

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA (AChE) EN SALIVA HUMANA DE POBLACIONES EXPUESTAS A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS

Jorge Uzcátegui Nava*, Soranyel González Carrero*, Reinaldo Zambrano Vergara**, Ana Pereira Colls***.

* Laboratorio de Investigación en Físico-Química Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

** Grupo Multidisciplinario de Investigaciones Odontológicas. Departamento de Odontología Preventiva y Social. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes.

*** Grupo de Investigaciones Comunitaria y Social. Departamento de Medicina Preventiva y Social. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. E-mail: jorevzca@ula.ve.

RESUMEN

Existe gran número de comunidades rurales que usan los plaguicidas con propósitos agrícolas, lo cual ha incrementado el riesgo de intoxicación de los agricultores y sus familias. En respuesta a la necesidad de controlar la exposición a los plaguicidas mediante un método no invasivo, de bajo costo y de auto administración se llevó a cabo la validación del método de Ellman para determinar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y su inhibición debido a plaguicidas organofosforados y carbamatos en muestras de saliva humana. Se analizaron 60 muestras de saliva de trabajadores del campo mayores de 8 años de edad residentes en la comunidad de El Paramito de Timotes Municipio Miranda, estado Mérida. Fueron optimizadas las condiciones necesarias para medir la actividad de la enzima AChE tales como tratamiento y volumen de la muestra, concentración de los reactivos y efectos interferentes. Se comprobó que la saliva puede ser usada como indicador biológico para la determinación de la inhibición de la enzima AChE; por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos. El método validado permitió determinar la actividad y los niveles de inhibición de la enzima AChE relativa a la intoxicación con plaguicidas organofosforados y carbamatos en saliva humana de manera rápida, con alta especificidad, precisión y bajo costo.

Palabras Clave: método *de* Ellman, plaguicidas, saliva humana, agricultores.

VALIDATION OF AN ANALYTIC METHOD TO DETERMINE THE ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME (AChE) IN HUMAN SALIVA OF POPULATIONS EXPOSED TO ORGANOPHOSPHATE AND CARBAMATE PESTICIDES.

ABSTRACT

There are many rural communities who use pesticides for agricultural purposes, that use has increased the risk of poisoning of the farmers and their families. In response to the need to control exposure to pesticides through a non-invasive, low-cost and auto administered method

the validation of the Ellman is method was performed to determine the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) due to organophosphate and carbamate pesticides in human saliva samples. Sixty samples of saliva of the field workers over the age of eight years old were analyzed. In the study were the necessary conditions to measure the activity of the AChE such as treatment and volume of the sample, concentration of the reactants and unwanted effect optimized. It was observed that saliva can be used as a biological indicator for the determination of inhibition of the AChE for exposition to organophosphate and carbamate pesticides. The validated method allowed researchers to determine the activity and the levels of inhibition of the enzymes relative to poisoning with the aforementioned pesticides in human saliva in a fast way, with high level of specificity, precision and at low cost.

Key words: Ellman´s method, pesticides, human saliva, farmers.

Introducción

La actividad agrícola se ve afectada por una gran diversidad de plagas y malas hierbas que hacen improductivas las cosechas de frutos y vegetales. Para combatirlas, el hombre ha introducido compuestos agroquímicos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, bactericidas y fumigantes que generan desequilibrios ecológicos trayendo como consecuencia el aumento de enfermedades asociadas en los animales y seres humanos.

En las últimas décadas el uso de plaguicidas organofosforados (OPs) y carbamatos (Cs) se ha incrementado drásticamente en todo el mundo, principalmente en los países en desarrollo, por lo cual se ha enfatizado en la búsqueda de métodos analíticos que permitan la detección de estos compuestos en fluidos biológicos. Los métodos analíticos existentes están basados en técnicas cromatográficas, tales como la cromatografía de gases (GC) (1,2), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (3-6) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (7,8). Estas técnicas no siempre pueden ser usadas de manera periódica y accesible debido a la complejidad de sus instrumentos y al tiempo que se requiere para la preparación de las muestras. Se hace necesario

entonces, la utilización de métodos simples y rápidos para la detección de estos compuestos en fluidos biológicos.

El mecanismo de acción primario de los plaguicidas OPs y Cs en el organismo es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que causa la subsiguiente acumulación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis colinérgica, resultando en un amplio rango de efectos neurotóxicos (muscarínicos, nicotínicos y neurológicos). Basándose en este efecto, el monitoreo de la exposición a plaguicidas OPs y Cs ha sido enfocado en la determinación de la actividad de las enzimas colinesterasas, desarrollándose así métodos analíticos como el método de Ellman, Rappaport, Michel, Lovibond, etc, (9-15) los cuales lo hacen a través reacciones químicas coloreadas o cambios de pH.

El método de Ellman y modificaciones, es el método de uso común para la determinación de la actividad de AChE y butirilcolinesterasa (BUChE) en plasma y eritrocitos sanguíneos. Con este método se analiza la velocidad de hidrólisis de ester de colina por las enzimas colinesterasas, lo cual produce tiocolina que forma un complejo con el ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico, que absorbe radiación en el rango de 400 a 420 nm.

A pesar de todos los esfuerzos realizados, el uso de sangre sigue teniendo inconvenientes, debido a que muchas veces no es posible hacer seguimientos a los individuos expuestos, ya que la sangre requiere una técnica de colección invasiva y los trabajadores se rehúsan a estos análisis, lo cual constituye una limitación. Por esta razón, se han venido estudiando el potencial de diferentes fluidos biológicos como el sudor, saliva, leche materna (17), y lágrimas, entre otros (18), que permitan brindar información de diferentes enfermedades y realizar un diagnóstico eficaz, siendo la saliva propuesta como un fluido ideal que puede sustituir la sangre como matriz de análisis.

Diferentes estudios, indican que la saliva está compuesta por una mezcla de AChE y BuChE. Ryhanen et al., encontraron que la actividad de BuChE por el método de Ellman, es de un 70-90% de la actividad total de colinesterasas en saliva, en presencia de varios inhibidores (20). Estudios más recientes encontraron resultados similares, que favorecen el uso de saliva como medio diagnóstico (7,21).

En un estudio realizado para determinar la actividad y farmacocinética de la colinesterasa en saliva de ratas, como un biomarcador biológico para la exposición a plaguicidas por el método de Ellman, se encontró que, en comparación con plasma y cerebro, la actividad de colinesterasa en saliva es inhibida en un porcentaje mayor al 95%, en presencia de inhibidores selectivos de AChE y BuChE con diferentes sustratos (12). Análogamente, resultados de un estudio para determinar el efecto del malatión sobre la actividad de colinesterasa en saliva y plasma de ratas, por el método de Ellman, indican que la exposición a este OPs disminuye la actividad de la enzima AChE de forma significativa en ambos fluidos, siendo la actividad en saliva la más afectada, considerándose de esta manera la saliva como una alternativa ante el análisis de plasma para el monitoreo de la toxicidad de organofosforados. (19)

Si bien la saliva se ha utilizado en la detección de muchas entidades, su uso como medio diagnóstico para la intoxicación por plaguicidas OPs y CS no ha sido estudiado extensamente, por lo que representa un método novedoso. Atendiendo a la necesidad de controlar y evaluar la exposición a estos plaguicidas, la presente investigación, tiene como objetivo validar el método de Ellman para la determinación de los niveles de actividad de la enzima AChE en muestras de saliva humana total.

Materiales y métodos

Población y muestra

La población está constituida por 87 personas que conforman 18 familias. La mayoría de ellas se encuentran dedicadas a la agricultura. El tamaño de la muestra se determinó por el teorema del Límite Central e Intervalos Confiables (12), el cual fue estimado en 60 personas. La recolección de las muestras de saliva se realizó por esputo, en un envase colector estéril. Las mismas se trasvasaron a un tubo de ensayo plástico con tapa, y se transportaron en un baño agua-hielo-sal, hasta el lugar donde fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C hasta el momento del análisis. Se tomaron un total de 60 muestras de saliva de personas de diferentes géneros, pertenecientes a la población de El Paramito de Timotes, estado Mérida. Se utilizó como criterios de selección individuos mayores de 8 años de edad, que realizan trabajos en el campo, o que están expuestos a plaguicidas OPs y Cs en forma indirecta. No se excluyeron del análisis mujeres gestantes, en periodo menstrual, o individuos con algún tratamiento farmacológico.

1. Procedimiento para la optimización de las condiciones de análisis de la enzima AChE en saliva

Durante la aplicación inicial del método de Ellman para la determinación de la acti-

vidad de la enzima AChE, se hizo necesaria la optimización de los siguientes parámetros:

pH. Se trabajó con un buffer fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7.4.

Presión osmótica. Se analizaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio, entre 0,05 M y 0,50 M, para ello se mantuvo fijo las concentraciones de todos los reactivos y se varió la concentración de sal en el medio final de reacción.

Temperatura. Se trabajó a temperatura ambiente.

Toma de espectros. Se tomó el espectro de absorción de los reactivos a diferentes concentraciones en un intervalo de longitud de onda entre 300 y 600 nm. En el caso del sustrato cloruro de acetilcolina se tomaron los espectros en el rango de concentración entre 0.4 mM y 2.0 mM, y entre 0.10 mM y 0.50 mM para el indicador ácido 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoico).

Efecto de la concentración de Indicador. Se evaluaron concentraciones de indicador comprendidas entre 0.1 y 0.5 mM, manteniendo constante la concentración de sustrato (0.6 mM) y de enzima (2 U/L), en buffer fosfato pH 7.4 (0.9 % NaCl), a temperatura ambiente. Los cambios de absorbancia se midieron a 405 nm durante 5 minutos.

Efecto de la concentración de Sustrato. Se analizaron diferentes concentraciones del compuesto cloruro de acetilcolina en el intervalo de concentración de 0.25 mM a 2.00 mM, manteniendo constante la concentración del indicador DTNB (0.25 mM), de enzima (2 U/L) y de los demás parámetros.

Tratamiento y efecto del volumen de muestra de saliva. Para evaluar el efecto de volumen de muestra de saliva se tomó una muestra de saliva, de un mismo individuo y se sometió a diferentes tratamientos. Se analizaron diferentes alícuotas de muestra de saliva sin tratamiento, filtrada y centrifugada. En la muestra de saliva *sin tratamiento*, se tomó la muestra

se homogenizó por agitación en vortex durante varios minutos, y se tomaron diferentes volúmenes de muestra (100 a 800 μL), se diluyeron en solución buffer pH 7.4 (0.9% NaCl), agitando durante 2 minutos, posteriormente se adicionaron los reactivos correspondientes. En la muestra de saliva *filtrada*, se tomó la muestra homogenizada por agitación en vortex y se hizo pasar a través de un filtro minisart SRP 15 (0.20 μm). Se tomaron diferentes alícuotas del filtrado (100 a 500 μL) y se diluyeron en solución buffer pH 7.4, 0.9 % NaCl. En la muestra de saliva *centrifugada*, se tomó la muestra de saliva y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm, 4 °C, se analizaron varias alícuotas del sobrenadante (0,3 a 1.0 mL) de la misma forma que en los casos anteriores.

Posteriormente, se evaluó el efecto de las concentraciones y condiciones establecidas en el análisis del complejo ácido 2-nitro-5-tiocolina. Para ello se tomó el espectro de absorción del complejo, entre 300 y 600 nm, partiendo de la enzima acetilcolinesterasa de anguila eléctrica, y de una muestra de saliva con el fin de determinar máximo de absorción y si existe alguna interferentes por parte del indicador.

2. Procedimiento para la determinación del efecto de sustancias interferentes

Optimizadas todas las condiciones necesarias para aplicar el método de Ellman en muestras de saliva, se evaluó el efecto de sustancias interferentes sobre la determinación de la actividad de la enzima, tales como:

Alcohol. Para evaluar el efecto de la concentración de alcohol sobre la actividad de la enzima AChE en saliva, se tomó una muestra de saliva y se le agregó diferentes alícuotas de etanol 95 % (v/v). Los cambios de absorbancia se midieron por triplicado a 405 nm durante 5 min.

Café y chimo. El efecto del consumo de café y chimo se evaluó tomando una mues-

tra de saliva de dos individuos sanos que habían consumido café y chimo 30 minutos antes de la toma de la muestra. Se había tomado previamente una muestra de saliva a los mismos individuos sin ningún tipo de interferente. Las muestras de saliva se descongelaron y centrifugaron. Los cambios en la absorbancia se midieron a 405 nm durante 5 minutos por triplicado.

3 Procedimiento para la determinación del efecto de plaguicidas OFs y Cs sobre la actividad de la enzima AChE:

El efecto de la concentración de inhibidor sobre la actividad de la enzima AChE se evaluó a través de soluciones diluidas de mezclas de plaguicidas organofosforados y carbamatos (0-100 ppm), y de plaguicidas individuales metil-paratión (0-100 ppm) y carbofuran (0-100 ppb), usando para ello una solución de acetilcolinesterasa de anguila eléctrica con una actividad de 3 U/L.

Resultados y Discusión

1. Condiciones de análisis establecidas para la determinación de la actividad de la enzima AChE en saliva

Dentro de los parámetros variables que se optimizaron se encuentra la presión osmótica, la concentración de indicador, la concentración de sustrato, y el volumen de muestra. Dentro de las variables que se dejaron fijas se encuentra el pH y la temperatura.

El pH del medio se fijó en 7.4, usando para ello un buffer fosfato, de acuerdo con la bibliografía consultada para el desarrollo de esta investigación [9-22]. El buffer contenía además una concentración de cloruro de sodio de 0.155 M (0.9 %), la cual se escogió analizando el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en la mezcla final de reacción (figura 1), al observar que en ausencia de sal, los cambios de absorbancia por minuto y

la difusión del complejo eran muy irregulares. Se descartaron concentraciones salinas mayores a 0.155 M, debido a que aumenta la desnaturalización de la enzima con el tiempo, disminuyendo su actividad progresivamente.

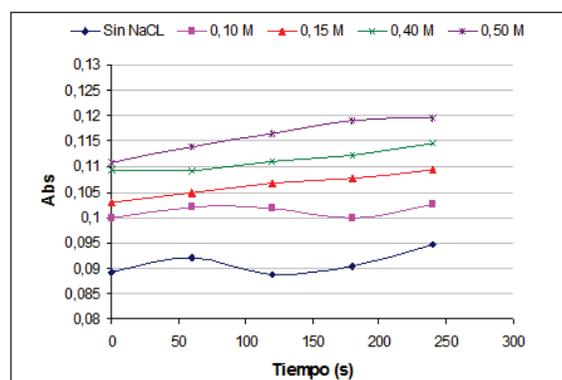


Figura 1. Efecto de la concentración de NaCl en la medida de la actividad de la enzima AChE.

Experimentalmente se trabajó a temperatura ambiente a fin de aplicar el método propuesto en determinaciones rutinarias de campo, donde muchas veces no es posible controlar la temperatura.

Espectros de absorción

Considerando que el método de Ellman se puede llevar a cabo en un rango de longitud de onda entre 400 y 420 nm, se tomaron los espectros de absorción de cada uno de los reactivos, a diferentes concentraciones, para determinar los rangos de máxima absorción de los mismos. De los espectros de absorción tomados solo el indicador (ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB), presenta una absorción considerable en el intervalo de longitud de onda analizado.

Efecto de la concentración del indicador DTNB

En efecto de la concentración de indicador sobre la actividad de la enzima se muestra

la figura 2, en esta se observa que los cambios de absorbancia más lineales se obtienen a concentraciones entre 0.1 a 0.3 mM, a concentraciones mayores los cambios de absorbancia por minuto disminuyen, afectando la velocidad de la reacción. Se escogió para los análisis una concentración de indicador de 0.25 mM, la cual es óptima para el análisis y no presenta interferencia en los espectros de absorción.

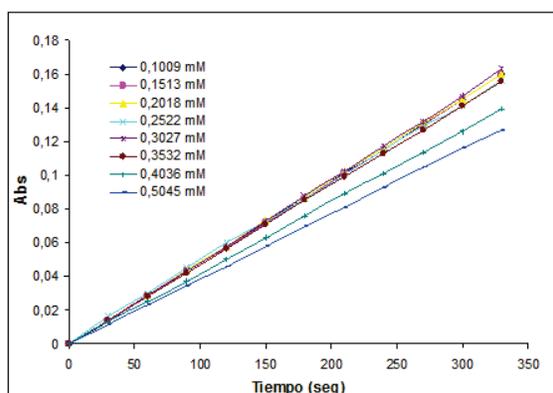


Figura 2. Efecto de la concentración de indicador DTNB sobre la determinación de la enzima AChE.

Efecto de la concentración de sustrato acetilcolina

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima, figura 3, revela que al aumentar la concentración de sustrato aumenta la actividad de la enzima AChE, con máxima hidrólisis a una concentración 2 mM de sustrato. Sin embargo, se escogió una concentración de 1.0 mM ya que a partir de esta concentración se obtienen valores de actividad similares, y además disminuye la hidrólisis espontánea del sustrato, la cual aumenta a concentraciones mayores.

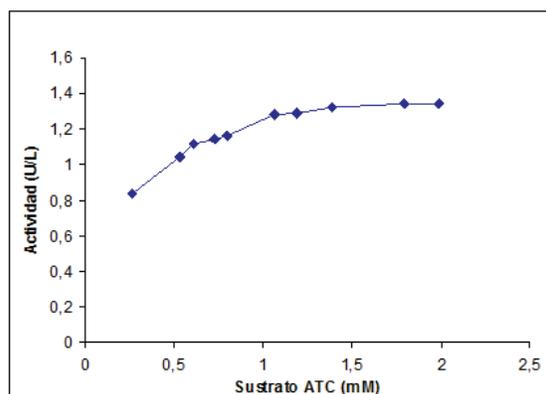


Figura 3. Efecto de la concentración de sustrato acetilcolina sobre la actividad de la enzima AChE.

Tratamiento y efecto del volumen de muestra

En la figura 4, se compara la medida de actividad de la enzima AChE en la muestra de saliva analizada, obsérvese como dependiendo del tratamiento realizado se obtienen diferentes valores de actividad, siendo el valor más alto el obtenido al centrifugar la muestra de saliva, por lo cual se escogió un volumen de 1 mL de saliva centrifugada como óptimo para el análisis.

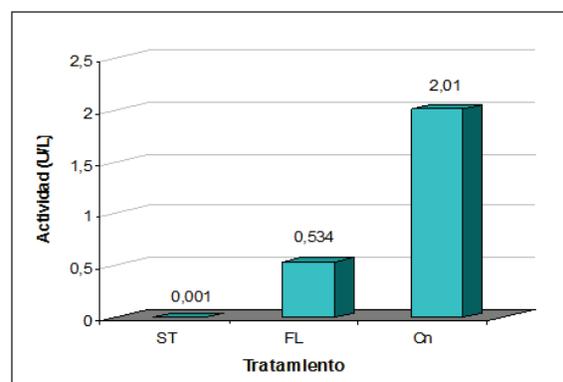


Figura 4. Determinación de la actividad de la enzima AChE en una muestra de saliva de un mismo individuo bajo diferentes tratamientos. a) ST. Sin tratamiento, b) Fil. Filtrada, c) Cn. Centrifugada.

Análisis del complejo ácido 2-nitro-5-tiocolina

Una vez establecidas las condiciones para el análisis de la enzima, se tomó el espectro de absorción del complejo a analizar, ácido 2-nitro-5-tiocolina, para comprobar que las condiciones eran las más adecuadas, usando para ello un patrón de enzima de anguila eléctrica y una muestra de saliva. En ambos casos se determinó un máximo de absorción del complejo a una longitud de onda comprendido entre de 405 y 412 nm, según se observa en la figura 5 y 6.

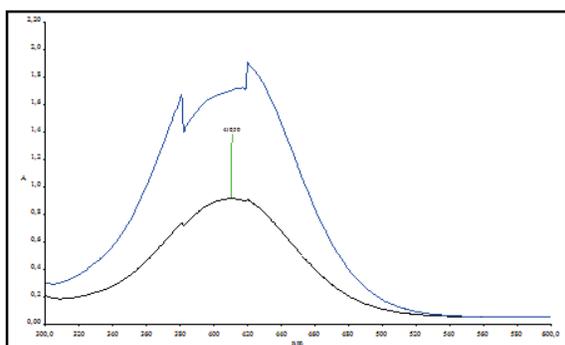


Figura 5. Espectro del complejo ácido 2-nitro-5-tiocolina, en dos etapas diferentes de la reacción, donde se observa una máxima absorción entre 405 y 412 nm. (Concentraciones: Buffer fosfato pH 7.4 (0.9% NaCl), 1.125 mM de ATC, 4250 U/L de enzima de anguila eléctrica, y 0.25 mM de DTNB).

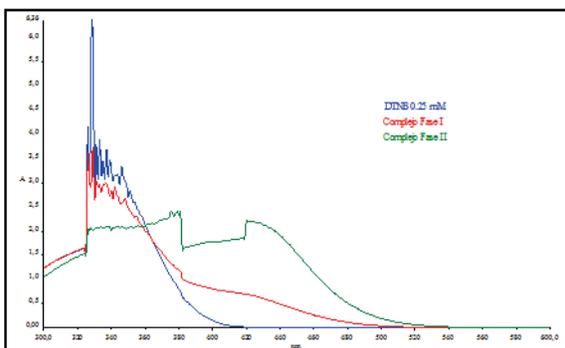


Figura 6. Espectro del complejo, en dos etapas diferentes de la reacción, formado a partir de una muestra de saliva como fuente de enzima AChE. (ATC 1.02 mM, DTNB 0.25 mM)

Estos resultados muestran que no existe interferencia por parte de los reactivos ni de los otros parámetros establecidos en el análisis de la enzima AChE en muestras de saliva. Las condiciones establecidas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de análisis establecidas experimentalmente para determinar la actividad de la enzima AChE en muestras de saliva.

Parámetro	Condición.
Temperatura	Ambiente
pH	Buffer fosfato 7.4
Fuerza Osmótica	0.155 M (0.9 %) NaCl
Concentración DTNB	0.25 mM
Concentración de ATC	1.0 mM
Volumen de Muestras	1,0 mL Saliva centrifugada.

Validación del método analítico

Para validar el método de Ellman en saliva, se utilizó un patrón de la enzima AChE de anguila eléctrica. Diferentes parámetros analíticos fueron evaluados en muestras de saliva de personas no expuestas. La precisión del método se evaluó analizando repetidamente ($n=5$) una muestra de saliva, bajo las mismas condiciones en un mismo día, por el mismo analista y en el mismo equipo. Los resultados presentan una desviación estándar relativa de 1.79 %. La linealidad del método se comprobó analizando diluciones de la enzima AChE de anguila eléctrica en un intervalo de actividad entre 0.4 y 6,0 U/L. La ecuación lineal obtenida fue $y = 0.9682x - 0.00409$, con un coeficiente de correlación de 0.995. El método presenta además un límite de detección y cuantificación de 0.1289 U/L y 0.4298 U/L respectivamente.

Efecto de sustancias interferentes

En el estudio del efecto de sustancias interferentes sobre la medida de la actividad de la enzima AChE en saliva, los resultados muestran que la actividad de la enzima no varía sig-

nificativamente al aumentar la concentración de alcohol en saliva, los valores de actividad determinados presentan un coeficiente de variación de 0.81 % en presencia de concentraciones variables de etanol.

La presencia de café y chimo en las muestras de saliva disminuye la sensibilidad del método (figura 7). Visualmente no se observa con detalle la formación del complejo de color amarillo debido a la presencia del color proveniente del café y chimo en las muestras, las cuales a pesar de ser tratadas previamente conservan parte de la coloración producto del consumo de los mismos. Para evitar este tipo de interferentes, se recomienda evitar el consumo de café y chimo, por lo menos 3 horas antes de la toma de las muestras de saliva.

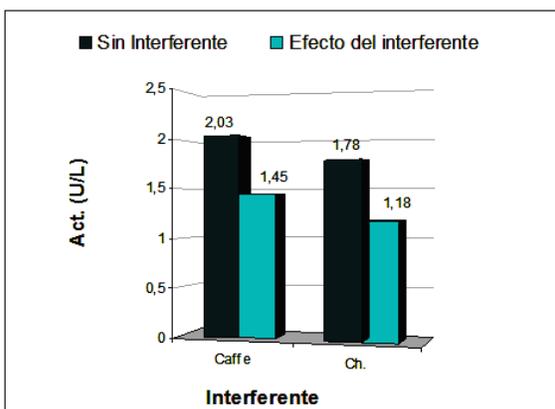


Figura 7. Efecto de la presencia de café y chimó en muestras de saliva, sobre la actividad de la enzima AChE.

Efecto de la concentración de inhi-bidor

En cuanto al efecto de la concentración de plaguicidas OFs y Cs sobre la actividad de la enzima AChE, se obtuvo que a una concentración de 60 ppm de la mezcla, tanto de plaguicidas organofosforados como de carbamatos, el porcentaje de inhibición de la enzima AChE es aproximadamente 80 %, en una solución con

una actividad de 3 U/L de la misma (figura 8). Estos resultados indican que bajas concentraciones de plaguicidas afectan considerablemente la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el organismo.

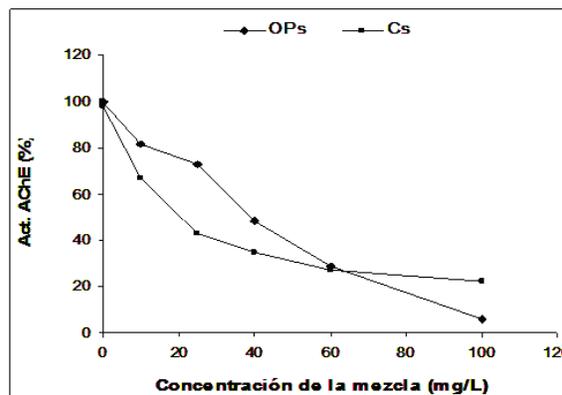


Figura 8. Efecto de una mezcla de organofosforados y carbamatos sobre la actividad de la enzima AChE. (ATC 1.074 mM, DTNB 0.269 mM)

En el caso de plaguicidas individuales, se determinó que el plaguicida metil-paratión, en una concentración de 67 ppm, produce una inhibición de la enzima AChE del 64 % (figura 9), mientras que el plaguicida carbofuran, a una concentración de tan solo 60 ppb, produce un porcentaje de inhibición del 84 % (figura 10).

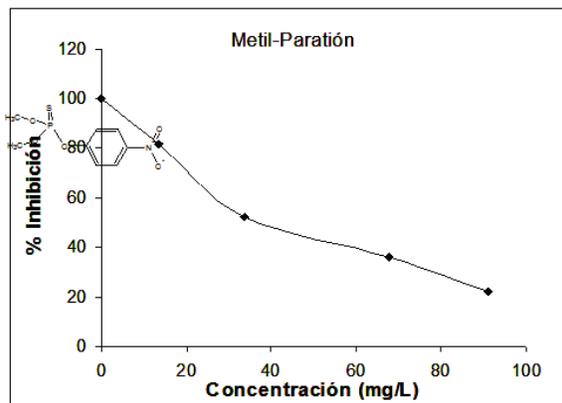


Figura 9. Efecto del plaguicida metil-paratión sobre la actividad de la enzima AChE. (0-100 ppm).

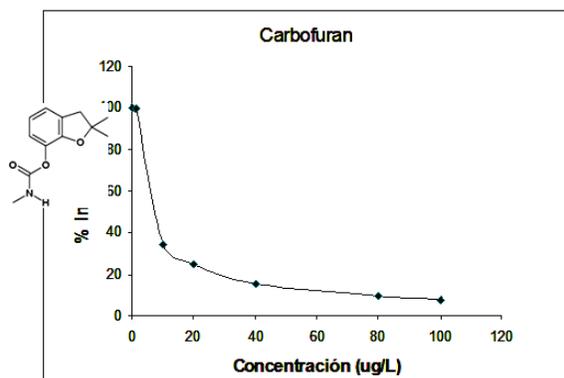


Figura 10. Efecto de la concentración del plaguicida carbofuran sobre la actividad de la enzima AChE. (0-100 ppb).

La diferencia en el efecto sobre la actividad del enzima observado entre ambos plaguicidas, se debe a las diferencias estructurales de los compuestos químicos considerados, lo cual va a determinar la afinidad del plaguicida por la enzima AChE, desplazando con mayor o menor facilidad el sustrato acetiltocolina.

Conclusiones

El método desarrollado permite la determinación de los valores de actividad de la enzima acetilcolinesterasa en muestras de saliva total. Se comprobó que la saliva puede ser usada como indicador biológico para la determinación de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos.

No se observó un efecto significativo de la presencia de alcohol (etanol) en las muestras de saliva sobre la determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, mientras que la presencia de café y chimo afecta la sensibilidad del método para la determinación de la actividad de la enzima en saliva.

Se observó que los plaguicidas organofosforados y carbamatos, tanto en mezclas como de forma individual, afectan significativamente

los valores de actividad de la enzima acetilcolinesterasa en saliva, produciendo porcentajes de inhibición de la enzima de 80 % a concentraciones menores a 100 ppm de plaguicida.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el análisis de la enzima acetilcolinesterasa en saliva, por el método desarrollado en esta investigación, permite establecer efectos relacionados con la exposición de plaguicidas organofosforados y carbamatos.

Referencias

1. Kousba A, Poest T. Characterization of the in vitro kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: A potential biomonitoring matrix. *Toxicology* 188. 2003:219-232
2. Mohammad A, Kamal Qian-Sheng Y. Kinetic analysis of the inhibition of human Butyrylcholinesterase with cymserine. *Biochemical et Biophysics Acta* 1760. 2006: 200–206.
3. Plitarchi AE. Tesis doctoral: Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humana. Química analítica. Universitat Jaume. España. 2001.
4. Heleni T, Georgios T. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *Journal of Chromatography B* 822. 2005:194–200
5. Jun U, Isao S. Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites organophosphorus pesticides using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 832. 2006: 58–66.
6. Akira N, Yoshirau U. Direct colorimetric method for determination of Organophosphates in human urine. *Clinica Chimica Acta* 291. 2000: 9-18.
7. Finer Y, Santerre J P . Salivary esterase activity and Its association with the biodegradation of dental. *J Dent Res* 83. 2004 (1):22-26.
8. Mutch E, Blain PB. The role of metabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicology Letters* 107. 1999:177- 187.
9. Abdollahi M, Mostafalou S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137. 2004: 29-34.
10. Jaffe MJ, Riov J. Cholinesterases from plant tissues. Purification and characterization of a cholinesterase from mung bean roots. *Plant Physiol.* 1973 (51): 520-528.
11. Donovan DA, Zinkl JG. Modifications of a cholinesterase method for determination of erythrocyte cholinesterase activity in wild mammals. *Journal of Wildlife Diseases.* 1994,30(2):234-240.
12. Ramos LD, Ferrary M. Determinación sérica de acetilcolinesterasa en personal involucrado en el almacenamiento, venta y distribución de plaguicidas. Dirección General de Salud centro de estudios y control de contaminantes / CESCO. Tegucigalpa, Honduras. 1991
13. Magnottl R, Eberly JB. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clinical chemistry.* 1987; 33(10) 1731-1 735.
14. Protocolo: examen de salud para aplicaciones de plaguicidas. Departamento de salud ocupacional y contaminación ambiental instituto de salud pública de Chile. 2004.
15. Pineda J. Plaguicidas: Monitoreo efectivo de la exposición a carbamatos y organofosforados. *Ciencia y trabajo.* Año 9. octubre/diciembre 2007.
16. Cotos M, Palomino OM. Tesis de pregrado: Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la Acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2002.
17. Jaraczewska K, Lulek J, Covaci A. Distribución of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Science of the Total Environment* 372. 2006: 20–31

18. Jurgén A. Ulrich E. Michael W. Human biomonitoring: State of the art. *Environ. Health* 210 .2007: 201–228
19. Kousba A, Poest T. Characterization of the in vitro kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: A potential biomonitoring matrix. *Toxicology* 188. 2003: 219-232
20. Ryhanen E P. SeudoCholinesterase and activity Its in human oral origin fluid. *J Dent. Res.* 1983;62 (1):20-23
21. Abdollahi M, Balali-Mood M. A survey of cholinesterase activity in healthy and organophosphate exposed populations. Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy.
22. Arquitectura ecológica. Proyecto piloto de vivienda y ambiente dirigido a la comunidad indígena de El Paramito, Etnia Timote. Recuperado el 29 de junio de 2007 en: http://cinviv.ula.ve/publicaciones/tesis/tesis_arq_eco/memoria%20descriptiva.pdf
23. Suelos y ríos sucumben por exceso de plaguicidas. Publicado por diario el viernes 16 de septiembre 2005. Recuperado el 25 de mayo de 2007 en: <http://www.diariofrontera.com>