

Organofosfatni insekticidi: toksični efekti i bioanalitički testovi za evaluaciju toksičnosti tokom procesa degradacije

Mirjana B. Čolović¹, Danijela Z. Krstić², Vesna M. Vasić¹, Aleksandra M. Bondžić¹, Gordana S. Ušćumlić³, Slobodan D. Petrović^{3,4}

¹Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za fizičku hemiju, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za hemiju u medicini, Beograd, Srbija

³Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

⁴Hemofarm koncern, Vršac, Srbija

Izvod

U ovoj studiji je dat pregled bioanalitičkih tehnika za procenu toksičnosti i detekciju organofosfatnih insekticida i proizvoda njihove degradacije koji nastaju tokom unapređenih procesa oksidacije za uklanjanje insekticida iz vode. Posebna pažnja je posvećena acetilholinesteraznim bioesejima, koji se zasnivaju na inhibiciji enzimske aktivnosti, za detekciju neurotoksičnih jedinjenja formiranih tokom degradacije organofosfata u oksidacionim procesima za prečišćavanje voda, kao i testiranju genotoksičnosti organofosfatnih insekticida i proizvoda njihove transformacije. Opisan je i mehanizam toksičnog delovanja organofosfatnih jedinjenja kao specifičnih inhibitora acetilholinesteraze, enzima koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina u holinergičkim sinapsama.

Ključne reči: organofosfatni insekticidi, acetilholinesteraza, degradacija, unapređeni procesi oksidacije, bioeseji, toksičnost, genotoksičnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

STRUČNI RAD

UDK 632.951:615.9:544:6

Hem. Ind. 67 (2) 217–230 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120323060C

PESTICIDI – DEFINICIJA I PODELA

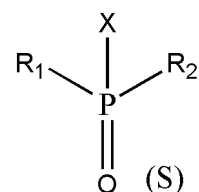
Pesticid je jedinjenje ili smeša jedinjenja namenjena za sprečavanje, uništavanje, odbijanje ili ublažavanje štetočina [1]. Pesticidi mogu da se klasifikuju prema organizmu na koji deluju (*target organism*), hemijskoj strukturi i fizičkom stanju. Najčešća podela pesticida je prema njihovoj nameni, odnosno organizmu na koji deluju na:

- insekticide – sredstva za suzbijanje štetnih insekata,
- fungicide – sredstva za suzbijanje gljiva,
- baktericide – sredstva za suzbijanje bakterija,
- herbicide – sredstva za suzbijanje korova i
- regulatore rasta biljaka [2].

ORGANOFOSFATNI INSEKTICIDI

Organofosfat je opšte ime za tioestre i estre fosforne kiseline (slika 1). U zdravstvu i poljoprivredi, reč „organofosfati“ odnosi se na grupu insekticida ili nervnih agenasa koji inhibiraju acetilholinesterazu (AChE, EC 3.1.1.7), enzim koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina (ACh) (slika 2) u holinergičkim sinapsama u centralnom i perifernom nervnom sistemu [3–7].

Simptomi akutnog trovanja organofosfatima, prouzrokovano inhibicijom AChE koja dovodi do akumulacije ACh su: glavobolja, opšta slabost i umor, znojenje, pojačano lučenje pljuvačke, grčevi u stomaku, drhtanje ruku, grčenje mišića, gubitak svesti. Otežano učenje, smanjena fizička koordinacija, problemi u ponašanju dece dovedeni su u vezu sa korišćenjem insekticida hlortpirifosa, kao i povećan rizik od Alchajmerove bolesti [8,9]. Hronično izlaganje niskim dozama ovih jedinjenja pokazalo se kao faktor uzroka raznih bolesti nervnog i imunog sistema [6,10–13].



Slika 1. Opšta strukturna formula organofosfata.
Figure 1. General structural formula of organophosphates.

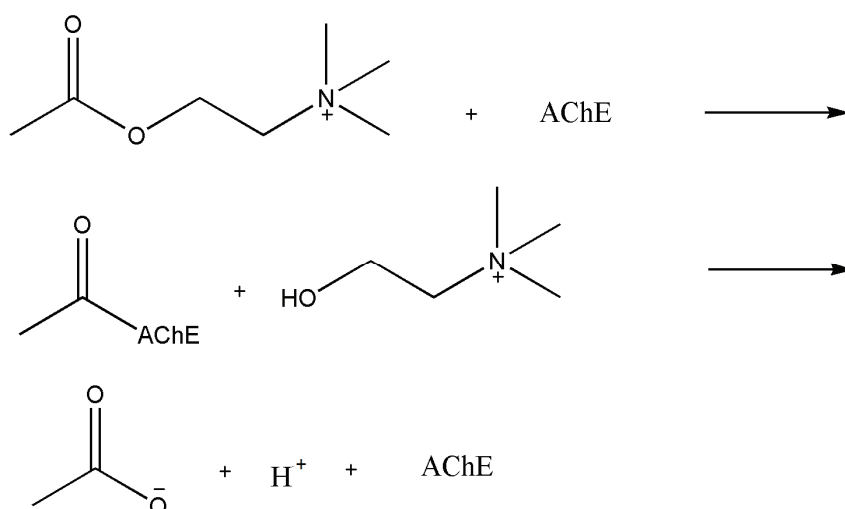
Organofosfati ulaze u aktivno mesto enzima, 2 nm duboki žleb sa serinom na dnu koji sa histidinom i glutaminskom kiselinom čini katalitičku trijadu (estarsko mesto) koja vrši katalitičku funkciju enzima omogućujući nukleofilni napad na ACh i hidrolizu nakon toga (slika 2) [14]. Kao u acetilovanju, insekticid se razlaže i fosforiluje enzim kovalentno se vezujući za OH grupu serina. Razlika u ponašanju supstrata i inhibitora je u tome da dok acil enzim brzo hidrolizuje i regeneriše se do slobodnog enzima, defosforilacija je veoma spora.

Prepiska: M. Čolović, Laboratorija za fizičku hemiju, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, M. Petrovića 12–14, p.pr. 522, 11001 Beograd, Srbija.

E-pošta: colovicm@vinca.rs

Rad primljen: 23. mart, 2012

Rad prihvaćen: 4. jun, 2012

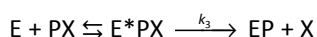


Slika 2. Mehanizam hidrolize acetilholina katalizovane acetilholinesterazom (AChE).

Figure 2. Mechanism of acetylcholine hydrolysis catalyzed by acetylcholinesterase (AChE).

Kako fosforilovani enzim ne može da hidrolizuje neurotransmiter (ACh) dovodeći do njegovog nakupljanja, post-sinaptička membrana ostaje depolarizovana i sinaptička transmisija ne funkcioniše [15].

Mehanizam inhibicije AChE organofosfatnim jedinjenjima može se predstaviti sledećom reakcionom šemom:



gde je E – enzim, PX – organofosfat, E*PX – reverzibilni enzim-inhibitor kompleks, EP – fosforilovani enzim, X – odlazeća grupa organofosfata [16].

Ireverzibilna inhibicija, kao što je prikazano, odvija se u dva stupnja; prvi je brza, kratkotrajna reverzibilna inaktivacija enzima i njen uticaj preovlađuje u početnoj fazi inhibicije. Drugi stupanj je spora ireverzibilna inhibicija, u kome se formira veoma stabilan enzim-inhibitor kompleks (fosforilovani enzim) – inhibitor je vezan za enzim kovalentnom vezom [17]. Vremenski zavisna ireverzibilna inhibicija se može opisati sledećom jednačinom [18–20]:

$$\ln \frac{E}{E_0} = -\frac{k_3 t}{1 + K_i / (I)} \quad (1)$$

gde je E/E_0 procenat preostale aktivnosti enzima u odnosu na početnu aktivnost (kontrolu), E_0 . K_i je konstanta disocijacije za reverzibilni enzim-inhibitor kompleks (E*PX), k_3 konstanta prvog reda za konverziju reverzibilnog kompleksa u inhibirani (fosforilovani) enzim (EP), (I) koncentracija inhibitora (organofosfata) i t je vremenski interval posle mešanja enzima i inhibitora. Ako je zadovoljen uslov da je $(I) \gg (E_0)$, recipročni izraz za nagib ($1/k_{app}$) linearne zavisnosti $\ln (E/E_0) - t$ (slika 3a) može se izraziti u formi:

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_3} + \frac{K_i}{k_3} \frac{1}{(I)} \quad (2)$$

Vrednosti inhibicionih parametara K_i i k_3 se mogu izračunati iz nagiba i odsečka linearne zavisnosti $1/k_{app} - 1/(I)$ (slika 3b) [18–20].

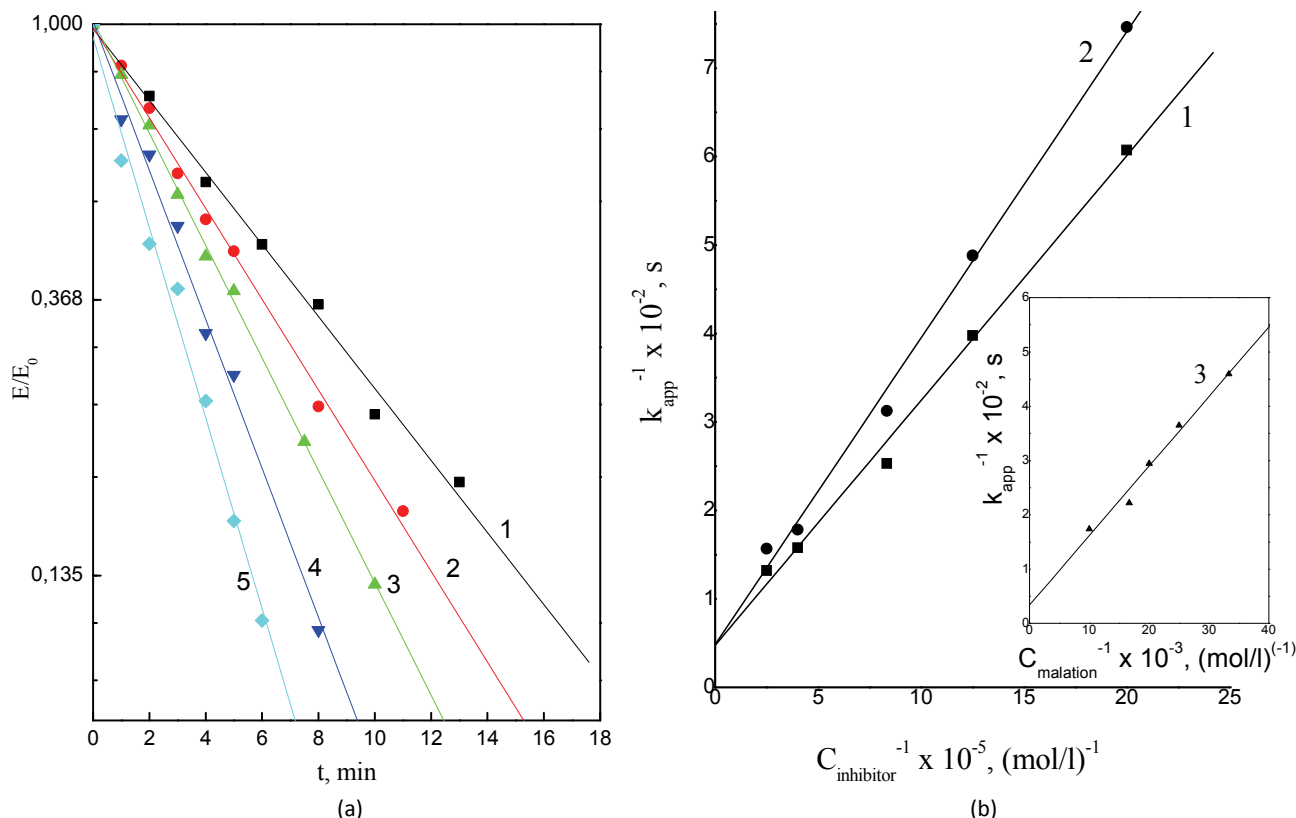
Efektivni organofosfati imaju sledeće strukturne karakteristike:

- kiseonik vezan dvostrukom vezom za fosfor,
- dve lipofilne grupe (R_1, R_2) vezane za fosfor i
- dobru odlazeću grupu (X) vezanu za fosfor [2].

Okso oblici organofosfata (P=O) jesu i do nekoliko stotina puta moćniji inhibitori AChE u poređenju sa analognim tio oblicima (P=S) [20–23]. Kod sisara metabolizam tio organofosfata odvija se aktivacijom u odgovarajući okson najvećim delom u prisustvu CYP450, a zatim hidrolizom i kovalentnim vezivanjem za proteine. Kod insekata je takođe dominantan mehanizam aktivacije u odgovarajuće oksone u prisustvu izoenzima CYP450, ali kod njih nema hidrolize organofosfata, pa je zbog toga toksičnost ovih jedinjenja selektivno veća u odnosu na sisare [24,25].

Transformacija organofosfatnih insekticida u životnoj sredini

Upotreba organohlornih insekticida, zbog njihove akumulacije u životnoj sredini, zamenjena je manje postojanim organofosfatnim jedinjenjima. Poslednje dve decenije organofosfati predstavljaju najviše primenjivanu grupu insekticida. Obimna primena pesticida radi povećanja prinosa u poljoprivredi i intenzivan razvoj novih hemikalija drastično je povećao broj i količine agrohemikalija prisutnih u okolini. Nekoliko studija ukazuju na prisustvo organofosfatnih jedinjenja u vodenim sistemima [26–30], koji se kontaminiraju obično nekoliko nedelja nakon primene insekticida. Zbog nespecifične inhibicije AChE, koja se odigrava kod insekata kao



Slika 3. a) Razvoj inhibicije tokom reakcije AChE sa različitim koncentracijama malationa. Koncentracija malationa: 1) 3×10^{-5} mol/l; 2) 4×10^{-5} mol/l; 3) 5×10^{-5} mol/l; 4) 6×10^{-5} mol/l; 5) 1×10^{-4} mol/l. (Preuzeto iz [18] uz dozvolu Informa Healthcare); b) zavisnost $1/k_{app}$ od koncentracije malaoksona (1), izomalationa (2) i malationa (3, umetak). (Preuzeto iz [18] sa dozvolom Informa Healthcare).
 Figure 3. a) Progressive development of inhibition of produced by reaction of AChE with different concentrations of malathion. Malathion concentrations: 1) 3×10^{-5} mol/l; 2) 4×10^{-5} mol/l; 3) 5×10^{-5} mol/l; 4) 6×10^{-5} mol/l; 5) 1×10^{-4} mol/l. (Reproduced from [18] with permission from Informa Healthcare); b) the dependence of $1/k_{app}$ upon the concentration of malaokson (1), isomalathion (2) and malathion (3, inset). (Reproduced from [18] with permission from Informa Healthcare).

i kod ljudi, rasprostranjenost organofosfatnih insekticida u životnoj sredini i prisustvo u izvorskim vodama predstavljaju ozbiljnu pretnju živom svetu kao i zdravlju ljudi [30,31].

Organofosfati u životnoj sredini podležu prirodnoj degradaciji koja se u najvećoj meri odigrava putem homogene i heterogene hidrolize [26,28,32–34]. Hidroliza se dešava na nekoliko reaktivnih centara u molekulu, homogenim mehanizmom gde se H_2O i OH^- (ređe H^+) ponašaju kao nukleofili, zbog čega ova reakcija jako zavisi od pH vrednosti i najefikasnija je u jako baznoj sredini. Prisustvo rastvorenih metalnih jona, mikroorganizama i drugih jedinjenja prisutnih u zemljištu povećava brzinu hidrolize [33,35,36]. Heterogene površine (oksidi gvožđa i aluminijuma i različite gline) takođe mogu ubrzati proces hidrolize obezbeđujući mesta na površini na kojima nukleofil i organofosfat reaguju [36]. Kako molekuli organofosfata imaju maksimum apsorpcije u UV oblasti (240–310 nm), svetlost može indukovati njihovu degradaciju koja se može odigrati direktnom ili indirektnom fotolizom. U direktnoj fotolizi molekuli apsorbuje UV svetlost i zatim reaguje sa jedinjenjima u okolini ili se sam razgrađuje. Indirektna fotoliza

je češća i prouzrokovana je kiseonikom i hidroksi ili peroksi radikalima, koji nastaju fotolizom organskih ili neorganskih jedinjenja [33,36,37–39]. Organofosfatni insekticidi (najveći broj komercijalnih formulacija su tio organofosfati sa P=S grupom), kada se primene na polju i transportuju u vodene sisteme, mogu lako da se oksiduju do oksona usled prisustva prirodnih oksidanata i UV svetlosti [22,31,34,39]. Smatra se da se oksidacija odigrava putem oksidativne desulfuracije napadom OH^\bullet radikala na tiono grupu ili preko oksidativnog mehanizma koji se odigrava direktno na molekulu tio organofosfata [40]. Oksoni su u poređenju sa tio jedinjenjima polarniji, rastvorljiviji u vodi i manje se adsorbuju na zemljištu. Znatno su jači inhibitori AChE, a neki su postojaniji u životnoj sredini od tio analoga [31,39,41,42]. Zato, postojanost organofosfata u životnoj sredini uglavnom zavisi od katalitičkog kapaciteta zemljišta, fotodegradacionih procesa i atmosferskih padavina [33].

Degradacija organofosfatnih insekticida u unapređenim procesima oksidacije za prečišćavanje voda

Relativna stabilnost insekticida u životnoj sredini i spora degradacija fotolizom i/ili transformacija do tok-

sičnijih produkata tokom fotodegradacionih procesa rezultirali su dodatnim problemima u okolini, i velikim interesovanjem za istraživanje i razvoj tehnologija za prečišćavanje voda zagađenih sa organofosfatima, njihovim degradacionim produktima i komercijalnim ko-produktima (izomeri i/ili O- i S- trimetil fosfati) [31] s ciljem njihovog efikasnog uklanjanja. Otpadne vode koje sadrže pesticide ne mogu se efikasno tretirati biološkim tehnikama, jer su toksični prema mikroorganizmima tako da njihova biodegradacija nije moguća [43]. Razvoj na polju hemijskog tretmana voda doveo je do nekoliko oksidativnih postupaka degradacije zasnovanih na generisanju visoko reaktivnih intermedijera koji iniciraju niz reakcija kojima se razgrađuju i uklanjaju organski zagađivači. Oni su poznati kao unapređeni procesi oksidacije (AOP– *advanced oxidation processes*), koji se mogu podeliti u dve glavne grupe: fotohemijske i procese ozonizacije. Fotohemijski procesi se dalje mogu podeliti na: direktnu fotolizu, fotoosetljivu oksidaciju i fotokatalizu [44–49].

AOP se zasniva na produkciji OH^{*}, druge najjače oksidativne vrste posle fluorina (redukcioni potencijal $E^{\circ} = 2,8 \text{ V}$), koji neselektivno napadaju većinu organskih molekula, dovodeći do delimične ili totalne dekompozicije [50]. Međutim, mogućnost transformacija do toksičnijih i/ili stabilnijih proizvoda tokom fotodegradacionih procesa predstavlja ozbiljan problem za životnu sredinu. Zato, reakcioni mehanizmi i nova formirana jedinjenja moraju se detaljno istražiti pre nego što se prihvate kao metode bezopasne za okolinu [51].

TESTIRANJE TOKSIČNOSTI TOKOM UNAPREĐENIH PROCESA OKSIDACIJE ZA UKLANJANJE ORGANOFOSFATNIH INSEKTICIDA

Toksičnost voda koje sadrže pesticide zavisi od količina i vrste pesticida i njihovih degradacionih produkata. Odnosi koncentracija–toksičnost su složeni i za čista jedinjenja, dok je za smeše nekoliko pesticida,

uključujući njihove degradacione produkte, nemoguće predvideti efekte. Zato bi trebalo koristiti odabrane eseje za određivanje toksičnosti zagađenih voda [52]. Za procenu zagađenosti voda koriste se celi organizmi kao bioeseji (invertebrate *Daphnia* i *Ceriodaphnia*, biljke, ribe i alge *Chlorella fusca*, *Selenastrum Capricornutum*, *Ceratophyllum oryzatorum*), koji daju indukovane biološke odgovore (inhibicija rasta, reprodukcije i pokretljivosti) u prisustvu toksičnih jedinjenja [53,54]. Jajne ćelije morskog ježa i mekušaca se koriste kao bioeseji za testiranje toksičnosti morske vode [55]. Nedostatak ovih bioeseja je neophodna specijalna oprema i posebno obučeno osoblje, dok bi indikatori toksičnosti trebalo da budu brzi, jeftini i jednostavni za rukovanje. Poslednjih decenija razvijeni su bioeseji koji koriste mikroorganizme i zasnovani su na merenju elementarnih transformacija (ugljenik, sumpor i azot), potrošnje kiseonika, unosa glukoze, kao i praćenju rasta, smrtnosti, fotosinteze, luminiscencije ili enzimске aktivnosti. Pored bioeseja koji daju odgovore na nivou organizma, razvijeni su enzimski i imuno eseji koji povezuju toksičnost ciljanog jedinjenja i pad aktivnosti određenog enzima ili biomarkera (npr. organofosfatni i karbamatni insekticidi selektivno inhibiraju aktivnosti holinesteraza) [53,54,56].

Efikasnost primenjenih AOP-a za uklanjanje pesticida trebalo bi da bude procenjena stepenom detoksifikacije. U tabeli 1 sumirani su AOP-i za degradaciju organofosfatnih insekticida i primenjivani testovi za procenu toksičnosti. Najčešće korišćeni testovi za praćenje toksičnosti vode uzrokovane organofosfatima su *Microtox* test, *Daphnia* i AChE bioesej. *Microtox* test koristi bioluminiscenciju morske bakterije *Vibrio fischeri* kao meru njene aktivnosti. Nivoi toksičnosti se određuju praćenjem smanjenja luminiscencije usled inhibicije bakterijske luciferaze nakon kontakta sa toksičnim jedinjenjima. Prednosti *Microtox* testa su brzina, jednostavnost, osetljivost i reproduktivnost. *Daphnia* test se zasniva na praćenju pokretljivosti izloženih orga-

Tabela 1. Unapređeni procesi oksidacije (AOP) za degradaciju organofosfatnih insekticida i primenjeni testovi za monitoring toksičnosti

Table 1. Advanced oxidation processes (AOP) for organophosphorus insecticides degradation and applied toxicity tests

Analit	AOP	Proizvodi	Test toksičnosti	Toksičnost	Referenca
Dimetoat	TiO ₂ i ZnO fotokataliza + oksidanti	–	<i>Microtox</i> test/ <i>Vibrio fischeri</i>	Raste tokom prvih faza, a zatim polako opada	[58]
Dihlorvos	TiO ₂ i ZnO fotokataliza + oksidanti (H ₂ O ₂ ili K ₂ S ₂ O ₈)	–	<i>Microtox</i> test/ <i>Vibrio fischeri</i>	Raste	[59]
Pirimifos-metil	TiO ₂ fotokataliza	+	<i>Microtox</i> test/ <i>Vibrio fischeri</i>	Raste tokom prvih faza, a zatim opada	[60]
Azinfos-metil; hlorpirifos; malation; malaokson	Fotoliza – ksenonska lampa	+	AChE–termal lens spektrometrijski bioesej	Raste	[39]
Metil- paration	Fotoliza – ksenonska lampa	+	<i>Vibrio fischeri</i> (Lumistox) + konduktometrijski AChE biosenzor	Raste	[61]

nizama nakon 24 ili 48 sati. Time je ovaj test manje pogodan za *on-line* praćenje AOP-a, u poređenju sa *Micro* testom i AChE esejom koji mogu dati informacije o toksičnosti uzoraka za nekoliko minuta [57].

Fotokatalitički tretman rastvora dimetoata sa TiO_2 ili ZnO u kombinaciji sa oksidantima (tabela 1) potpuno je degradirao insekticid posle 40, odnosno 80 min. Međutim, u slučaju TiO_2 , kao i $\text{TiO}_2\text{-K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, početna toksičnost (69% inhibicija bioluminiscencije, *Microtox* test) blago se povećala tokom prvih 2 h ozračivanja, i na kraju posle 6 h tretmana dostigla 59% inhibicije. Toksičnost dimetoata se u početku povećala najverovatnije zbog njegove aktivacije u ometoat (okson metabolit dimetoata). Za razliku od tretmana dimetoata sa TiO_2 i $\text{TiO}_2\text{-K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, tokom fotodegradacije u prisustvu $\text{TiO}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ primećeno je stalno smanjenje toksičnosti do kompletne detoksifikacije posle 2 h tretmana [58].

Dihlorvos je fotokatalitički tretiran u prisustvu samog TiO_2 , odnosno ZnO, i u kombinaciji sa oksidantima (H_2O_2 ili $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (tabela 1). U ozračenim suspenzijama sa TiO_2 , toksičnost dihlorvosa je neznatno opala posle 2 h (sa 45 na 29 % inhibicije bioluminiscencije) i povećala se do 63% inhibicije posle 6 h ozračivanja. Dodatkom oksidanata (H_2O_2 i $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ubrzana je degradacija dihlorvosa, ali je došlo do povećanja toksičnosti, naročito u prisustvu $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ kada je inhibicija luminiscencije dostigla 99 % posle 2 h tretmana i ostala konstantna posle produženog ozračivanja (6 h). Slični rezultati su dobijeni upotrebom sistema $\text{ZnO-K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, dok je sam ZnO indukovao konstantnu vrednost inhibicije (85 %) posle 1 h tretmana [59].

Pirimifos-metil je degradiran u solarnom fotokatalitičkom procesu u prisustvu TiO_2 kao katalizatora (tabela 1) [60]. Tokom prvih 15 min tretmana, toksičnost ozračenog rastvora je porasla (od 30 do 50 % inhibicije bioluminiscencije), dok je nastavak ozračivanja doveo do stalnog smanjenja toksičnosti dostižući manje od 20 % inhibicije posle 6 h. Ovo ukazuje na formiranje mnogo toksičnijih jedinjenja u poređenju sa polaznim jedinjenjem, tokom prvih 15 min, koja uzrokuju znatno povećanje inhibicije bioluminiscencije u tretiranom rastvoru. Povećanje toksičnosti bi moglo biti posledica formiranja jedinjenja koja sadrže P=O grupu oksidacijom P=S grupa, kao u slučaju drugih tiofosfornih insekticida [31,39].

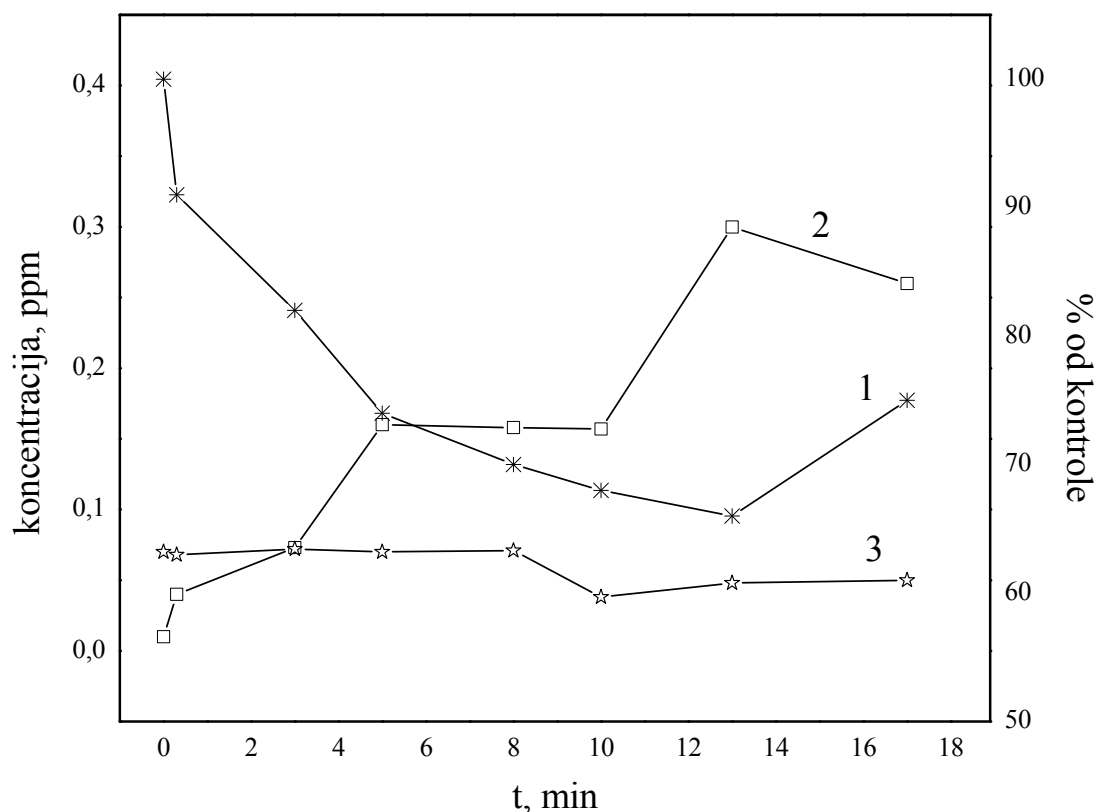
ACETILHOLINESTERAZNI BIOESEJ U UNAPREĐENIM PROCESIMA OKSIDACIJE ZA UKLANJANJE ORGANOFOSFATNIH INSEKTICIDA

Toksičnost metil-parationa, metil-paraoksiona i 4-nitrofenola (proizvod hidrolize metil-parationa i/ili metil-paraoksiona) ispitivana je AChE konduktometrijskim biosenzorom i *Lumistox* testom (*V. fischeri*) (tabela 1). Dobijeni rezultati ukazuju da je *V. fischeri* osetljiviji prema metil-parationu više od tri puta u poređenju sa metil-paraoksonom, dok je AChE biosenzor pokazao nisku

osetljivost za metil-paration i nije detektovao 4-nitrofenol, jedinjenje koji ne inhibira AChE [61]. Zato su AChE biosenzori pogodniji za praćenje degradacionih procesa tio organofosfata, jer tokom takvih procesa mogu da se formiraju njihovi okso analozi (mnogo jači inhibitori AChE), dok se tio jedinjenja prate inhibicijom bioluminiscencije. Ova prednost AChE biosenzora za testiranje neurotoksičnosti organofosfata ubrzala je istraživanje primene AChE bioeseja u AOP-ima za degradaciju ovih insekticida [62].

Značajnu primenu našao je veoma osetljiv, brz FIA-AChE-TLS bioesej. Osnova ovog sistema je bioanalitička kolona sa imobilizovanim enzimom, koja je ubačena u FIA (*flow-injection analysis*) deo kroz koji protiče mobilna faza, i omogućava brži rad sistema i bolju reproduktivnost. Noseći fosfatni pufer pH 8,0 (mobilna faza) protiče kroz sistem protokom 0,5 ml/min. Radi merenja enzimske aktivnosti, supstrat se injektira kroz injekcioni ventil sa injekcionom petljom zapremine 20 μl , dok je za injektiranje testiranog uzorka obezbeđen druga petlja zapremine 200 μl . Za detekciju enzimski hidrolizovanog supstrata (ACh) u protočnoj ćeliji koristi se osetljivi TLS (*thermal lens spectrometric*) sistem. Granica detekcije sistema (LODs – *limits of detection*) jeste 0,1 ppb izražena kao ekvivalent paraoksiona, i može se smanjiti povećanjem injekcione petlje za uzorak (1–2 ml) [63–66].

Promene toksičnosti tokom γ -zračenja najviše primenjivanog insekticida u proizvodnji pamuka, malationa [67], proizvoda njegove oksidacije-malaoksiona i izomerizacije-izomalationa praćene su FIA-AChE-TLS bioesejom [51]. Da bi se utvrdilo koji formirani produkti u ozračenim rastvorima utiču na aktivnost imobilizovanog enzima, GC-MS (*gas chromatography-mass spectrometry*) analiza je primenjena za njihovu identifikaciju. Rezultati su pokazali da γ -zračenjem malationa nastaju tri relativno stabilna trimetil fosfata i dva jedinjenja koja jako inhibiraju aktivnost AChE-malaoksona i izomalation [18,21,42], kao i različiti substituisani dietil estri butanske i butenske dikarboksilne kiseline. Poređenjem zavisnosti formiranja malaoksiona i inhibicije AChE od vremena zračenja (slika 4), može se konstatovati da se toksičnost može u najvećoj meri pripisati formiranju malaoksiona. Rezultati ozračivanja malaoksiona i izomalationa pokazuju da je efikasnost degradacije malaoksiona i izomalationa značajno manja u odnosu na malation. Nastali proizvodi su trimetil estri koji indukuju povećanu akutnu toksičnost, kao i substituisani dietil estri butanske i butenske dikarboksilne kiseline koji nisu poznati kao inhibitori AChE. Potpuno uklanjanje toksičnih jedinjenja moglo bi se postići dužim vremenom ozračivanja ili većim dozama zračenja u poređenju sa potrebnim za kompletno uklanjanje polaznih tio organofosfata [51].



Slika 4. Inhibicija AChE (1) i formiranje malaoksona (2) i izomalationa (3) tokom γ -zračenja malationa. (Preuzeto iz [51] sa dozvolom Elsevier).

Figure 4. AChE inhibition (1) and forming malaoxon (2) and isomalathion (3) during malathion γ -irradiation. (Reproduced from [51] with permission from Elsevier).

Toksičnost tokom fotokatalitičke degradacije (u prisustvu TiO_2) malationa, njegovog komercijalnog proizvoda Radotiona i proizvoda njegove transformacije, malaoksona i izomalationa, praćena je FIA-AChE-TLS bioesejom [51]. Rezultati ukazuju (tabela 2) na nastajanje snažnog inhibitora malaoksona već na samom početku ozračivanja čistog rastvora malationa, kao i komercijalnog Radotiona. Maksimalna koncentracija malaoksona dostignuta je između 15 i 60 min tretmana, što je saglasno najvećem padu enzimske aktivnosti zabeleženom u ovom periodu. U neozračenom rastvoru Radotiona, koji sadrži i malaokson i izomalation, malation se tokom 2 sata fotokatalize u potpunosti razgradio, kao i čist malation. Važno je primetiti da je posle 2 sata ozračivanja čistog malationa postignuta potpuna detoksifikacija (99 % preostale aktivnosti enzima), dok kod komercijalnog proizvoda još uvek postoji приметna inhibicija, što je posledica prisustva malaoksona u ozračenom rastvoru (tabela 2). U eksperimentima sa malaoksonom i izomalationom, fotokatalitički tretman degradacije se pokazao kao manje efikasan u poređenju sa malationom, dok su krive toksičnosti u oba slučaja bile obrnuto proporcionalne krivama degradacije (podaci nisu prikazani) [51].

Hlorpirifos je jedini organofosfatni insekticid čija je upotreba u zaštiti biljaka zakonom odobrena. Tokom procesa za uklanjanje ostataka hlorpirifosa, fotolitičke degradacije katalizovane TiO_2 i ozonizacije, nastaje hlorpirifos-okson, oko sto puta snažniji inhibitor AChE [68]. Studije fotokatalitičke degradacije i ozonizacije hlorpirifosa i hlorpirifos-oksona uporedo prate formiranje proizvoda hromatografskim tehnikama GC-MS i LC-MS (*liquid chromatography-mass spectroscopy*) i indukovano toksičnost FIA-AChE-TLS bioesejom [51]. Rezultati fotokatalitičke degradacije hlorpirifosa (tabela 2) ukazuju na nastajanje hlorpirifos-oksona, koji dostiže maksimalnu vrednost posle 30 min eksperimenta i dovodi do najvećeg pada enzimske aktivnosti. Dužim vremenima ozračivanja polazno jedinjenje se potpuno degradira, dok se toksičnost ne smanjuje, što je u saglasnosti sa rezultatima fotodegradacije oksona koji je postojaniji i sporije se razgrađuje pod uslovima eksperimenta (tabela 2). Pored oksidacije, tokom fotokatalize hlorpirifosa dolazi i do hidrolitičkog raskidanja kovalentnih veza polaznog jedinjenja, kao i nastalog oksona. U oba slučaja glavni identifikovani proizvod je 3,5,6-trihloro-2-piridinol (TCP) (tabela 2). Rezultati ozonizacije hlorpirifosa, analitičkog standardnog rastvora i tehničkog proizvoda Pynex (tabela 3), pokazuju da proces

ozonizacije veoma brzo dovodi do kompletne razgradnje insekticida. Već posle 30 min tretiranja čistog jedi-

Tabela 2. Degradacija malationa, hlorpirifosa i hlorpirifos-oksona (ppm) tokom fotokatalize sa TiO₂, nastajanje glavnih proizvoda degradacije i inhibicija AChE [51]

Table 2. Malathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon (ppm) photocatalysed TiO₂ degradation, forming degradation products and AChE inhibition [51]

Polazni tio organofosfat	Proizvod degradacije	Vreme tretmana, min							
		0	5	15	30	45	60	90	120
Malation		19,1	11,7	5,45	1,45	0,32	0,01	0	–
	Malaokson	0	0,22	0,47	0,55	0,62	0,62	0,26	0,09
	Aktivnost AChE, %	98	71	59	59	63	62	71	99
Malation u radotionu		11,3	8,7	5,0	2,1	0,81	0,19	–	–
	Malaokson	0,08	0,29	0,56	0,69	0,67	0,64	0,46	0,28
	Izomalation	0,74	0,60	0,59	0,28	0,17	0,10	0,03	0
	Aktivnost AChE, %	98	82	74	64	70	74	78	75
Hlorpirifos		1,04	0,76	0,46	0,30	–	0,13	0,12	0
	Hlorpirifos-okson	0	0,07	0,09	0,24	–	0,23	0,19	0,17
	TCP	0	0	0,01	0,02	–	0,03	0,02	0,04
	Aktivnost AChE, %	92	76	68	62	–	61	54	59
Hlorpirifos-okson		11,9	10,3	8,5	6,0	4,0	2,5	0,78	0,19
	TCP	0,14	0,46	0,77	1,1	1,1	1,1	0,67	0,30
	Aktivnost AChE, %	51	60	64	72	79	85	99	104

Tabela 3. Degradacija hlorpirifosa i hlorpirifos-oksona tokom ozonizacije, nastajanje glavnih proizvoda degradacije i inhibicija AChE [51]
Table 3. Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon ozonisation, forming degradation products and AChE inhibition [51]

Polazni tio organofosfat	Proizvod degradacije	Vreme tretmana, min							
		0	5	15	30	45	60	90	120
Hlorpirifos u Pynex-u		1,5	1,1	0,74	0,22	0,16	0	0	0
	Hlorpirifos-okson	0	1,2	1,3	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6
	Aktivnost AChE, %	94	74	47	47	46	47	42	–
Hlorpirifos		2,4	1,3	0,54	0,26	–	0,2	0,13	0,07
	Hlorpirifos-okson	0	1,9	2,6	3,0	–	2,7	2,8	2,7
	Aktivnost AChE, %	99	58	57	52	–	65	54	60
Hlorpirifos-okson		12	11,5	11	10,5	10,4	10	9,5	–
	TCP	0	0,2	0,3	0,6	0,7	0,8	1,0	–
	Aktivnost AChE, %	60	65	64	61	61	62	65	–

cije hlorpirifos-okson, koji uzrokuje najveći pad aktivnosti AChE na kraju ispitivanog procesa. Tokom eksperimenta pad koncentracije nastalog oksona nije primećen, što ukazuje da ozon nije efikasno sredstvo za degradaciju, a time i detoksifikaciju, hlorpirifos-oksona. Ova pretpostavka je potvrđena ozonizacijom veće koncentracije standardnog rastvora hlorpirifos-oksona, gde je samo 1/5 polaznog jedinjenja hidrolitički razložena do TCP-a (i dietil-fosfata) i praćena je malim porastom enzimske aktivnosti (tabela 3) [51].

Sličan FIA-AChE biosensing sistem za brzu detekciju organofosfatnih insekticida u vodi i procenu njihove toksičnosti sa spektrofotometrijskom detekcijom je razvijen [18,42]. Sastoji se od HPLC (*high performance liquid chromatography*) pumpe (Dionex AMP-1), injek-

njenja, odnosno 1 sata ozonizacije Pynex-a, polazno jedinjenje potpuno prelazi u toksični proizvod oksida-

Tabela 3. Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon ozonisation, forming degradation products and AChE inhibition [51]

cionog ventila sa injekcionim lupom zapremine 200 µl (Waters U6K) i bioanalitičke kolone (40×4 mm) ispunjene sa 0,55 mg staklenih perli sa imobilizovanom AChE. Mobilna faza je fosfatni pufer pH 8,0 koji protiče kroz sistem brzinom 0,2 ml/min. Početna aktivnost imobilizovanog enzima (kontrola) u bioanalitičkoj koloni se određuje injektiranjem smeše supstrata, acetiltioholin jodida (ASChI) i reagensa za bojenje (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina), DTNB). Absorbanca žuto obojenog proizvoda 5-tio-2-nitrobenzoata, formiranog u reakciji tioholina (proizvod enzimske hidrolize) i DTNB-a, meri se spektrofotometrijski ($\lambda = 412$ nm) u protočnoj ćeliji (250 µl). Nakon merenja kontrolne aktivnosti enzima, uzorak koji sadrži insekticid(e) injektira se. Preostala enzimska aktivnost se određuje drugim

se. Preostala enzimska aktivnost se određuje drugim

injektiranjem smeše supstrata i DTNB-a. Posle svakog injektiranja uzorka insekticida, aktivnost enzima se reaktivira do njegove početne vrednosti injektiranjem reaktivatora, 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinium jodida (2-PAM). Limiti detekcije (LOD) testiranih tio organofosfata-malationa, hlorspirifosa, diazinona i proizvoda njihove transformacije (tabela 4) pokazuju da je ovaj FIA-AChE sistem najosetljiviji prema okso jedinjenjima i izomalationu (proizvodu izomerizacije malationa), što odovara inhibicionim potencijalima ispitivanih jedinjenja prema AChE, i mogao bi se koristiti za testiranje toksičnosti tokom fizičko-hemijskih tretmana voda [18,42]. Dok je spektrofotometrijska detekcija jednostavna, lako izvodljiva i jeftina, vreme potrebno za analizu zadovoljavajuće, osetljivost nije visoka i u nekim slučajevima ne zadovoljava propise Evropske Unije [69,70].

TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI ORGANOFOSFATNIH INSEKTICIDA I DEGRADACIONIH PROIZVODA

Primarna toksičnost povezana sa akutnim izlaganjem organofosfatnim insekticidima je inhibicija AChE u nervno-mišićnim spojevima. Međutim, novije studije ukazuju da se toksičnost insekticida može dovesti u vezu sa povećanim nastajanjem reaktivnih vrsta kiseonika (ROS – *reactive oxygen species*). ROS su sastavni deo normalnog ćelijskog metabolizma i mogu nastati na nivou respiratornog lanca i aktivnošću nekih enzima (oksidaza). Njihova produkcija je strogo kontrolisana održavanjem ravnoteže između prooksidanata i antioksidanata. Međutim, ne tako retko dolazi do narušavanja ove ravnoteže, kada dolazi do povišene produkcije ROS. Ovakvo stanje van fizioloških granica produkcije ROS u biološkim sistemima naziva se oksidativni stres. Zbog izuzetne reaktivnosti i neselektivnosti, ROS narušava strukturu i funkciju mnogih biomolekula, poput lipida, proteina i DNK [71–78]. Rizik od genotoksičnosti, usled oštećenja genetskog materijala izazvanog pesticidima, može biti znatno veći od onih koji predviđaju standardni testovi toksičnosti [79]. Zato, citogenetsko oštećenje (hromozomske aberacije, CA – *chromosomal aberrations*), mikronukleusi (MN – *micro-*

nuclei) i izmene sestrinskih hromatida (SCE – *sister-chromatid exchanges*) u limfocitima je u širokoj upotrebi kao biomarker izlaganja i delovanja pesticida.

Ispitivan je uticaj degradacionih proizvoda tio organofosfata diazinona-diazoksiona i IMP-a (2-izopropil-6-metil-4-pirimidinol), formiranih tokom izlaganja UV svetlosti, na aktivnost AChE u kulturama ćelija humane krvi (eritrocitima i limfocitima) i humanim fibroblastima nakon 72 sata inkubacije, kao i uticaj na lipidnu peroksidaciju, incidencu (učestanost) mikronukleusa (MN) i indeks ćelijske proliferacije (CBPI) [22]. Dobijeni rezultati ukazuju na izražene prooksidativne osobine i genotoksični potencijal proizvoda hidrolize diazinona, IMP-a, koji ne pokazuje inhibitorni efekat na AChE. Naime, koncentracije IMP-a od 2×10^{-6} do 2×10^{-4} mol/l dovode do povećanja sadržaja proizvoda lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA), u limfocitima i inkubacionom medijumu (slika 5a, umetak). Indukovani nivo MDA je za 50–80% veći u poređenju sa dobijenim vrednostima za iste koncentracije diazinona (slika 5a). Tokom ozračivanja diazinona dolazi do povećanja nivoa MDA koji je na kraju fotolitičkog tretmana, kada je u tretiranom rastvoru prisutan samo IMP, približno dva puta veći u odnosu na vrednost dobijenu u prisustvu neozračenog rastvora diazinona (slika 5b).

Rastvori diazinona i IMP-a doveli su i do značajnog porasta incidence MN, na dozno zavisani način, u kulturama limfocita i fibroblastima, ali se IMP pokazao kao snažniji inducer MN od diazinona (tabela 5). Dozno zavisna inhibicija CBPI je primećena u limfocitima tretiranim sa diazinonom i IMP-om. U fibroblastima, rastuće koncentracije IMP-a su značajno smanjile proliferacioni potencijal, dok tretman sa diazinonom nije izazvao značajne promene CBPI (tabela 5). Incidenca mikronukleusa, u uzorcima limfocita i fibroblasta tretiranim sa ozračenim rastvorima diazinona, rasla je sa porastom vremena ozračivanja, i dostigla je maksimalnu vrednost posle 115 min tretmana (samo IMP prisutan u tretiranom rastvoru). Proliferacioni potencijal ćelija se značajno smanjio sa produženim vremenom ozračivanja u oba tkiva (tabela 6) [22].

Tabela 4. Limiti detekcije (LOD) malationa, hlorspirifosa, diazinona i proizvoda njihove transformacije, testiranih FIA-AChE sistemom sa spektrofotometrijskom detekcijom proizvoda enzimske hidrolize. Vrednosti LOD su određene kao koncentracija koja dovodi do 10% inhibicije aktivnosti enzima [18]

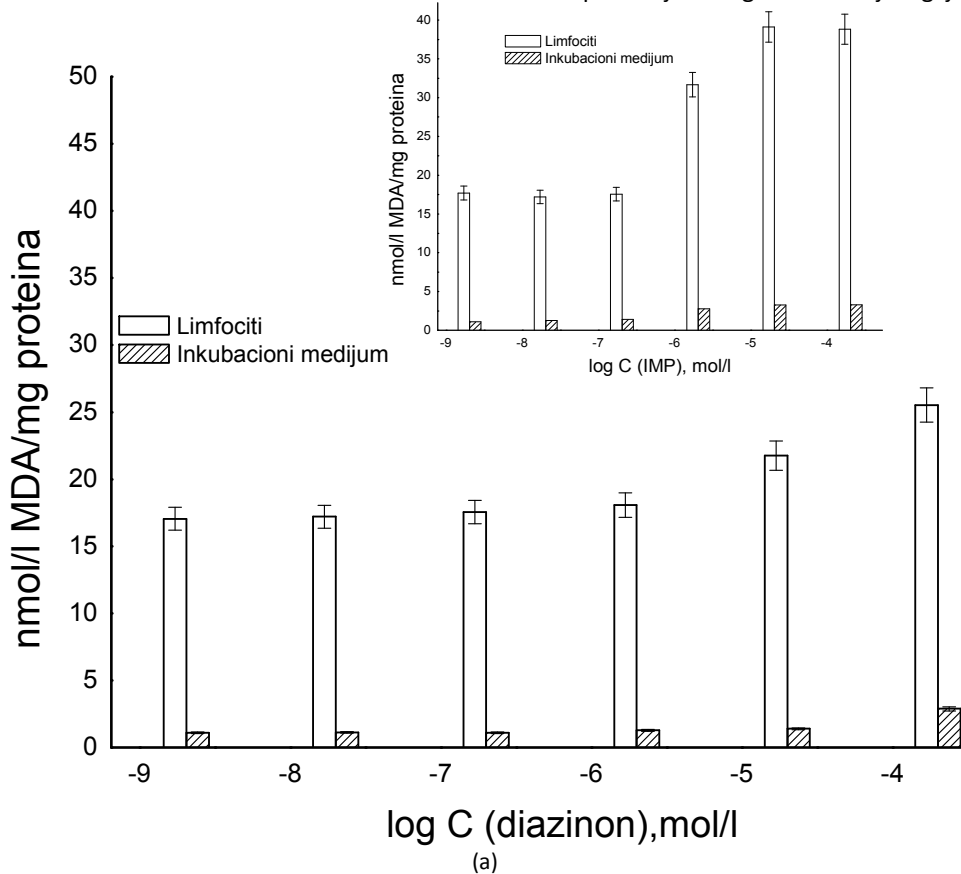
Table 4. Limit of detection (LOD) of malathion, chlorpyrifos, diazinon and their transformation products, tested by FIA-AChE system with spectrophotometric detection. LOD is defined as inhibitor concentration causing 10% enzyme inhibition [18]

Jedinjenje	LOD, mol/l	Jedinjenje	LOD, mol/l	Jedinjenje	LOD, mol/l
Malation	$1,6 \times 10^{-4}$	Hlorspirifos	$9,1 \times 10^{-5}$	Diazinon	$2,0 \times 10^{-4}$
Malaokson	$7,7 \times 10^{-7}$	Hlorspirifos-okson	$4,5 \times 10^{-7}$	Diazokson	$5,6 \times 10^{-7}$
Izomalation	$1,1 \times 10^{-6}$	TCP ^a	–	IMP ^a	–
Dietil-maleat ^a	–				
O,O-dimetil- tiofosfat ^a	–				

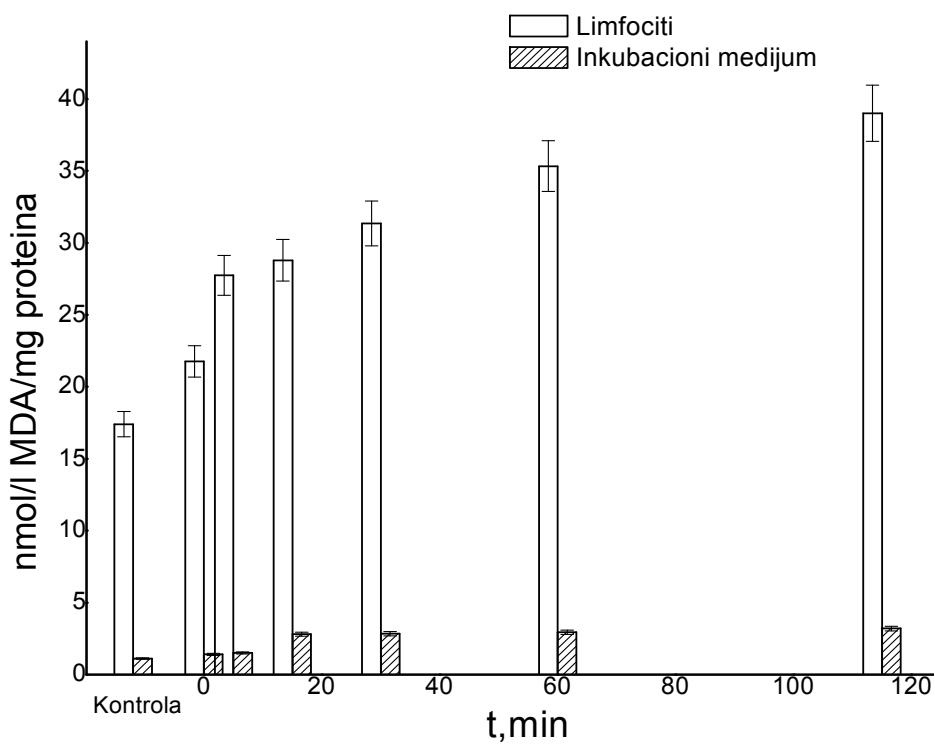
^aNema inhibicije

Dobijeni rezultati za IMP, proizvod hidrolitičkog raskidanja kovalentne veze u molekulu diazinona tokom

njegove fotolitičke degradacije, ukazuju na jak genotoksični potencijal ovog neinhibirajućeg jedinjenja AChE,



(a)



(b)

Slika 5. Sadržaj MDA u limfocitima i inkubacionom medijumu posle izlaganja: a) različitim koncentracijama diazinona i IMP-a (umetak) i b) ozračenom diazinonu kao funkcija vremena ozračivanja. (Preuzeto iz [22] sa dozvolom Elsevier).

Figure 5. a) MDA content in lymphocytes and incubation medium after exposure to: a) different diazinon and IMP (inset) concentrations and b) irradiated diazinon as irradiation time function. (Reproduced from [22] with permission from Elsevier).

Tabela 5. Incidenca mikronukleusa (MN) i indeks proliferacije (CBPI) u humanim limfocitima i fibroblastima tretiranim sa diazinonom i IMP-om [22]

Table 5. Incidence of micronuclei (MN) and proliferation index (CBPI) in human lymphocytes and fibroblasts treated with diazinon and IMP [22]

Parametar	Kontrola	Koncentracija, mol/l				
		2×10^{-8}	2×10^{-7}	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}
Diazinon						
Limfociti						
MN/1000 binuklearne ćelije	4,61	10,18	14,07	15,04	12,90	–
CBPI	1,53	1,42	1,35	1,27	1,26	–
Fibroblasti						
MN/1000 binuklearne ćelije	3,50	9,20	11,10	12,30	9,10	–
CBPI	1,32	1,31	1,26	1,26	1,31	–
IMP						
Limfociti						
MN/1000 binuklearne ćelije	4,61	10,21	11,75	20,95	20,21	18,63
CBPI	1,53	1,40	1,31	1,27	1,20	1,19
Fibroblasti						
MN/1000 binuklearne ćelije	3,50	8,30	9,20	16,10	15,30	15,10
CBPI	1,32	1,29	1,28	1,18	1,17	1,12

Tabela 6. Incidenca mikronukleusa (MN) i indeks proliferacije (CBPI) u humanim limfocitima i fibroblastima tretiranim sa ozračenim diazinonom [22]

Table 6. Incidence of micronuclei (MN) and proliferation index (CBPI) in human lymphocytes and fibroblasts treated with irradiated diazinon [22]

Parametar	Vreme ozračivanja, min					
	0	5	15	30	60	115
Limfociti						
MN/1000 binuklearne ćelije	12,90	15,20	21,44	24,22	43,74	49,45
CBPI	1,26	1,20	1,17	1,15	1,11	1,10
Fibroblasti						
MN/1000 binuklearne ćelije	9,10	13,00	16,00	17,00	29,00	31,00
CBPI	1,31	1,24	1,22	1,28	1,24	1,20

koji se ne može detektovati AChE bioesejima za praćenje toksičnosti tokom AOP-a za prečišćavanje voda. Određivanje incidence MN i CBPI u humanim limfocitima i fibroblastima, nakon izlaganja kulture ćelija, moglo bi se preporučiti kao metoda za procenu toksičnosti organofosfatnih insekticida i proizvoda njihove degradacije/transformacije.

ZAKLJUČAK

Tokom procesa uklanjanja insekticida, kao i u životnoj sredini, formira se nekoliko proizvoda transformacije/degradacije iz jednog polaznog jedinjenja, koji se značajno razlikuju po stepenu toksičnog dejstva koji

nije uvek proporcionalan stepenu razgradnje i/ili uklanjanja polaznog insekticida. Zato je neophodan *on-line* monitoring degradacije organofosfata brzim i osetljivim testovima toksičnosti radi potpunog uklanjanja toksičnih jedinjenja. Iako je u širokoj upotrebi, *Microtox* test, koji se zasniva na inhibiciji bioluminiscencije *V. fischeri*, nije uvek pogodan indikator neurotoksičnih jedinjenja, pre svega okso analoga organofosfata, koji nastaju tokom nekih procesa transformacije polaznih tio insekticida. Za te svrhe se koriste bioeseji koji se zasnivaju na specifičnoj inhibiciji AChE ovim jedinjenjima, sa različitim sistemima za detekciju proizvoda enzimske katalize. Tokom degradacije nekih insekticida nastaju proizvodi sa izraženim genotoksičnim potencijalom, koji ne inhi-

biraju AChE i ne mogu se detektovati AChE biosenzorima. Za njihov monitoring su pogodni testovi koji mere incidencu MN i CBPI u humanim limfocitima i fibroblastima.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat br. 172023) na finansijskoj podršci.

LITERATURA

- [1] M.J. Levine, *Pesticides: A Toxic Time Bomb in our Midst*, 1st ed., Praeger Publishers Inc., Westport, 2007.
- [2] S.A. Greene, R.P. Pohanish, *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, William Andrew Publishing, Norwich, New York, 2005.
- [3] Y. Solberg, M. Belkin, The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning, *Trends Pharmacol. Sci.* **18** (1997) 183–185.
- [4] M. O'Malley, Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings, *Lancet* **349** (1997) 1161–1166.
- [5] J. Bajgar, Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment, *Adv. Clin. Chem.* **38** (2004) 151–216.
- [6] J. Bajgar, Laboratory diagnosis of organophosphates/nerve agent poisoning, *Klin. Biochem. Metab.* **13** (2005) 40–47.
- [7] C.J. Smulders, T.J. Bueters, S. Vailati, R.G. van Kleef, H.P. Vijverberg, Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides, *Toxicol. Sci.* **82** (2004) 545–554.
- [8] K. Hayden, M. Norton, D. Darcey, T. Ostbye, P. Zandi, J. Breitner, K. Welsh-Bohmer, Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The cache county study, *Neurology* **74** (2010) 1524–1530.
- [9] L.G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology, *Clin. Chim. Acta* **366** (2006) 1–13.
- [10] M. Jokanović, M. Kosanović, D. Brkić, P. Vukomanović, Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: An overview, *Clin. Neurol. Neurosur.* **113** (2011) 7–10.
- [11] M. Jokanović, M. Kosanović, Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides, *Environ. Toxicol. Phar.* **29** (2010) 195–201.
- [12] M. Jokanović, Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides, *Toxicol. Lett.* **190** (2009) 107–115.
- [13] D.E. Ray, P.G. Richards, The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates, *Toxicol. Lett.* **120** (2001) 343–351.
- [14] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine binding protein, *Science* **253** (1991) 872–878.
- [15] Y. Boublik, P. Saint-Aguet, A. Lougarre, M. Arnaud, F. Villatte, S. Estrada-Mondaca, D. Fournier, Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues, *Protein Eng. Des. Sel.* **15** (2002) 43–50.
- [16] W.N. Aldridge, Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate and analogs (E605), *Biochem. J.* **46** (1950) 451–460.
- [17] Z.D. Knežević-Jugović, *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*, 2008.
- [18] D. Krstić, M. Čolović, M. Bavcon-Kralj, M. Franko, K. Krinulović, P. Trebše, V. Vasić, Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **23** (2008) 562–573.
- [19] R. Kitz, I. Wilson, Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 3245–3249.
- [20] M.B. Čolović, D.Z. Krstić, G.S. Uščumlić, V.M. Vasić, Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products, *Pestic. Biochem. Phys.* **100** (2011) 16–22.
- [21] D. Krstić, M. Čolović, K. Krinulović, D. Djurić, V. Vasić, Inhibition of AChE by single and simultaneous exposure to malathion and its degradation products, *Gen. Physiol. Biophys.* **26** (2007) 247–253.
- [22] M. Čolović, D. Krstić, S. Petrović, A. Leskovac, G. Joksić, J. Savić, M. Franko, P. Trebše, V. Vasić, Toxic effects of diazinon and its photodegradation products, *Toxicol. Lett.* **193** (2010) 9–18.
- [23] T. Lazarević-Pašti, M. Čolović, J. Savić, T. Momić, V. Vasić, Oxidation of diazinon and malathion by myeloperoxidase, *Pestic. Biochem. Phys.* **100** (2011) 140–144.
- [24] M. Pohanka, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed. Pap.* **155** (2011) 219–230.
- [25] M.A. Sogorb, E. Vilanova, Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicol. Lett.* **128** (2002) 215–228.
- [26] H. Shemer, K.G. Linden, Degradation and by-product formation of diazinon in water during UV and UV/H₂O₂ treatment, *J. Hazard. Mater., B* **136** (2006) 553–559.
- [27] I. Dubus, J. Hollis, C. Brown, Pesticides in rainfall in Europe, *Environ. Pollut.* **110** (2000) 331–344.
- [28] P.C.H. Li, E.J. Swanson, F.A.P.C. Gobas, Diazinon and its degradation products in agricultural water courses in British Columbia, Canada, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **69** (2002) 59–65.
- [29] S. Garcia, C. Ake, B. Clement, H. Huebner, K. Donnelly, S. Shalat, Initial results of environmental monitoring in the Texas Rio Grande valley, *Environ. Int.* **26** (2001) 465–474.
- [30] R.H. Coupe, J.D. Blomquist, Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies, *J. Am. Water Works Assoc.* **96** (2004) 56–68.
- [31] M. Bavcon Kralj, U. Černigoj, M. Franko, P. Trebše, Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon and commercial malathion-products and their toxicity studies, *Water Res.* **41** (2007) 4504–4514.
- [32] K.D. Racke, Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices, in: J.E. Chambers, P.E.

- Levi (Eds.), *Organophosphates, Chemistry, Fate and Effects*, Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp. 47–73.
- [33] M. Bavcon, P. Trebše, L. Zupancic-Kralj, Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector, *Chemosphere* **50** (2003) 595–601.
- [34] T.S. Kim, J.K. Kim, K. Choi, M.K. Stenstrom, K.D. Zoh, Degradation mechanism and the toxicity assessment in TiO₂ photocatalysis and photolysis of parathion, *Chemosphere* **62** (2006) 926–933.
- [35] A. Dannenberg, S.O. Pehkonen, Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 325–334.
- [36] S.O. Pehkonen, Q. Zhang, The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **32** (2002) 17–72.
- [37] R. Doong, W. Chang, Photoassisted titanium dioxide mediated degradation of organophosphorus pesticides by hydrogen peroxide, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **107** (1997) 239–244.
- [38] C. Zamy, P. Mazellier, B. Legube, Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions, *Water Res.* **38** (2004) 2305–2314.
- [39] M. Bavcon Kralj, M. Franko, P. Trebše, Photodegradation of organophosphorus insecticides – investigations of products and their toxicity using gas chromatography mass-spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay, *Chemosphere* **67** (2007) 99–107.
- [40] V.N. Kouloumbos, D.F. Tsiptsi, A.E. Hiskia, D. Nikolic, R.B. van Breemen, Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO₂ aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **14** (2003) 803–817.
- [41] M. Jokanović, Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, **166** (2001) 139–160.
- [42] D. Krstić, M. Čolović, M. Bavcon Kralj, P. Trebše, K. Krinulović, V. Vasić, The influence of malathion and its decomposition products on free and immobilized acetylcholinesterase, *Russ. J. Phys. Chem., A* **82** (2008) 663–668.
- [43] M. Hincapie, M.I. Maldonado, I. Oller, W. Gernjak, J.A. Sanchez-Perez, M.M. Ballesteros, S. Malato, Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances, *Catal. Today* **101** (2005) 203–210.
- [44] H.D. Burrows, M. Canle, J.A. Santaballa, S. Steenken, Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides, *J. Photochem. Photobiol., B* **67** (2002) 71–108.
- [45] J. Wu, T. Luan, C. Lan, T.W.H. Lo, G.Y.S. Chan, Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water, *Food Control* **18** (2007) 466–472.
- [46] J. Wu, C. Lan, G.Y.S. Chan, Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates, *Chemosphere* **76** (2009) 1308–1314.
- [47] Y. Hirahara, H. Ueno, K. Nakamuro, Aqueous photodegradation of fenthion by ultraviolet B irradiation: contribution of singlet oxygen in photodegradation and photochemical hydrolysis, *Water Res.* **37** (2003) 468–476.
- [48] I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, Review, photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways, *Appl. Catal., B* **42** (2003) 319–335.
- [49] A.S. Derbalah, N. Nakatani, H. Sakugawa, Photocatalytic removal of fenitrothion in pure and natural waters by photo-Fenton reaction, *Chemosphere* **57** (2004) 635–644.
- [50] E. Evgenidou, E. Bizani, C. Christophoridis, K. Fytianos, Heterogeneous photocatalytic degradation of prometryn in aqueous solutions under UV/Vis irradiation, *Chemosphere* **68** (2007) 1877–1882.
- [51] M. Bavcon Kralj, P. Trebše, M. Franko, Applications of bioanalytical techniques in evaluating advanced oxidation processes in pesticide degradation, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 1020–1031.
- [52] A.R. Fernandez-Alba, D. Hernando, A. Aguera, J. Caceres, S. Malato, Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency, *Water Res.* **36** (2002) 4255–4262.
- [53] C. Nistor, J. Emneus, Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants, *Waste Manage.* **19** (1999) 147–170.
- [54] M. Farre, R. Brix, D. Barcelo, Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005) 532–545.
- [55] N. Kobayashi, S. Yamato, H. Harino, M. Kitano, A bioassay using sea urchin egg development to identify organotin pollution in sea water. *Coast. Mar. Sci.* **32** (2008) 77–81.
- [56] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, V.N. Arkhypova, A.V. Elskaya, J.M. Chovelon, C.A. Georgiou, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Early-warning electrochemical biosensor system for environmental monitoring based on enzyme inhibition, *Sensors Actuat., B* **105** (2005) 81–87.
- [57] S. Malato, J. Blanco, A. Vidal, D. Alarcon, M.I. Maldonado, J. Caceres, W. Gernjak, Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview, *Sol. Energy* **75** (2003) 329–336.
- [58] E. Evgenidou, K. Fytianos, I. Poullos, Photocatalytic oxidation of dimethoate in aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol., A* **175** (2005) 29–38.
- [59] E. Evgenidou, K. Fytianos, I. Poullos, Semiconductor-sensitized photodegradation of dichlorvos in water using TiO₂ and ZnO as catalysts, *Appl. Catal., B* **59** (2005) 81–89.
- [60] J.M. Herrmann, C. Guillard, M. Arguello, A. Aguera, A. Tejedor, L. Piedra, A. Fernandez-Alba, Photocatalytic degradation of pesticide pirimiphos-methyl: Determination of the reaction pathway and identification of intermediate products by various analytical methods, *Catal. Today* **54** (1999) 353–367.
- [61] S.V. Dzyadevych, J.M. Chovelon, A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique, *Mater. Sci. Eng. C* **21** (2002) 55–60.

- [62] T. Lazarević Pašti, T. Momić, A. Onjia, Lj. Vujisić, V. Vasić, Myeloperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides as a pre-step in their determination by AChE based bioanalytical methods, *Microchim. Acta* **170** (2010) 289–297.
- [63] L. Pogačnik, M. Franko, Optimisation of FIA system for detection of organophosphorous and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition, *Talanta* **54** (2001) 631–641.
- [64] L. Pogačnik, M. Franko, Validation of different commercially available cholinesterases for pesticide toxicity test, *Ann. Chim.* **92** (2002) 93–101.
- [65] L. Pogačnik, M. Franko, Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **18** (2003) 1–9.
- [66] M. Franko, Recent applications of thermal lens spectrometry in food analysis and environmental research, *Talanta* **54** (2001) 1–13.
- [67] National Agricultural Statistics Service (NASS), Agricultural Chemical Usage 2005, Field Crops Summary, Agricultural Statistics Board, May 2006, NASS, USDA, Washington, DC, USA, 2006.
- [68] A.A. Kousba, L.G. Sultatos, T.S. Poet, C. Timchalk, Comparison of Chlorpyrifos-Oxon and Paraoxon Acetylcholinesterase Inhibition Dynamics: Potential Role of a Peripheral Binding Site, *Toxicol. Sci.* **80** (2004) 239–248.
- [69] Official journal of the European Union, L146/19-20, 8.6.2007.
- [70] A.F. Dănet, B. Bucur, M.-C. Cheregi, M. Badea, S. Șerban, Spectrophotometric determination of organophosphoric insecticides in a FIA system based on AChE inhibition, *Anal. Lett.* **36** (2003) 59–73.
- [71] A. Goel, V. Dani, D.K. Dhawan, Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity, *Chem-Biol. Interact.* **156** (2005) 131–140.
- [72] M. Bajpayee, A.K. Pandey, S. Zaidi, J. Musarrat, D. Parmar, N. Mathur, P.K. Seth, A. Dhawan, DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites, *Environ. Mol. Mutagen.* **47** (2006) 682–692.
- [73] P.P. Das, A.P. Shaik, K. Jamil, Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes, *Toxicol. Ind. Health* **7** (2007) 449–458.
- [74] E.O. Oruc, D. Usta, Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 48–55.
- [75] E.O. Oruc, Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos, *Pestic. Biochem. Physiol.* **96** (2010) 160–166.
- [76] N. Aly, K. EL-Gendy, F. Mahmoud, A.K. El-Sebae, Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice, *Pestic. Biochem. Physiol.* **97** (2010) 7–12.
- [77] N.S. El-Shenawy, F. El-Salmy, R.A. Al-Eisa, B. El-Ahmary, Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver, *Pestic. Biochem. Physiol.* **96** (2010) 101–107.
- [78] S.A. Mansour, A.-T. H. Mossa, Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc, *Pestic. Biochem. Physiol.* **96** (2010) 14–23.
- [79] S. Attia, Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with pancentromeric DNA probe, *Toxicology* **235** (2007) 112–118.

SUMMARY

ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES: TOXIC EFFECTS AND BIOANALYTICAL TESTS FOR EVALUATING TOXICITY DURING DEGRADATION PROCESSES

Mirjana B. Čolović¹, Danijela Z. Krstić², Vesna M. Vasić¹, Aleksandra M. Bondžić¹, Gordana S. Uščumlić³, Slobodan D. Petrović^{3,4}

¹University of Belgrade, Vinča Institute of Nuclear Sciences, Department of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, University School of Medicine, Institute of Chemistry, Belgrade, Serbia

³University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Department of Organic Chemistry, Belgrade, Serbia

⁴Hemofarm Group, Vršac, Serbia

(Professional paper)

Organophosphorus insecticides have been the most applied group of insecticides for the last two decades. Their main toxic effects are related to irreversible inactivation of acetylcholinesterase (AChE). Actually, they covalently bind to serine OH group in the enzyme active site forming phosphorylated enzyme that cannot hydrolyze acetylcholine. Organophosphorus insecticides in the environment undergo the natural degradation pathway including mainly homogeneous and heterogeneous hydrolysis (especially at high pH) generating non-inhibiting products. Additionally, thio organophosphates are easily oxidized by naturally present oxidants and UV light, forming more toxic and stable oxons. Thus, oxidative degradation procedures, generally referred as advanced oxidation processes (AOP), have been applied for their efficient removal from contaminated waters. The most applied bioassays to monitor the organophosphate toxicity, *i.e.*, the detoxification degree during AOP are *Vibrio fischeri* and AChE bioassays. *Vibrio fischeri* toxicity test exploits bioluminescence as the measure of luciferase activity of this marine bacterium, whereas AChE bioassay is based on AChE activity inhibition. Both bioanalytical techniques are rapid (several minutes), simple, sensitive and reproducible. *Vibrio fischeri* test seems to be a versatile indicator of toxic compounds generated in AOP for organophosphorus insecticides degradation. However, detection of neurotoxic AChE inhibitors, which can be formed in AOP of some organophosphates, requires AChE bioassays. Therefore, AChE toxicity test is more appropriate for monitoring the degradation processes of thio organophosphates, because more toxic oxo organophosphates might be formed and overlooked by *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition. In addition, during organophosphates removal by AOP, compounds with strong genotoxic potential may be formed, which cannot be detected by standard toxicity tests. For this reason, determination of incidence of micronuclei and cell proliferation index in cultivated human lymphocytes and fibroblasts is suitable for evaluation of organophosphorus insecticides and their break down products inducing cytogenetic damage.

Keywords: Organophosphorus insecticides • Acetylcholinesterase • Degradation • Advanced oxidation processes • Bioassays • Toxicity • Genotoxicity