


Fig 1. Chemical structure of disulfoton.

The blood cholinesterase (ChEs) activity is widely used as a bioindicator of OPs exposure once that these pesticides inhibit the activity of this enzyme in red blood cells and plasma [2]. A simple procedure based on spectrophotometry can be efficiently employed to determine the ChEs activity [3]. On the other hand, there is a great variability in the normal enzymatic activity between different individual. Thus, the ChEs activity in the pre-exposure should be the reference to appraise the enzymatic activity during the exposure [4], resulting in the need of a constant monitoring. In addition, OPs can be biologically metabolized to dialkylphosphates (DAPs) and the determination of these metabolites in urine has also been reported as a sensitive bioindicator to assess the OPs exposure level, especially in acute exposure events such as occupational exposure and intentional poisonings [5,6]. Figure 2 shows the structures of the commonly measured DAPs metabolites for

exposure to disulfoton: diethylthiophosphate (DETP), and diethyldithiophosphate (DEDTP) [7,8].

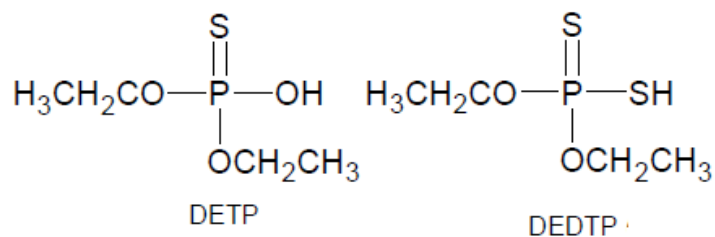


Fig 2. Dialkyl phosphates metabolites.

Another effect of the OPs is their capability to induce mutation and probably cancer. In this way, the *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test can be a satisfactory methodology to appraise the mutagenic effect, due to the effective assessment of both chromosomal damage and chromosome loss induced by chemicals, as well as by the simplicity and high speed of this test in comparison with traditional chromosome analysis [9,10]. The micronucleus can be originated from acentric chromosome fragments as well as from whole chromosome lagging at anaphase, during the division of the nucleated precursor cells. They persist in cytoplasm for some time and so may be scored at interphase in polychromatic erythrocytes (PCEs) [11-13]. An increase in micronucleated PCEs (MNPCEs) frequency is therefore an indication of aneuploidy or clastogenicity induction.

As could be seen, different bioindicators had been used individually to evaluate the OPs exposure or specific effects of these pesticides. However, the correlations between them and the exposure doses were not been studied until today, and there is no classification about the efficiency of each one for monitoring the exposure to OPs. In this context, this work aimed to study the correlation between the three exposure doses, the blood ChEs activity, the frequency MNPCEs and the concentration of urinary DETP and DEDTP in a group of rats exposed to disulfoton.

Experimental

Chemicals and solutions

The organic solvents as acetonitrile and tetrahydrofuran (HPLC grade) were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The water used was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, USA). Disulfoton (O,O-diethyl S-[2-(ethylthio)ethyl] phosphorodithioate 98,6% purity) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). The solution of disulfoton was prepared in corn oil before each application [14]. Ditiobisnitrobenzoate (DTNB), acetylthiocoline (ATTC) and Cyclophosphamide (CPA) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide (PFBBr) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) solution was prepared at 3% (v/v) in HPLC grade acetonitrile, daily.

Study subjects and sample preparation

The animals used in this study were handled in accordance with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The protocol used here was approved by the Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Ethics Committee for Animal Research (296/2010). For *in vivo* experiments, we used adult male rats weighing 275 ± 30 g. The animals were housed in metabolic cages in an experimental room under controlled conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity ($55 \pm 10\%$), and a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to diet and water. The animal experiment comprised 4 groups (12 individuals each): group 1 (negative control), group 2, 3 and 4 which received a single intraperitoneal injection of a corn oil solution [14] containing 2.82, 4.70 and 6.58 mg kg⁻¹ body weight, corresponding to 30, 50 and 70% of the lethal dose 50 % - disulfoton LD50 in rats (9.40 mg kg⁻¹ body weight [15]), respectively. For the test of MNPCEs was also used a group (6 individuals) as positive control, in addition to other, which received 30 mg kg⁻¹ body weight of cyclophosphamide (CP). The concentration of DETP and DEDTP were determined in urines of 24 h of each group and collected after the disulfoton application (after 24 h).

Urine samples were subjected to a molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) followed of derivatization with PFBBr and analysis by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) [16]. The densities of the urine samples were measured and the concentrations of DETP and DEDTP were corrected by this value [17]. Animals were sacrificed by decapitation 24 h after the treatment, and the whole blood was collected for studies of ChEs. The ChE activities were determined by the Ellman et al. modified method [3]. The bone marrow was processed immediately for mutagenicity tests. The mutagenicity was evaluated using the bone marrow micronucleus test, according to the protocol by MacGregor et al. [10].

Instrumental

To determinate the concentration of DETP and DEDTP an GC–MS QP-2010 from Shimadzu® Corporation (Kyoto, Japan) equipped with a BPX5 (30 m×0.25 mm×0.25 µm i.d.) capillary column (SGE, Victoria, Australia) was used. For the determination of blood cholinesterase activity was used a spectrophotometer UV-VIS Biomate 5 (Thermo Electron Corporation, Rochester, USA) operating at a wavelength of 430 nm. To perform the counting of MNPCEs was used a microscope Eclipse 50 i (Nikon, Melville, USA).

Results and discussion

Measurements of plasma ChEs and erythrocyte ChEs have been used for a number of years in cases of clinical poisoning and accidental OPs exposure, and in monitoring of workers with high risk of exposure. Depression of the plasma ChEs enzyme activity is not necessarily associated with symptoms of anti-cholinergic toxicity and large depressions in ChEs have been noted in the absence of any effect on erythrocyte ChEs. Decreases in the red cell enzyme activity have been suggested to have closer relations to these symptoms. Therefore, in both clinical toxicology and monitoring high-risk occupational activities, the measurement of both enzymes has been recommended [4]. Thus, we evaluated the plasma and erythrocyte ChEs

activity in animals exposed to disulfoton. As the data show a normal distribution, an analysis of variance (ANOVA) followed by application of independent *t* test was used for the statistical treatment of data. Table 1 shows the percentage of inhibition of plasma and erythrocyte cholinesterase of groups of animals exposed to different doses of disulfoton. The results were considered statistically significant if the *p* values were 0.05 or less. There were no significant differences in plasma cholinesterase activity between groups 1 and 2 (exposure to 30 and 50% of the LD50 of disulfoton, respectively).

Table 1. Activity of plasma and erythrocytes ChEs of rats exposed to Disulfoton in different exposure doses

Treatment group	n	Plasma ChE (%)	Erythrocyte ChE (%)
Negative Control (no exposure)	12	2.85±0.08 ^a	35.86±3.17 ^d
Group 1 (exposure to disulfoton 2,8 mg kg ⁻¹ b.w)	12	0.85±0.08 ^b	18.75±2.60 ^e
Group 2 (exposure to disulfoton 4,7 mg kg ⁻¹ b.w)	12	0.74±0.10 ^b	11.80±1.07 ^f
Group 3 (exposure to disulfoton 6,8 mg kg ⁻¹ b.w)	12	0.52±0.05 ^c	3.30±0.32 ^g

Values are expressed as percentage of activity ± SD. a, b, c, d, e, f, g Values followed by different letters are significantly different by analysis of variance (ANOVA) followed by application of independent T test (*p* < 0.05).

On the other hand, significant differences were observed among all exposed groups and negative control (no disulfoton). In addition, statistical differences were observed between groups 1 and 3, and between groups 2 and 3. By analyzing the erythrocyte ChEs activity, statistical differences were observed between all groups. The Figure 3 shows the influence of the disulfoton dose in the plasma and erythrocyte ChEs. The liner correlation for erythrocyte ChEs activity (*r* = 0.99) was better than that for plasma ChEs activity (*r* = 0.89), in accordance with the statistical tests. The major problem with the determination of ChEs activity is the measure of a small decrease in enzyme activity in comparison with the normal level [18]. In some cases, is practically impossible to identify alterations. Besides, the best correlations only are obtained when the ChEs activity during the exposure is compared with the pre-exposure values of the same individual.

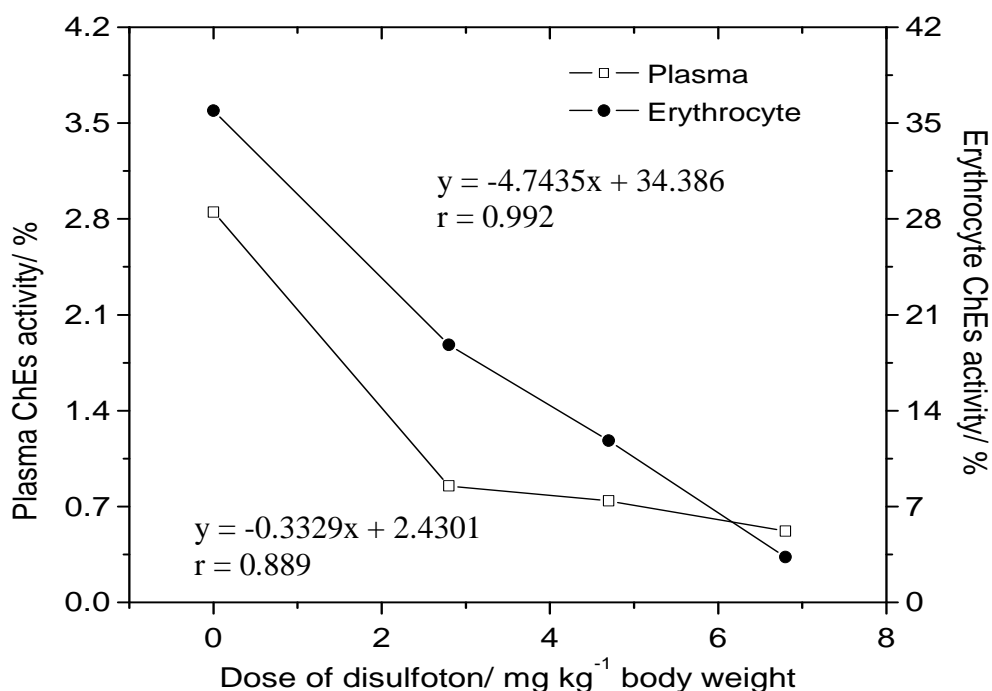


Fig.3. The influence of the disulfoton dose in the plasma and erythrocyte ChEs

The concentration of DAPs metabolites in urine has been also efficiently used as bioindicator for the exposure to OPs. A major metabolic route in mammals produces DAPs metabolites that are excreted in urine. The advantage of this approach is the specificity of the assay [18]. Therefore, we determined the concentration of the DETP and DEDTP in the urine of animals exposed to disulfoton, once that both molecules are the most important metabolites of this OP. Similarly to the data of ChEs activity, concentrations of DETP and DEDTP had normal distribution and therefore were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by application of independent *t* test. The concentrations were corrected for density [17]. The results were considered statistically significant if the *p* values were 0.05 or less. As can be seen in Table 2, there was statistical difference among all groups for both molecules. It is also possible to observe a correlation between the dose of exposure and the concentrations of DETP and DEDTP in urine (the concentrations increased when the dose was increased).

Table 2. Concentration of DETP and DEDTP in urine of rats exposed to Disulfoton in different exposure concentrations.

Treatment group	n	DETP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DEDTP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Negative Control (no exposure)	12	<LOQ	<LOQ
Group 1 (exposure to disulfoton 2.8 mg kg ⁻¹ b.w)	12	1.18±0.14 ^a	0.013±0.001 ^d
Group 2 (exposure to disulfoton 4.7 mg kg ⁻¹ b.w)	12	2.40±0.31 ^b	0.04±0.006 ^e
Group 3 (exposure to disulfoton 6.8 mg kg ⁻¹ b.w)	12	6.58±0.96 ^c	0.11±0.015 ^f

Concentration values corrected by the density expressed in ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm SD. Negative controls had values below the limit of quantification (<LOQ). a, b, c, d, e, f Values followed by different letters are significantly different by analysis of variance (ANOVA) followed by application of independent T test ($p < 0.05$).

Besides, the concentrations of DEDTP are much smaller than the concentrations of DETP. Perhaps because the DEDTP is quickly metabolized to the corresponding monosulphated and oxidized metabolites, resulting in the low levels in urine [19]. The Figure 4 shows that there is an exponential increase in the both DAPs concentration when the disulfoton dose was increased. Based on this data we realized that, in high concentrations, like other organophosphates such as chlorpyrifos, the disulfoton can causes induction of CYP2B6 followed by CYP1A2 and to a lower CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 [20].

Using only the three first points, a satisfactory linear correlation was obtained for both analytes ($r = 0.99$ and $r = 0.95$, respectively for DETP and DEDTP), attesting that there are good correlations for the low doses.

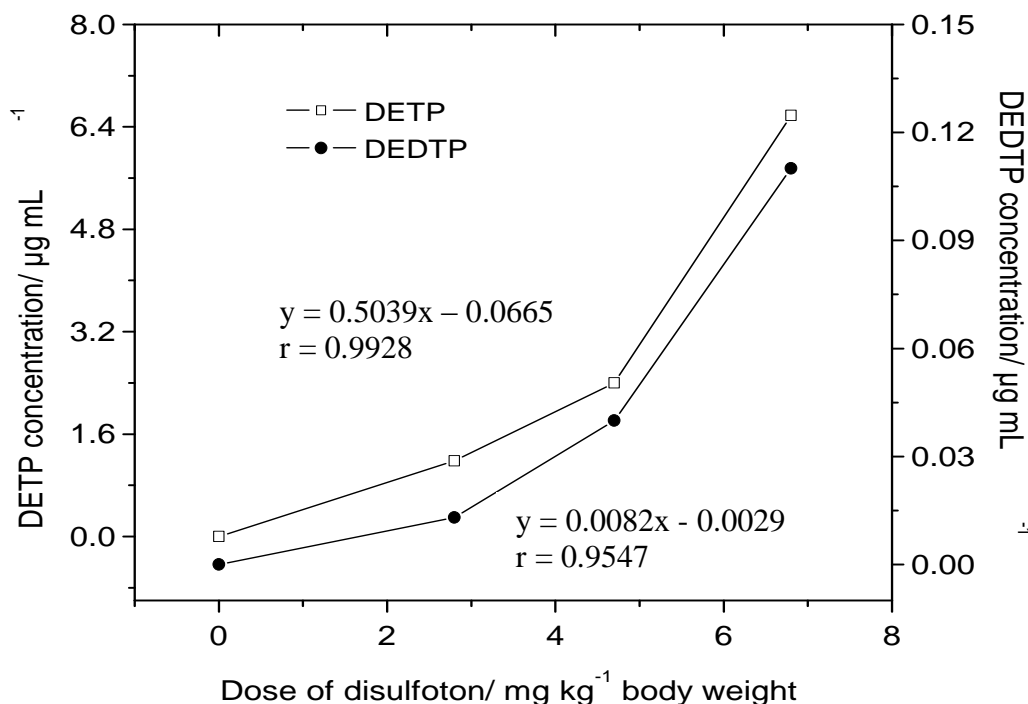


Fig.4. Correlation between the disulfoton dose exposure and the concentration of DAPs metabolites.

Finally, the mutagenic capability of disulfoton in cases of acute exposure and in high concentration was assessed analyzing the frequency of MNPCEs. For this test, a positive control group of animals (n=6) was used, which received CP to induce mutagenesis. The frequencies of MNPCEs between treated groups and their respective controls were compared using the chi-square test [10]. Table 3 shows the frequency of MNPCEs observed. The results of the groups 2 and 3 were statistically equal to each other and different of the value corresponding to the group 1. Moreover, as expected, the frequencies of MNPCEs in different concentrations of disulfoton were lower with respect to the positive control (CP) and the spontaneously generated major (negative control).

Table 3. The frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in rats exposed to Disulfoton in three concentrations.

Treatment group	N	Analyzed Cells	MN Total Number	MN bone marrow % \pm SE
Negative Control - 0.9% NaCl	12	24000	116 ^a	0,48 \pm 0,17
Positive control - CP (30 mg kg ⁻¹ b.w)	6	12000	209 ^b	1,74 \pm 0,17
Disulfoton 2,82 mg kg ⁻¹ b.w	12	24000	149 ^c	0,62 \pm 0,18
Disulfoton 4,7 mg kg ⁻¹ b.w	12	24000	288 ^d	1,20 \pm 0,20
Disulfoton 6,8 mg kg ⁻¹ b.w	12	22000	309 ^d	1,40 \pm 0,20

Values are expressed as percentual \pm SD. a,b,c,d Means within a column, followed by different letters are significantly different by Chi-Square Test ($p < 0.05$), CP= Ciclophosphamide. 2,000 analyzed cells /animal (20,000 cells/group).

The test was valid, because the positive control induced by CP was higher than the number of spontaneous mutations of the negative control. Thus, it is possible to observe that disulfoton, similarly to other OPs pesticides [21], causes mutations in the doses tested. In addition, it was also possible to observe that there was an increase in the frequency of MNPCE when the dose of disulfoton was increased, as showed in Figure 5. Moreover, a good correlation ($r = 0.98$) was obtained when a linear model was applied to the data.

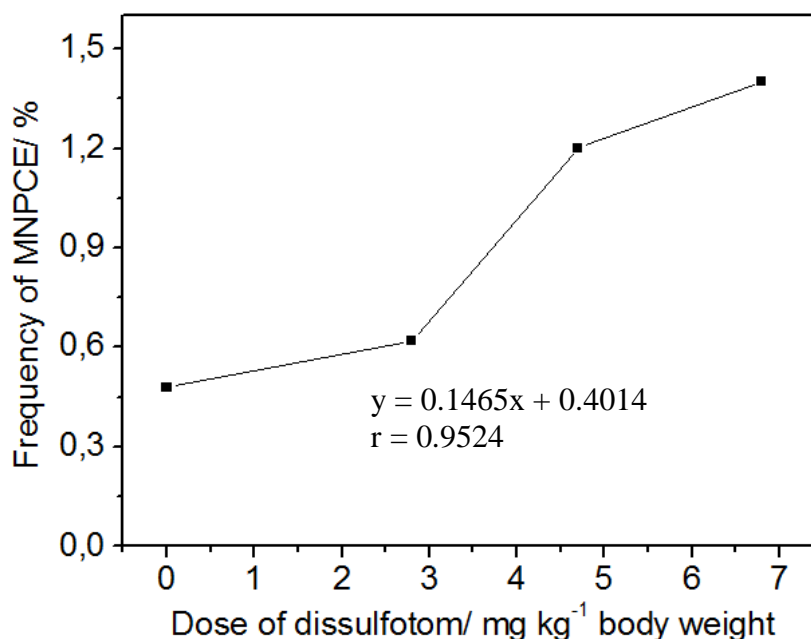


Fig.5. Correlation between the disulfoton dose exposure and the frequency of MNPCEs.

Conclusions

Both biological monitoring by the determination of urinary alkyl phosphates and blood cholinesterase activity have important roles in assessing the exposure to OPs. The traditional approach of blood ChEs measurement has well defined guidance values to help interpret results and is directly related to risk. Measurement of urinary DAPs metabolites is less invasive and logistically simpler. Although there are few guidance values for urinary DAPs, this approach can be used to assess the efficacy of control procedures and help to reduce exposure because it reflects well the relationship between exposure dose and the concentration of metabolites in urine. In this work it was possible to observe that the measuring of blood cholinesterase activity and the concentration of urinary DAPs have a good correlation with the dose of exposure to disulfoton. It is possible to suggest that, similarly to other OPs, disulfoton causes mutagenicity, even in an acute exposure. This is especially important when it comes to victims of accidental ingestion or attempted suicide.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, Brazil) - projects CDS - APQ-01323-09 and CDS - APQ-01612-10, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil) for financial support.

References

- 1 M.S. Odetokun, M.A. Montesano, G. Weerasekera, R.D. Whitehead Jr., L.L. Needham, D.B. Barr. Quantification of dialkylphosphate metabolites of organophosphorus insecticides in human urine using 96-well plate sample preparation and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2010. Article in press.
- 2 S. Yucra. K. Steenland, A. Chung, F. Choque, G.F. Gonzales. Dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus in applicators of agricultural pesticides in Majes – Arequipa (Peru). *J. Occup. Med. Toxicol.*, 2006, **1**, 27-34.
- 3 G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andrs, R. M. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 88-95.
- 4 HSE. Medical Aspects of work-related exposure to organophosphates Guidance note MS17, 1-8. Health and Safety Executive; 2000. HSE Books PO Box 1999 Sudbury Suffolk CO10 2WA.
- 5 M. Maroni, A. Fait. Health effects in man from long-term exposure to pesticides: a review of the literature. *Toxicology*, 1993, **78**, 1975-1991.

- 6 C. Wu, P. Liu, L. Zheng, J. Chen, Z. Zhou. GC-FPD measurement of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorous pesticides as pentafluorobenzyl derivatives in occupationally exposed workers and in a general population in Shanghai (China). *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 2575–2581
- 7 R. Bravo, W.J. Driskell, R.D. Whitehead Jr., L.L. Needham, D.B. Barr. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards. *J. Anal. Toxicol.*, 2002, **26**, 245-252.
- 8 G.K.H. De Alwis, L.L. Needham, D.B. Barr. Automated solid phase extraction, on-support derivatization and isotope dilution-GC/MS method for the detection of urinary dialkyl phosphates in humans. *Talanta*, 2009, **77**, 1063–1067.
- 9 M. Von Ledebur, W. Schmid. The micronucleus test: methodological aspects. *Mutat. Res.*, 1973, **19**, 109–117.
- 10 J.T. Mac Gregor, J.A. Heddle, M. Hite, B.H. Margolin, C. Ramel, M.F. Salamone, R.R. Tice, D. Wild. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.*, 1987, **189**, 103–112.
- 11 M. Watanabe, S. Honda, M. Hayashi, T. Matsuda. Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 1982, **97**, 43–48.
- 12 M. Kirsch-Volders. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 1997, **392**, 1–4.
- 13 R. Cicchetti, M. Bari, G. Argentin. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an in vivo study in mice. *Mutat. Res.*, 1999, **439**, 239–248.

14 J. Llorens, K.M Crofton, H.A Tilson, S.F Ali, W.R. Mundy. Characterization of disulfoton induced behavioral and neurochemical effects following repeated exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1993, **20**, 163-169.

15 National Library of Medicine HSDB database. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices for 2001. Cincinnati, OH. 2001.

16 M.G. Santos, R.V. Vitor, F.L. Andrade, I. Martins, E.C. Figueiredo. Molecularly imprinted solid phase extraction of urinary diethyl thiophosphate and diethyl dithiophosphate and analysis by gas chromatography mass spectrometry, 2011, submitted.

17 M.K.B. Molyneux. Use of single urine samples for the assessment of lead absorption. *Brit. J. industr. Med.*, 1964, **21**, 203-209.

18 J. Cocker, H.J. Mason, S.J. Garfitt, K. Jones. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.*, 2002, **134**, 97-103.

19 A.N. Oglobline, H. Elimelakh, B. Tattam, R. Geyer, G.E. O'Donnell, G. Holder. Negative ion chemical ionization GC/MS-MS analysis of dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in urine of non-occupationally exposed subjects. *Analyst*, 2001, **126**, 1037-1041.

20 A.C. Povey. Gene–environmental interactions and organophosphate toxicity. *Toxicology*, 2010, **278**, 294–304.

21 M. Bagchi, S. Zafra, D. Bagchi. DNA Damage, Gene Expression, and Carcinogenesis by Organophosphates and Carbamates in *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. 2005, **37**, 533-548, Hopkinsville, KY, USA.

5 CONCLUSÕES

O método baseado em extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi adequado para a análise de DETP e DEDTP em amostras de urina. Boas figuras de mérito foram alcançadas, tais como baixo LOQ, ampla faixa linear e boa precisão, exatidão e robustez. Outras características devem ser enfatizadas, tais como alta seletividade, elevado tempo de vida do cartucho de MIP, uso de pequenos volumes de amostras, possibilidade de mecanização da técnica e sua implementação em ensaios de rotina na monitorização de dialquil fosfatos em exposição ocupacional ou não-ocupacional. Tanto o monitoramento biológico de dialquil fosfatos urinários como a determinação da atividade de colinesterases sanguíneas tiveram um papel importante na avaliação da exposição ao organofosforados, tendo boas correlações com as doses de exposição. A mensuração de metabólitos urinários dialquil fosfatos é menos invasiva e logisticamente mais simples. Embora existam poucos valores de orientação para estes metabólitos, esta abordagem pode ser usada para avaliar a eficácia dos procedimentos de controle, pois reflete bem a relação entre a dose de exposição e a concentração de metabólitos na urina. Pode-se sugerir que, à semelhança de outros compostos organofosforados, o dissulfoton, é capaz de causar mutação, mesmo em uma exposição aguda. Isto é especialmente importante quando se trata de vítimas de ingestão acidental ou tentativa de suicídio.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *J. Chromatogr. B*, v. 745, p. 3-13, 2000.

ASHBY, J.; TINWELL, H. The rodent bone marrow micronucleus assay: contrast between its sensitivity to human carcinogens and its sensitivity to NTP rodent carcinogens. *Mutat. Res.*, v. 352, p. 181-184, 1996.

AZAROFF, L. S. Biomarkers of Exposure to Organophosphorous Insecticides among Farmers' Families in Rural El Salvador: Factors Associated with Exposure. *Environ. Res.*, Section A, v. 80, p. 138-147, 1999.

CHAPMAN, R. A.; TOLMAN, J. H.; COLE, C. The effect of multiple applications of disulfoton on enhanced microbial degradation in soil and subsequent uptake of insecticidal chemicals by potato plants. *J. Environ. Sci. Health.*, v. 3, p. 485-506, 1994.

CLIVE, T.; et al. *The pesticide manual (a world compendium) incorporating the agrochemicals handbook*. 10. ed. London: Crop Protections Publications. 1994, p. 1341-1349.

COYE, M. J.; LOWE, J. A.; MADDY, K. T. Biological monitoring of agricultura workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations. *J. Occup. Med.*, v. 28, p. 619-627, 1986.

DE ALWIS, G. K. H.; NEEDHAM, L. L.; BARR, D. B. Automated solid phase extraction, on-support derivatization and isotope dilution-GC/MS method for the detection of urinary dialkyl phosphates in humans. *Talanta*, v. 77, p. 1063–1067, 2009.

DIAS, A. C .B.; et al. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. *Talanta*, v. 76, p. 988-996, 2008.

DUGGAN, A.; et al. Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 37, p. 382–395, 2003.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMADUR, M. O.; DOULL, J.; KLASSEN, C. D. *Cassarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: Pergamon Press, 1996. p. 643-689.

ELLMAN, G. L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. v. 7, p. 88-95, 1961.

EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. *Hum. Exp. Toxicol.*, London, v. 14, p. 857-864, 1995.

FENECH, M.; et al. Intra- and interlaboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide scoring exercise by the HUMN project. *Mutat. Res.*, v. 534, p. 45-64, 2003.

FIGUEIREDO, E. C.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid phase extraction and fast low-pressure separation of chlorpromazine and perphenazine from urine. *Br. J. Anal. Chem.*, v. 1, p. 36-41, 2010.

FIGUEIREDO, E.C.; et al. On-line molecularly imprinted solid phase extraction for the selective spectrophotometric determination of catechol. *J. Microchem*, v. 85, p. 290-296, 2007.

HARRIS, C. R.; et al. A comparison of the persistence in a clay loam of a single and repeated annual applications of seven granular insecticides used for corn rootworm control. *J. Environ. Sci. Health*, v. 23, p. 1-32, 1988.

HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, v. 126, p. 747-756, 2001.

HAYASHI, M.; et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 35, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, v. 127, p. 129-137, 1984.

HAYES, W. J. J. Studies on exposure during the use of anticholinesterase pesticides. *Bull W.H.O.* v. 44, p. 227-288, 1971.

HEDDLE, J. A.; et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program. *Mutat. Res.*, v. 123, p. 61-118, 1983.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 808, p. 229–239, 2004.

JEYARATNAM, J.; MARONI, M. Organophosphorus compounds. *Toxicology*, Oxford, v. 91, p. 15-27, 1994.

KALOYANOVA, F. P.; EL BATAWI, M. A. Organophosphorus compounds. In: *Human toxicology of pesticides*. Florida: CRC Press, 1991. Cap. 2, p.3-4.

KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 392, p. 1–4, 1997.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, v. 455, p. 155-166, 2000.

KUGIMIYA, A.; TAKEI, H. Selectivity and recovery performance of phosphate-selective molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta.*, v. 606, p. 252–256, 2008.

LARINI, L. *Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1997. p.161-175.

LOTTI, M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.*, v. 4, p. 1814-1818, 1995.

MAC GREGOR, J.T.; et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.*, v. 89, p. 103-112, 1987.

MAGALHÃES, C.S.; et al. Strategies for sample preparation focusing on biomolecules determination/characterization. In: ARRUDA, M. A .Z. *Trends in Sample Preparation*. New York: Nova Science Publishers, 2007. p. 245-288.

MARONI, M.; et al. Organophosphorus pesticides. *Toxicology*, v. 143, p. 9-37, 2000.

MARONI, M.; FAIT, A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides: a review of the 1975-1991 literature. *Toxicology*, v. 78, p. 432-451, 1993.

MÍDIO, A. F.; SILVA, E. S. *Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos*. São Paulo: Roca Ltda, 1995. p.84.

MUTCH, P.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 11, p. 109-116, 1992.

NORPPA, H.; FALCK, G .C. M. What human micronuclei contain? *Mutagenesis*, v. 540, p. 153-163, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD guideline for the testing of Chemicals- Mammalian Erythrocyte Micronucleous Test. Disponível em :< <http://www.oecd.org/dataoecd/18/34/1948442.pdf>>. Acesso em 1 Nov. 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for the testing of chemicals: Draft proposal for a new guideline 487: In Vitro Micronucleus Test. 2004. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/60/28/32106288.pdf>>. Acesso em 1 Nov. 2011.

OLIVEIRA, A. M. Resíduos de triadimenol e dissulfoton no solo e em folhas e frutos do cafeeiro após aplicação de uma formulação granulada. 113 p. Dissertação (mestrado em agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 1999.

OLIVEIRA, S. J. J.; et al. Influência de fatores sócio econômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Rev. Saúde pública*, v. 35, p. 130-135, 2001.

ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN FOOD. Disponível em: <<http://ww.epa.gov/oppsrrd1/op/primer.htm>>. Acesso em 14 Nov. 2011.

ORTELLI, D.; et al. Restricted access materials for fast analysis of methadone in serum by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, v. 25, p. 222 – 228, 2002.

QUE HE, S. S. Biological monitoring and pesticides. In : *Biological Monitoring : an introduction*. New York : Van Nostrand Reinhold, 1993. cap. 22, p. 488-493.

SZETO, S. Y.; VERNON, R. S.; BROWN, M. J. Degradation of disulfoton in soil and its translocation in asparagus. *J. Agricult. Food Chem.*, v. 31, p. 217-220, 1983.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. *Quim. Nova*, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus Insecticides: a general introduction. *Environm. Health Crit.*, v. 63, p. 181, 1986.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol Lett*, v. 102, p. 649-652, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dissulfoton: data sheets on pesticide. Disponível em: < http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest68_e.htm>. Acesso em 1 Nov. 2011.

YUCRA, S.; et al. Dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus in applicators of agricultural pesticides in Majes – Arequipa (Peru). *Journal Occup. Med. Toxicol.*, v. 1, p. 1-8, 2006.