

Artigo

Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase

Cavalcanti, L. P. A. N.; Aguiar, A. P.; Lima, J. A.; Lima, A. L. S.*

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (3), 739-766. Data de publicação na Web: 11 de fevereiro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Organophosphorous Poisoning: Treatment and Analytical Methodologies Applied in Evaluation of Reactivation and Inhibition of Acetylcholinesterase

Abstract: Organophosphorus derivatives inhibit the enzyme acetylcholinesterase promoting cholinergic hyperstimulation, irreversible damage and death. These compounds are used by civil and military organizations as pesticides or chemical weapons, respectively, and are responsible for over three million annual cases of poisoning, as well as more than 250,000 deaths per year from intentional self-poisoning, accounting 30% of suicides in the world. The organophosphorus sarin, soman, tabun and VX are been employed as weapons of war by different terrorist groups. Oxime derivatives (pralidoxime and obidoxima) have been used as antidote in detoxification step, but the results are still not satisfactory, because these drugs have low penetration into blood-brain barrier and an inefficient nucleophilic action against organophosphorus. Thus, different analytical methods can be used to monitor the efficiency of drugs with property to reactivate or inhibit the acetylcholinesterase enzyme. This paper provides an overview of the derivatives of oximes currently used as potential reactivators and inhibitors, as well as of the main methodologies used in monitoring or reactivation or inhibition of acetylcholinesterase.

Keywords: Organophosphorus; reactivation; acetylcholinesterase; oxime; inhibition.

Resumo

Derivados organofosforados (OPs) inibem a enzima acetilcolinesterase (AChE) acarretando hiperestimulação colinérgica, danos irreversíveis e morte. Estes compostos são utilizados no âmbito civil e militar, como pesticida e armas químicas, respectivamente, e são responsáveis por mais de três milhões de casos anuais de intoxicações, assim como mais de 250.000 mortes por ano a partir de auto-intoxicações intencionais, representando 30% dos suicídios no mundo. Os OPs sarin, soman, tabun e VX vêm sendo empregados como armas de guerra por diferentes grupos terroristas. Derivados de oxima (pralidoxima e obidoxima) agem como antídoto na etapa de detoxificação, porém os resultados ainda não são satisfatórios, pois estes fármacos possuem baixa penetração na barreira hematoencefálica e uma ação nucleofílica ineficiente frente a OPs. Assim, diferentes métodos analíticos podem ser utilizados para monitorar a eficiência de fármacos com propriedade de reativar ou inibir a enzima AChE. Este trabalho oferece uma visão geral dos derivados de oximas atualmente usados como potenciais reativadores e inibidores, assim como das principais metodologias utilizadas no monitoramento de reativação ou inibição de AChE.

Palavras-chave: Organofosforados; reativação; acetilcolinesterase; oxima; inibição.

* Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Grupo de Defesa Química e Biológica, Praça General Tibúrcio, 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ santoslima@ime.eb.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20160056](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160056)

Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase

Laura Patricio A. N. Cavalcanti,^a Alcino Palermo de Aguiar,^a Josélia Alencar Lima,^{a,b} Antônio Luis Santos Lima^{a,*}

^a Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Grupo de Defesa Química e Biológica, Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Universidade do Grande Rio, Escola de Ciências da Saúde, CEP 25071-202, Duque de Caxias-RJ, Brasil.

* santoslima@ime.eb.br

Recebido em 29 de julho de 2015. Aceito para publicação em 11 de fevereiro de 2016

- 1. Introdução**
- 2. Intoxicação por Organofosforados**
 - 2.1.** O sítio ativo da acetilcolinesterase como alvo molecular
- 3. Oximas: uso clínico, síntese e configuração espacial**
- 4. Métodos analíticos de avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase**
 - 4.1.** Potenciometria
 - 4.2.** Espectrometria de massas
 - 4.3.** Método fluorométrico
 - 4.4.** Teste de Ellman
 - 4.5.** Cromatografia em camada delgada
 - 4.6.** Ressonância magnética nuclear
 - 4.7.** Condutivimetria
- 5. Considerações finais**

1. Introdução

O Brasil está entre as dez maiores economias do mundo, sendo um grande produtor e exportador de mercadorias de diversos tipos, principalmente *commodities*

minerais, agrícolas e manufaturados. Em 2014, a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 193,5 milhões de toneladas. Todavia, atrelado ao aumento da produtividade agrícola, o acentuado consumo de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas transformou o Brasil em um dos líderes

mundiais no consumo destes produtos.¹ No ser humano, a exposição a agrotóxicos produz intoxicações agudas e doenças crônicas, assim como danos ambientais.

Dentre os agrotóxicos, os inseticidas OPs são responsáveis por mais de 2/3 das mortes. Estima-se que existam mais de três milhões de casos de intoxicações por inseticidas OPs e mais de 250.000 mortes por ano a partir de auto-intoxicações intencionais, o que representa 30% dos suicídios no mundo.² A maioria das exposições ocorre em sociedades agrárias, onde os OPs estão facilmente

disponíveis, e a exposição tóxica pode ocorrer por inalação, via transdérmica ou ingestão.³ Nesta classe de agentes também estão incluídos OPs altamente neurotóxicos, como soman, sarin, tabun e VX (Figura 1). Embora o uso destes agentes esteja proibido pela Organização das Nações Unidas (ONU), eles vêm sendo empregados como armas de guerra por grupos terroristas e por países que não assinaram a Convenção de Armas Químicas, da Organização para Proibição de Armas Químicas.⁴

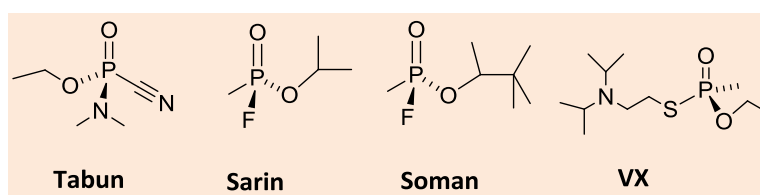


Figura 1. Estruturas de organofosforados empregados como armas químicas

O principal alvo para a ação desses agentes neurotóxicos é a enzima AChE, que controla as ações centrais e periféricas do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Os agentes OPs inibem irreversivelmente a AChE, que deixa de hidrolisar a ACh, levando a um acúmulo desta nas sinapses centrais e periféricas, promovendo hiperestimulação colinérgica, que resulta em broncorreia, fasciculação muscular e cardíaca, convulsões, depressão respiratória e morte.^{5,6}

O tratamento médico é difícil, uma vez que a melhor estratégia terapêutica não funciona para alguns desses OPs, seja inseticida ou gás de guerra. A estratégia terapêutica padrão para exposição aguda a OP inclui o uso de atropina (anticolinérgico), oximas (reativadores de AChE), benzodiazepínicos (anticonvulsivantes) e o monitoramento contínuo do paciente ao longo do tratamento.

As oximas atuam como nucleófilo desfosforilando a enzima inibida pelo OP. Após o trabalho de Wilson e Ginsburg,⁷ que reportaram a capacidade de reativação da pralidoxima (2-PAM), a qual ainda é a mais utilizada no processo de desintoxicação por

OP, diferentes oximas vêm sendo sintetizadas e avaliadas como reativadores de AChE.⁷⁻¹⁰ Um parâmetro limitante é a ocorrência do “envelhecimento” do complexo OP-AChE, que conduz a uma inibição da enzima tempo-independente irreversível no indivíduo. A velocidade da reativação espontânea da AChE é variável, o que contribui para as diferenças nas toxicidades agudas entre OPs, pois o tempo de meia-vida de envelhecimento dos complexos AChE humana – OP é variável (soman - 1,3 minutos; sarin - 3 h e tabun -13 h).⁸⁻¹⁰

Nas últimas seis décadas, vários grupos de pesquisa vêm investigando a síntese de diferentes derivados contendo o grupo oxima em busca de um reativador mais eficiente e universal para AChE inibida por OPs utilizados como agentes de guerra, mas apenas um discreto progresso foi alcançado.¹¹⁻¹⁹

A dificuldade de se obter um antídoto e o baixo custo de produção de armas químicas gera insegurança, em civis e militares, totalmente vulneráveis em casos de ataques terroristas ou expostos a defensivos agrícolas. Isto faz com que a defesa contra tais agentes assumam caráter prioritário, seja

no âmbito civil ou militar.

2. Intoxicação por Organofosforados

No Brasil, a subnotificação dos casos de intoxicações por defensivos agrícolas ocorre na ordem de 1:50, ou seja, em 50 casos de intoxicação apenas 1 é notificado. Adicionalmente, os casos crônicos originados pela exposição a longo prazo a estes compostos, dificilmente são divulgados.²⁰ A negligência aos cuidados necessários, e o elevado consumo de OP como defensivos agrícolas, favoreceram o aumento da

degradação ambiental e um número crescente de casos de intoxicações, atribuídos ao contato direto (manuseio e aplicação) ou indireto (ingestão de alimentos contaminados).²¹⁻²³

A análise estatística mais recente realizada pelo Ministério da Saúde (1999-2009) contabilizou 62 mil casos de intoxicações por defensivos agrícolas no Brasil, com aproximadamente 5.600 intoxicações por ano, resultando em 1876 casos de óbito. As regiões sul e sudeste apresentaram as maiores incidências (Figura 2).^{20,24} Em 2009, o Brasil foi classificado como o maior consumidor de defensivos agrícolas da América Latina, respondendo por 50% da quantidade comercializada.²⁵

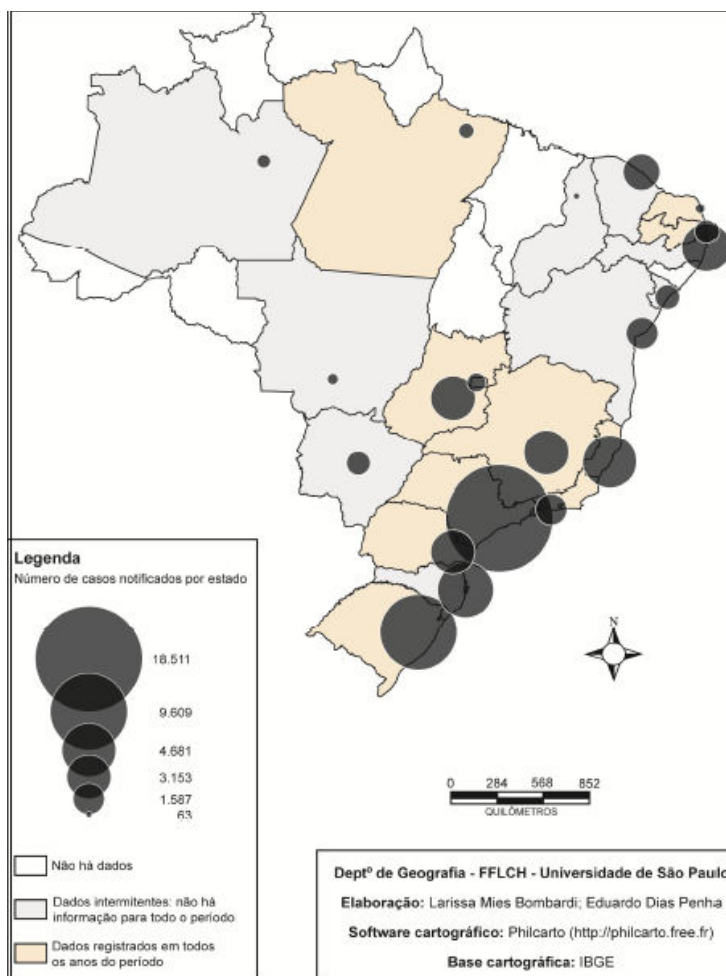


Figura 2. Número de casos de intoxicação ocasionada por defensivos agrícolas no Brasil entre 1999 a 2009²⁴

Embora apresentem alta toxicidade, OP como o dietil-4-nitrofenil-fosfato (etil-paraoxon), dimetóxi-tiofosforiltio succinato de dietila (malation) e di-isopropil-fosfluoridrato (DIPF) (Figura 3) continuam sendo amplamente utilizados na agricultura, principalmente nos países em

desenvolvimento.²⁶⁻²⁹ A alta toxicidade, a lipofilicidade, a volatilidade, a fácil manufatura e o baixo custo dos compostos OPs favorecem o emprego de alguns agentes dessa classe como arma de guerra química, por grupos terroristas, ao longo dos anos.³⁰⁻³²

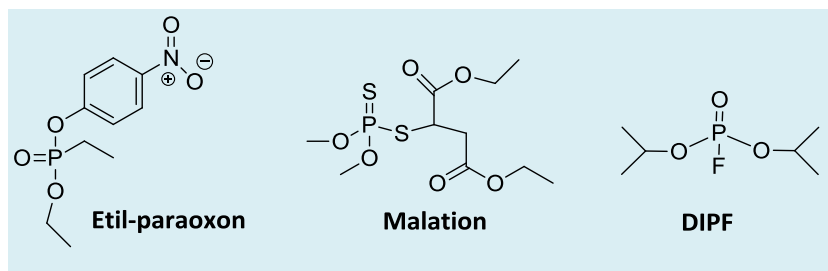


Figura 3. Estruturas de defensivos agrícolas

A volatilidade e a lipofilicidade facilitam a rápida penetração desses compostos pelas vias aérea e tópica, possibilitando absorção de uma razoável concentração. Além disso, a lipofilicidade os torna aptos a atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE) e produzirem toxicidade também no sistema nervoso central.

A inibição irreversível da enzima AChE é o mecanismo de ação básico destes compostos. Esta enzima, presente no sistema nervoso central e periférico, é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos por meio da hidrólise do neurotransmissor ACh. Esta enzima é classificada como uma serina hidrolase, cuja tríade catalítica é composta por resíduos dos aminoácidos serina, histidina e ácido glutâmico (AChE humana - Ser-203, Glu-334 e His-447; AChE *Torpedo californica* - Ser-200, Glu-327 e His-440), a qual é reconhecida como a principal unidade funcional.

A inibição pelo OP no sítio esterático (ativo) da enzima, ocorre com a ligação

covalente do átomo de oxigênio do aminoácido serina ao átomo de fósforo do OP (Figura 4).

Este processo acarreta o acúmulo do neurotransmissor nas junções sinápticas do sistema nervoso periférico e central ocasionando a síndrome colinérgica, a qual envolve uma superestimulação das estruturas inervadas pelas fibras colinérgicas (coração, glândulas, músculos lisos), caracterizada por miose, salivação, broncorreia, broncoconstrição, fasciculação, fraqueza muscular e convulsões, culminando em morte por depressão respiratória.^{5, 27, 28}

A inibição da AChE pelo OP pode conduzir ao envelhecimento da enzima devido a uma reação de desalquilação do OP ligado a enzima. Esta etapa resulta na formação de uma forte interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo da histidina da tríade catalítica protonado e o átomo de oxigênio do inibidor produzindo uma inibição irreversível.³¹

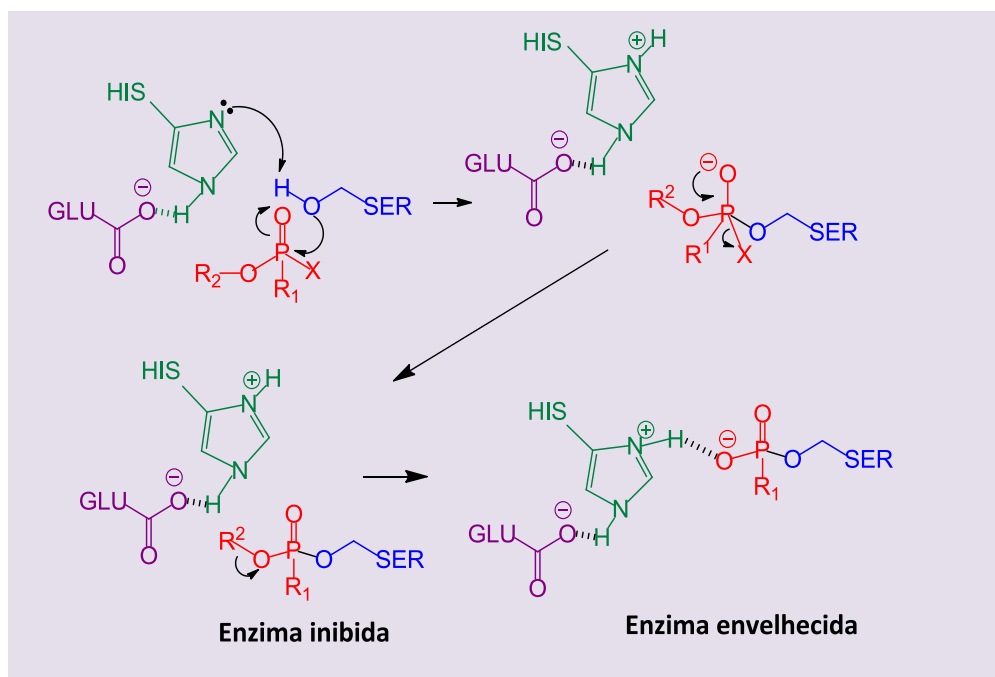


Figura 4. Esquema de inibição e envelhecimento da AChE por organofosforado

2.1. O sítio ativo da AChE como alvo molecular

Um dos grandes problemas em se encontrar um antídoto universal contra os agentes químicos de guerra, ou mesmo inseticidas mais comumente utilizados, reside nas características do sítio ativo da AChE e na expressão desta enzima, em suas diferentes isoformas, no corpo humano. Do mesmo modo que a atividade da AChE difere em vários órgãos, a ativação/inibição desta enzima é diferente em vários tecidos e é muito dependente do tipo de agente.³¹ Assim, há diferentes ações quando ocorre a interação OP-AChE: alguns deles agem mais periféricamente, enquanto as ações de outros são mais caracterizadas pelos seus efeitos centrais; e alguns parecem combinar as duas ações.³³⁻³⁷

A AChE apresenta algumas características particulares, como a organização do seu sítio ativo e mecanismo catalítico, não observadas em outras enzimas.³⁸ O sítio ativo desta enzima está localizado no fundo de um

estreito gargalo e consiste de quatro subsítios, **(1)** um carregado negativamente ou “sítio aniônico” (AS); **(2)** um sítio esterático (ES) contendo os resíduos catalíticos; **(3)** um sítio hidrofóbico (HS); **(4)** e um sítio que fica a 14 Å do sítio ativo, que é aniônico e conhecido como sítio “aniônico periférico” (PAS)^{39,40} (Figura 5).

O sítio “aniônico” (AS) está cerca de 4,7 Å distante do ES. O AS está envolvido na orientação correta da parte carregada da ACh que entra no sítio ativo, onde o grupo amônio quaternário da ACh interage eletrostaticamente com o resíduo Glu327 na AChE de *Torpedo californica* (Glu 334, na AChE de humano)^{42,43} O ES abrange o sítio ativo composto da tríade catalítica serina, glutamato e histidina, onde o resíduo serina ataca nucleofilicamente o carbono do grupo éster da ACh produzindo serina acetilada, a qual é posteriormente hidrolisada pela água no meio;⁴²⁻⁴⁶ o HS contíguo ao ES e AS é importante na interação com derivados cíclicos. No PAS, que está localizado a cerca de 20 Å do sítio ativo, interagem ligantes catiônicos ou neutros.⁴⁶



Figura 5. Identificação dos sítios da enzima AChE (*Torpedo californica*). (Adaptada de Soreq e Seidman, 2001)⁴¹

3. Oximas: uso clínico, síntese e configuração espacial

Atualmente, cinco oximas piridínicas (pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e HLö-7) são disponibilizadas para uso clínico

no tratamento de intoxicação por OPs (Figura 6). Entretanto, até o momento, nenhuma apresenta um espectro de atividade satisfatório frente a diferentes agentes neurotóxicos, sendo a melhor eficiência associada a OPs específicos. Esta limitação estimulam a síntese e avaliação de derivados mais eficientes na reativação de AChE.²³

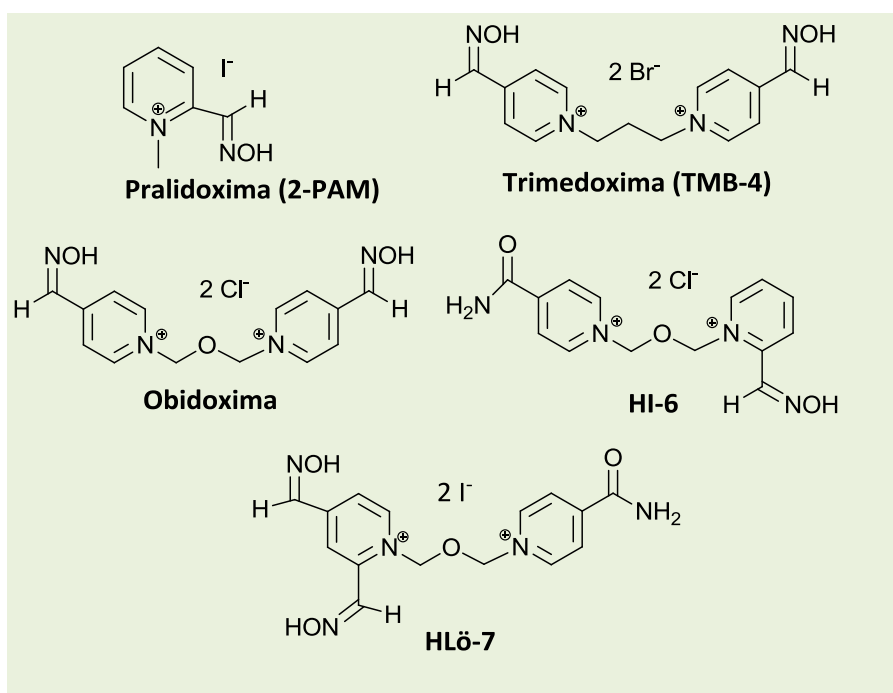


Figura 6. Estruturas de oximas em uso clínico

O sítio aniônico da AChE não é afetado pela inibição enzimática e pode contribuir no processo de reativação ligando a enzima à parte catiônica do reativador (2-PAM, por exemplo). A partir desta interação, a oxima fica mais próxima ao OP e estabelece uma reação de competição com o aminoácido serina da AChE. A reativação da enzima é

obtida a partir da ligação da oxima ao OP e o conseqüente rompimento da ligação deste com a enzima (Figura 7).⁷

O método padrão para a síntese de oximas consiste na adição nucleofílica de hidroxilamina a aldeído ou cetona (Figura 8) empregando meio alcoólico aquoso como solvente.^{17,47}

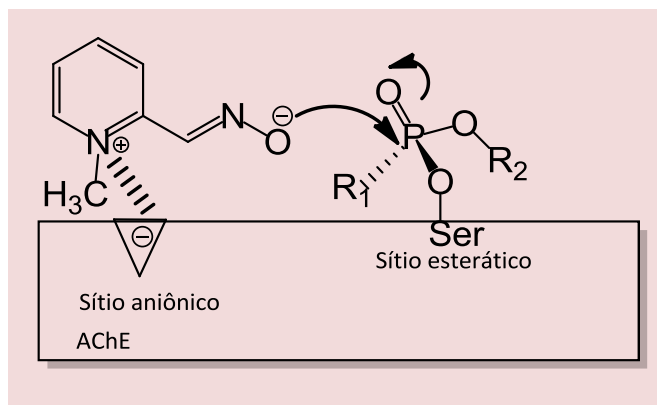


Figura 7. Esquema de desfosforilação da AChE pela 2-PAM

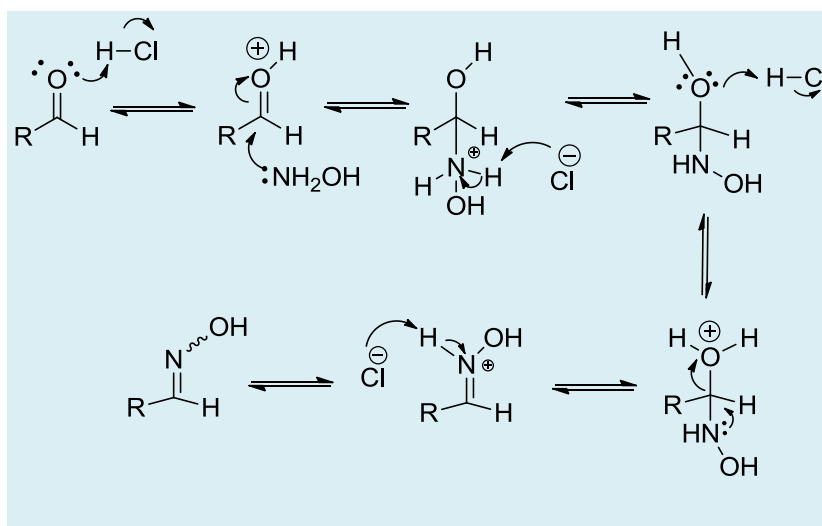


Figura 8. Esquema de intermediários para a formação de oximas a partir de aldeídos

Derivados neutros de ácido hidroxâmico ou oxima (Figura 9)^{17-19,48-50} são descritos como potenciais reativadores da enzima inibida, os quais favorecem a uma maior permeação através da barreira hematoencefálica. Nos últimos anos foi observado um uso crescente de compostos

contendo piridina quaternizada^{11,26} (Figura 6) como reativadores de AChE. Ainda que a literatura reporte eficiência de reativação maior que 60% para alguns destes derivados, a ação a OPs específicos e a sua toxicidade têm sido fatores limitantes no processo.

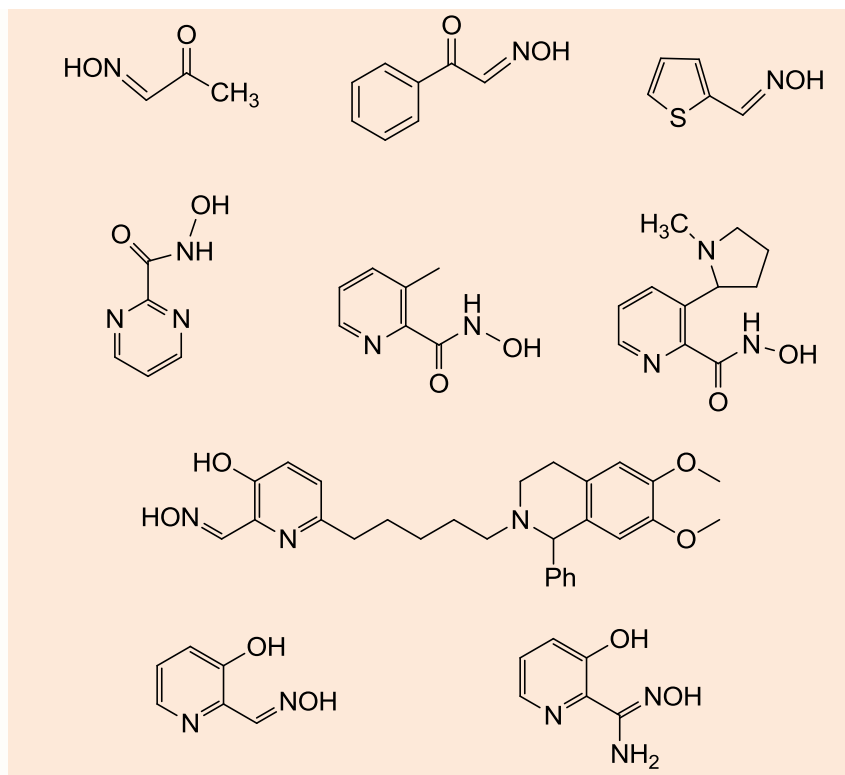


Figura 9. Exemplos de estruturas de reativadores neutros

Neste contexto, o estudo da correlação da estrutura dos antídotos *versus* atividade estabeleceu alguns requisitos importantes para favorecer a uma boa reativação, dentre os quais podem ser destacados: presença de anel piridínico quaternizado, o número de anéis piridínicos, a posição do grupo oxima na estrutura (*orto* ou *para*) e o tamanho do espaçador entre os anéis de piridina nos derivados biperidínicos.^{11,13,26}

As oximas originadas de aldeídos aromáticos frequentemente existem em duas

configurações denominadas de *Z* e *E*. A diferenciação destes isômeros pode ser feita por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, a partir dos deslocamentos químicos dos hidrogênios imínicos ($RCH=NOH$). O isômero *Z* possui um deslocamento químico do hidrogênio imínico menor do que o observado para o isômero *E*, sendo este resultado consequência da blindagem proporcionada pelo par de elétrons do nitrogênio (Figura 10).¹⁷

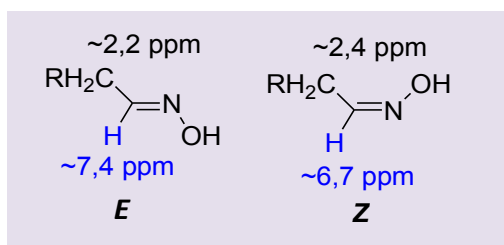


Figura 10. Deslocamentos químico dos hidrogênios imínicos nas aldoximas *E* e *Z*

O processo de inibição ou reativação da AChE é um parâmetro de interesse nas áreas

farmacêutica, alimentícia, agrícola e ambiental. A eficiência dos reativadores ou

inibidores pode ser monitorada por métodos potenciométrico, espectrométrico, fluorométrico, cromatográfico, titulométrico, condutivimétrico, biológico e imunoensaio, entre outros. Estas técnicas apresentam diferentes graus de sensibilidade, custo, e complexidade conforme está apresentado a seguir.

4. Métodos analíticos de avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase

Os métodos analíticos utilizados no monitoramento da inibição e reativação da AChE são ferramentas essenciais no desenvolvimento de antídotos. Estes métodos auxiliam tanto no monitoramento clínico de processos de intoxicação como na quantificação de pesticidas em alimentos, animais ou plantas (monitoramento ambiental).

Para a execução das análises, fatores como o pH do meio e a temperatura em que o ensaio é realizado são importantes e podem influenciar na atividade enzimática. A avaliação da reativação e inibição da AChE emprega uma faixa de pH entre 7,5 a 8,0 e temperaturas entre 20 °C a 40 °C. A seguir estão reportados alguns dos métodos mais utilizados.^{51,52}

4.1. Potenciometria

A potenciometria é uma técnica eletroquímica de detecção, a qual apresenta protocolos simples para tratamento da amostra, alta sensibilidade e utiliza equipamentos de baixo custo e de fácil operação. A técnica não emprega indicadores e possibilita a análise de amostras coloridas.

Esta técnica pode ser aplicada em sistemas de biosensores e é baseada na medida do potencial elétrico de amostras líquidas, fornecendo informações sobre íons ou gases dissolvidos na amostra, em função da alteração do pH ou do potencial.^{53,54}

A titulação potenciométrica utiliza um eletrodo indicador que interage com a espécie de interesse e o seu potencial reflete a atividade ou a concentração da espécie, e um eletrodo de referência que mantém o seu potencial constante, independente das propriedades da solução na qual está imerso.⁵⁴ Nesta técnica, a atividade da enzima pura (a_0) é obtida através da hidrólise da ACh, enquanto a eficiência de inibição (a_i) é determinada a partir da incubação da enzima com o inibidor. O substrato é adicionado ao meio, após inibição de 95 % da enzima, e mantido em contato por um período de 10 minutos. Após este período, a eficiência de reativação (a_x) é obtida a partir da titulação, enquanto a capacidade de reativação (% R) é calculada através da equação 1.^{54,55}

$$\%R = 1 - \frac{a_i - a_x}{a_0 - a_i} \times 100$$

Equação 1

a_i = eficiência de inibição

a_x = eficiência de reativação

a_0 = atividade da enzima pura

(Adaptado de Kassa *et al.* em 2012)⁵⁴

O primeiro ensaio potenciométrico, denominado de método Michel (1949),⁵³ avaliou a atividade de colinesterase presente

em plasma a partir da variação de pH. Este método dosou o ácido acético liberado a partir da hidrólise da ACh pela colinesterase

(Figura 11). Os valores de pH foram determinados através de um eletrodo sensível a acidez do meio e a atividade da enzima foi expressa em variação de pH por

hora ($\Delta\text{pH}/\text{hora}$).^{52,56} Esta técnica é uma das mais utilizadas no monitoramento de defensivos agrícolas no meio ambiente.⁵⁷

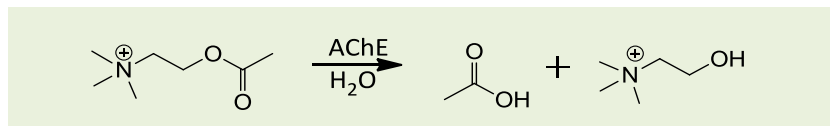


Figura 11. Reação de hidrólise da ACh catalisada pela AChE

A principal evolução desta técnica foi o desenvolvimento de novos sensores no monitoramento da inibição enzimática. Ivnitskii e Rishpon, em 1994, quantificaram a ação inibitória do defensivo agrícola diclorvós (limite de detecção de 0,2 a 1 μM) sobre a enzima AChE empregando um sensor com base na reação AChE/ATCh-ferricianeto (III).⁵⁶

Os autores imobilizaram a enzima AChE covalentemente com polietilenoimina e revestiu um eletrodo de carbono vítreo. O eletrodo contendo a enzima foi inserido em uma solução de diclorvós (em 100 mM de tampão citrato com pH 7,5) por 10 minutos para a inibição enzimática. O ferricianeto (III) atuou como mediador redox facilitando a reação AChE/acetiltocolina (ATCh). A atividade da AChE foi obtida a partir da taxa inicial de redução do ferricianeto (III) e determinada espectrofotometricamente a 420 nm.⁵³ Foi constatado maior sensibilidade

do eletrodo envolvendo reação redox comparado ao eletrodo sensível ao pH. As medidas foram conduzidas em meios com alta força iônica e tamponado, o que permitiu uma rápida interação do ferricianeto com a ATCh.⁵⁶

Em 1999, Mulchandani *et al.* empregaram um eletrodo de pH modificado a partir da imobilização de uma camada de uma enzima OP-hidrolase (OFH) formada pela ligação cruzada entre a albumina de soro bovino e glutaraldeído. A enzima OP hidrolase (OPH) é um catalisador biológico que tem a capacidade de hidrolisar diferentes ésteres OPs como pesticidas ou agentes de guerra química. A hidrólise catalítica destes compostos libera prótons, os quais são quantificados e correlacionados com a concentração do OP. Os ensaios apresentaram sensibilidade diferenciada para cada OP utilizado (Tabela 1).^{58,59}

Tabela 1. Sensibilidade do eletrodo potenciométrico modificado para diferentes organofosforados

Composto	Sensibilidade (mV)	Limite de detecção (μM)
Paraoxon	150,44	2
Metil-paration	68,99	2
Paration	64,96	2
Diazinon	53,18	5

(Adaptado de Mulchandani *et al.*, 1999)⁵⁸

Cuartero *et al.*, em 2012, investigaram a cinética da reação de hidrólise da ACh

catalisada pela AChE, empregando um eletrodo seletivo para ACh. Os autores

revestiram um eletrodo de íon seletivo comercial com uma membrana sintetizada a partir da reação de cloreto de polivinila, 2-nitrofenil-octil-éter e tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenil] borato de potássio. Os autores utilizaram a galantamina (Figura

12) como inibidor. Neste ensaio, os valores de pH variaram entre 5,8 - 8,9, e temperatura entre 22 °C a 43 °C. Os maiores valores de inibição foram obtidos para pH entre 7,5 e 8,1, enquanto a temperatura não influenciou o processo (Figura 12).⁶⁰

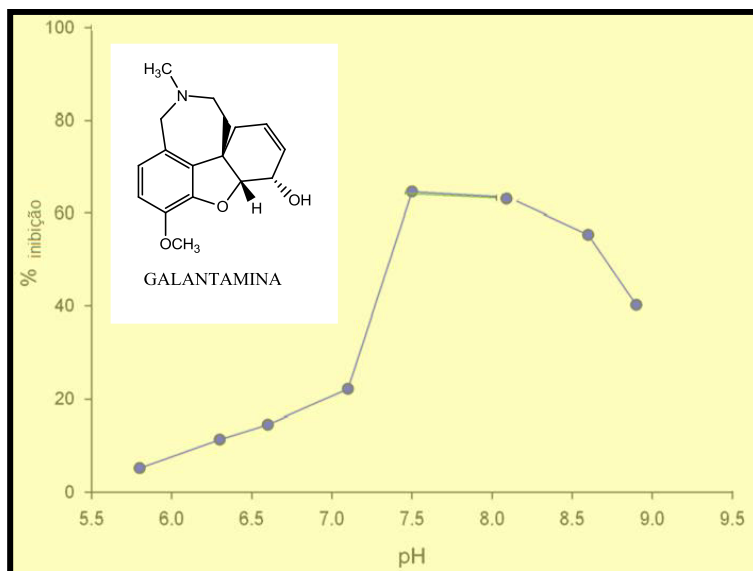


Figura 12. Estrutura da galantamina e curva da porcentagem de inibição. (28 °C, [ACh] = $4,0 \times 10^{-5}$ M, [AChE] = 0,3 U/mL). (Adaptado de Cuartero *et al*, 2012)⁶⁰

Kassa *et al.*, em 2012 utilizaram a técnica potenciométrica na avaliação *in vitro* da reativação de AChE de rato inibida por tabun. A capacidade de reativação da oxima K-203 (Figura 13) foi comparada a eficiência de diferentes oximas comumente utilizadas

(pralidoxima, obidoxima, trimedoxima e HI-6) (Figura 6). Os resultados obtidos indicaram que a oxima K-203 forneceu os melhores resultados nas concentrações 10^{-3} e 10^{-4} M (Tabela 2).⁵⁴

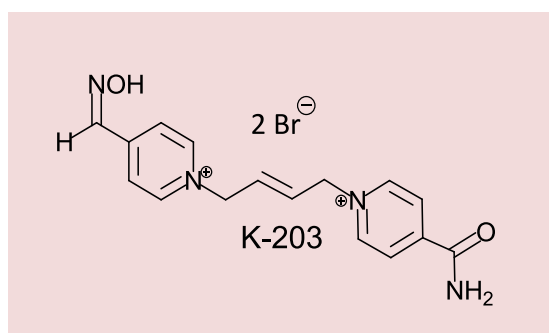


Figura 13. Estrutura da oxima K-203 com maior capacidade de reativação nos experimentos realizados por Kassa *et al.*⁵⁴

Tabela 2. Avaliação da capacidade de reativação de oximas empregando titulação potenciométrica*

Oxima	% reativação	
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
pralidoxima	4	1
obidoxima	37	34
trimedoxima	41	15
HI-6	2	6
K-203	55	51

(*) Tempos de inibição (30 min.) e reativação (10 min.); pH 7,6; T = 25 °C (Adaptado de Kassa *et al*, 2012)⁵⁴

4.2. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (EM) acoplada à técnicas de separação, como cromatografia líquida, ultrafiltração, imobilização de enzimas ou técnica de dessorção/ionização assistida por laser (MALDI) é utilizada na análise de enzimas inibidas por OPs, fármacos ou extratos de produtos naturais. Estas técnicas podem fornecer várias informações, como a massa molecular, a concentração do inibidor ou reativador, o número de ligações livres da enzima e do inibidor e a formação do complexo enzima-inibidor.^{61,62}

Estes métodos de análise são classificados como diretos ou indiretos. O método direto envolve a detecção por EM dos constituintes dissociados do complexo enzima-inibidor, enquanto no indireto a quantificação da atividade inibitória das substâncias ocorre em solução homogênea sem a necessidade de separação do complexo formado ou dos componentes isolados.⁶²

As técnicas de ultrafiltração e imobilização de enzimas são exemplos de métodos diretos. Na ultrafiltração ocorre a incubação da molécula-alvo com a amostra em uma câmara de mistura. A membrana de ultrafiltração retém o complexo enzima-

inibidor, enquanto as moléculas não ligadas são removidas por lavagens com água. Em seguida, o complexo enzima-inibidor é desfeito pelo tratamento com um agente orgânico ou pela alteração do pH, ou uma combinação de ambos. As moléculas do inibidor liberadas e transportadas através da membrana são analisadas por EM.⁶³

Cancilla *et al.* empregaram o método direto utilizando a imobilização de enzimas com o objetivo de rastrear inibidores enzimáticos a partir de misturas complexas. Inicialmente, os constituintes da mistura foram identificados por EM. Em seguida, a mistura de inibidores foi incubada com excesso de enzima sob condições específicas (tampão, pH e temperatura) de modo a garantir a conexão dos sítios de ligação. A mistura enzima-inibidor foi centrifugada e uma alíquota do sobrenadante foi analisada por EM. As substâncias com atividade inibitória foram identificadas por comparação dos espectros, antes e após a incubação com a enzima imobilizada. Nesta metodologia a não ocorrência de inibição não altera a intensidade dos íons após a incubação. Este fato está associado com a não variação da concentração do inibidor livre em solução durante o experimento.⁶⁴

Os métodos indiretos quantificam a atividade inibitória de substâncias

empregando sistemas de fluxo contínuo, análise de injeção de fluxo, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou ionização-dessorção assistida por laser (MALDI) acopladas a espectrometria de massas.^{61,62}

A literatura reporta o uso da técnica de dessorção-ionização sobre silicone (*desorption-ionization on silicon - DIOS*) na identificação de inibidores seletivos de enzima. Os potenciais inibidores foram avaliados em função da habilidade em desacetilar a AChE ao investigar a razão de produto (colina e ACh) na presença ou ausência do inibidor. A Figura 14 apresenta o resultado do ensaio de inibição de AChE pela tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina) na concentração de 31 nM e tempo de

incubação de 10 min., no qual é evidente a redução na intensidade do pico associado colina.⁶²

Em 2014, Ryu *et. al.* quantificaram a atividade inibitória do extrato bruto de sementes de *Garcinia mangostana* utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a EM. A análise por cromatografia líquida de um extrato contendo dez substâncias indicou que após a incubação com AChE ocorreu uma redução na intensidade de seis destes picos. Este resultado indicou a interação destes compostos com a AChE, os quais foram identificados por EM. A Figura 15 apresenta a estrutura dos seis inibidores com os respectivos valores de concentração inibitória média (IC_{50}).⁶¹

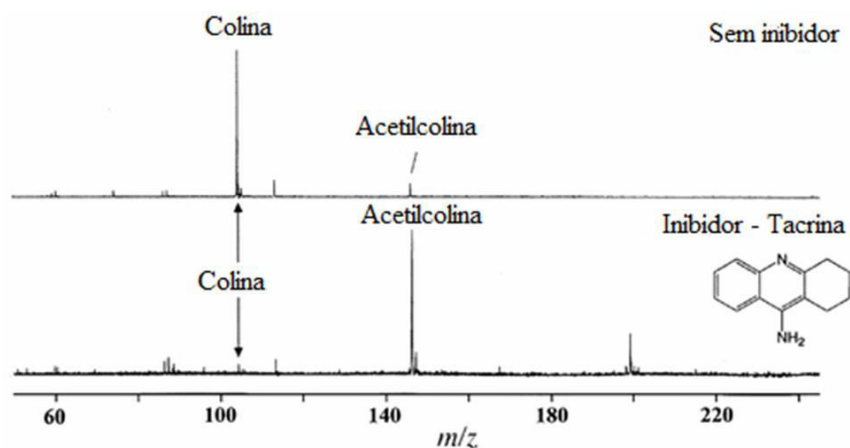


Figura 14. Monitoramento do processo de inibição da enzima AChE pela técnica de dessorção – ionização acoplada a espectrometria de massas. (Adaptado de Boer *et al.*, 2007)⁶²

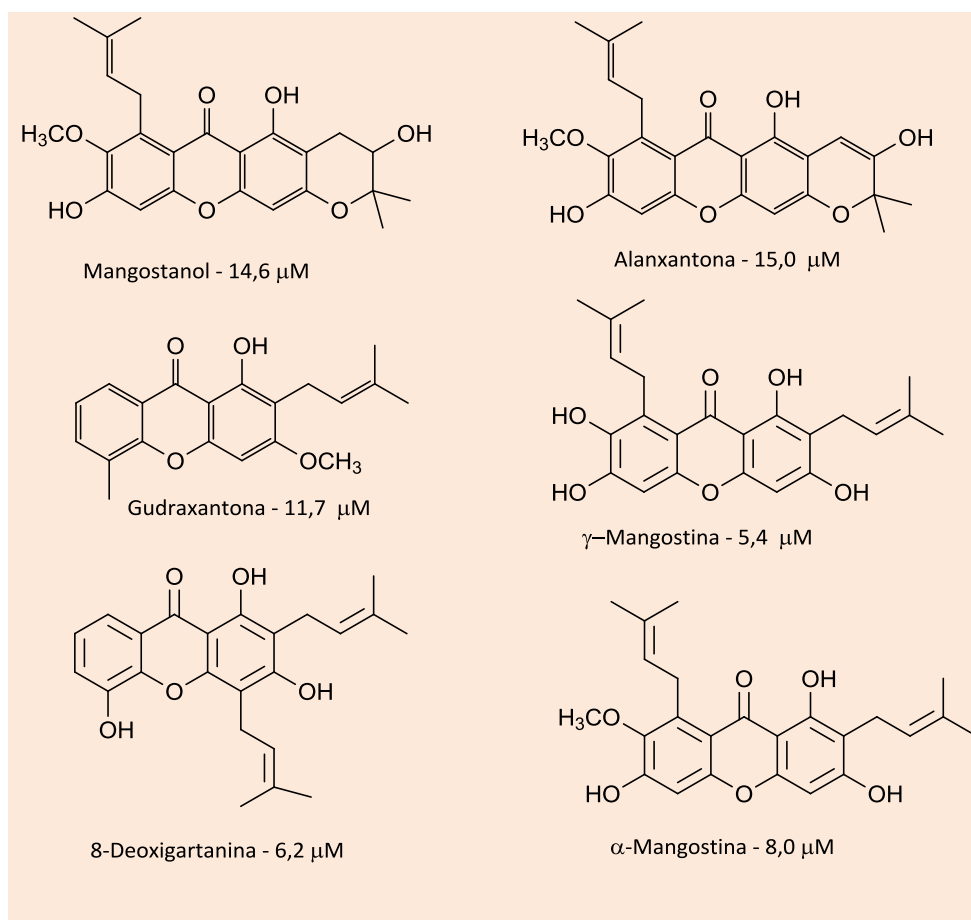


Figura 15. Compostos com atividade inibitória presentes em extrato de *Garcinia mangostana* e seus valores de IC_{50} ⁶¹

4.3. Método Fluorométrico

A análise fluorométrica é utilizada na avaliação qualitativa ou quantitativa das interações ligante-receptor envolvendo substâncias fluorogênicas. Neste método, o produto de hidrólise da enzima, por exemplo tiocolina, reage com um substrato fluorogênico produzindo um derivado que emite fluorescência, o qual pode ser analisado (quantificado) com o emprego de um espectrofotômetro de ultravioleta. A alta sensibilidade, baixo custo e precisão são algumas características desta técnica, a qual apresenta maior sensibilidade que os métodos colorimétricos.^{65,66}

Parvari *et al.*⁶⁷ desenvolveram um ensaio microfluorométrico para investigar a atividade de AChE obtida a partir de tecidos de cérebro de rato. A atividade enzimática foi

quantificada pelo monitoramento da tiocolina produzida pela hidrólise específica de ATCh.

As reações de hidrólise foram conduzidas a 19 °C em pH 7,5 e o meio reacional foi constituído de 100 μL de Tris-HCl (50 mM), 0,12 M de NaCl, 3 mM de ATCh e 10 – 40 μL do extrato de cérebro de rato. No tempo indicado, uma amostra de 5 μL foi retirada do meio reacional e adicionado a 5 μL de *N*-[4-(7-dietilamino-4-metilcumarin-3-il)-fenil] maleimida (0,4 mM) em isopropanol para amostras contendo diferentes quantidades de tiocolina (0,45 μM - 0,45 mM) obtida. Em seguida, 1 mL de Triton X-100 (1 mL) foi adicionado para cada amostra. Um derivado de cor azul foi produzido e a intensidade de emissão de fluorescência foi determinada usando um espectrofluorímetro (473 nm). Os autores determinaram uma atividade específica da enzima de 5 nmol de

tiocolina/min por miligrama de tecido.

Com o objetivo de comparar a atividade da enzima empregando diferentes métodos, os autores realizaram experimentos usando o método radiométrico. Ensaios nas mesmas condições experimentais com a enzima,

entretanto utilizando $[^3\text{H}]$ ATCh como substrato foram realizados. Os autores concluíram que o método espectrofluorimétrico apresentou uma sensibilidade 100 vezes maior comparada ao método radiométrico (Figura 16).⁶⁷

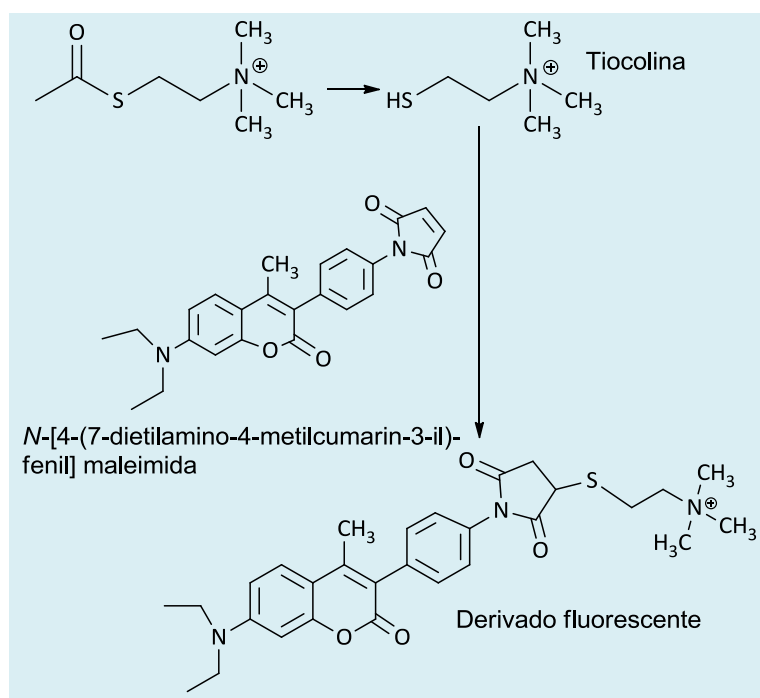


Figura 16. Produto fluorescente derivado de *N*-[4-(7-diethylamino-4-methylcoumarin-3-yl)-fenil] maleimida. (Adaptado de Parvari, et. al. 1983)⁶⁷

Guilbault *et. al.*⁶⁸ utilizaram a técnica fluorométrica para avaliar compostos inibidores (fosforotiolato de *O,O* dietil *S*-[2-(etil)etila] e tiosfato de *O,O* dietila 4-nitro-fenila) (Figura 17) de AChE imobilizada em pedaços de espuma de poliuretano. Nesta técnica, duas diferentes abordagens são possíveis, uma envolve o acoplamento do produto da reação da enzima (por exemplo, AChE) com um composto fluorescente, enquanto outra envolve a conversão direta de um substrato em um produto fluorescente pela enzima. Neste caso, os autores empregaram o etanoato de 1- ou 2-naftila (substratos fluorogênicos) (Figura 17), os quais reagiram com a tiocolina, obtidos pela hidrólise da ATCh, produzindo 1-naftol e 2-naftol, respectivamente.

Os autores observaram que os ésteres de naftila não são fluorescente, enquanto o naftol apresenta intensa fluorescência. A variação da fluorescência da solução esta associada a produção de 1-naftol ($\lambda_{\text{emissão}} = 460$ to $470 \mu\text{m}$) e 2-naftol ($\lambda_{\text{emissão}} = 410 \mu\text{m}$), a qual é quantificada e correlacionada com a atividade da enzima. Os autores postularam que o sistema fluorométrico desenvolvido pode ser aplicado para ensaios empregando compostos anticolinesterásicos presentes em diferentes matrizes (por exemplo, água ou ar). A inibição da enzima (AChE) interrompe a reação de hidrólise do éster produzindo um decaimento na fluorescência da solução a valores próximo a zero, pois a produção do naftol é interrompida.⁶⁸

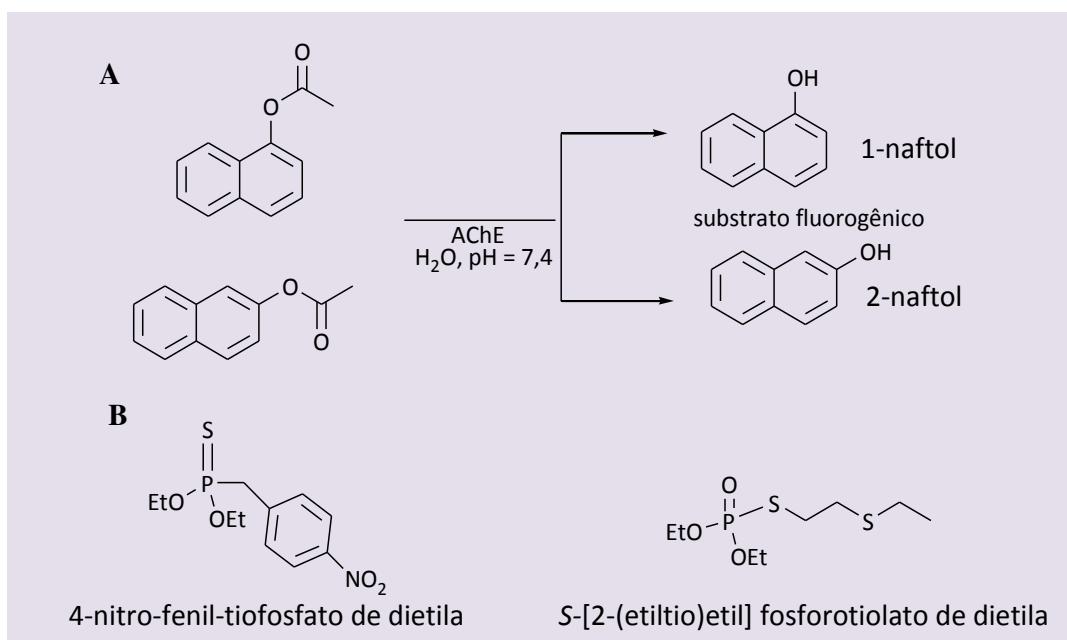


Figura 17. A- Reação de obtenção dos substratos fluorogênicos derivados do ésteres de naftol. B- Estruturas de inibidores fosforados usados por Guilbault. (Adaptado de Guilbault, *et. al.* 1983)⁶⁸

Rhee *et al.*, em 2003, identificaram a atividade inibitória de diferentes extratos de plantas (*Galanthus nivalis*, *Eucharis amazônica*, *Crinum powelli* e *Nerine bowdeni*) empregando análise fluorométrica.⁶⁶ Os ensaios foram realizados em sistema de fluxo com um derivado de quinolina quaternizada (iodeto de 7-acetóxi-1-metil-quinolínio), o qual é hidrolisado para 7-hidróxi-1-metil-quinolínio - Figura 18).

O eluente (50 mM de tampão fosfato ou metanol 30%), a enzima (0,1 U/mL) e o substrato (1,5 μM) foram inseridos no reator e uma alíquota de galantamina (controle) ou o extrato da planta, ambos em metanol 30%,

foram injetados automaticamente no reator do sistema de fluxo. Após 10 minutos, foi realizada quantificação do derivado fluorescente através de um HPLC com detector de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}} = 505 \text{ nm}$) conectado em linha no sistema de fluxo.

As análises dos extratos apresentaram picos negativos indicando a inibição enzimática, os quais estão associados com a redução da intensidade da fluorescência da solução. O limite de detecção da galantamina foi 0,5 μM, apresentando sensibilidade 20 vezes maior que nos ensaios com detecção por UV (limite 12 μM) (Tabela 3).^{66,69}

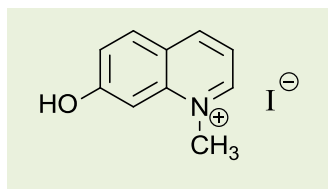


Figura 18. Estrutura do derivado de quinolina fluorescente utilizado por Rhee *et al.*⁶⁶

Tabela 3. Porcentagem de inibição da AChE por diferentes extratos de plantas, utilizando o ensaio fluorométrico em sistema de fluxo

Amostra	(%) inibição
<i>Galanthus nivalis</i> ,	96
<i>Eucharis amazônica</i> ,	89
<i>Crinum powelli</i>	89
<i>Nerine bowdeni</i>	71
<i>Tropaeolum tuberosum</i>	1

*Em todos os casos, a parte da planta avaliada foi o bulbo (Adaptado de Rhee *et al.* em 2003)⁶

Recentemente, Wang *et al.* investigaram a atividade inibitória de AChE empregando derivados de tetrafeniletileno e miristoilcolina através de um novo ensaio fluorométrico baseado no recurso de emissão por agregação induzida (EAI). Esta agregação é um fenômeno fotofísico associado a um grupo de moléculas, as quais quando dissolvidas em um bom solvente não apresentam emissão, entretanto quando agregadas em um meio em que apresentam baixa solubilidade são altamente luminescentes. Os autores empregaram os

derivados de tetrafeniletileno, pois estes apresentaram uma fraca emissão em solução, porém foram fortemente luminescentes após agregação. A AChE hidrolisou a miristoilcolina, formando miristato e colina, a qual em presença do derivado de tetrafeniletileno contendo dois grupos sulfonatos formou um complexo fluorescente (Figura 19).⁷⁰ A presença de inibidores da enzima reduziram a hidrólise da miristoilcolina diminuindo a intensidade da fluorescência.

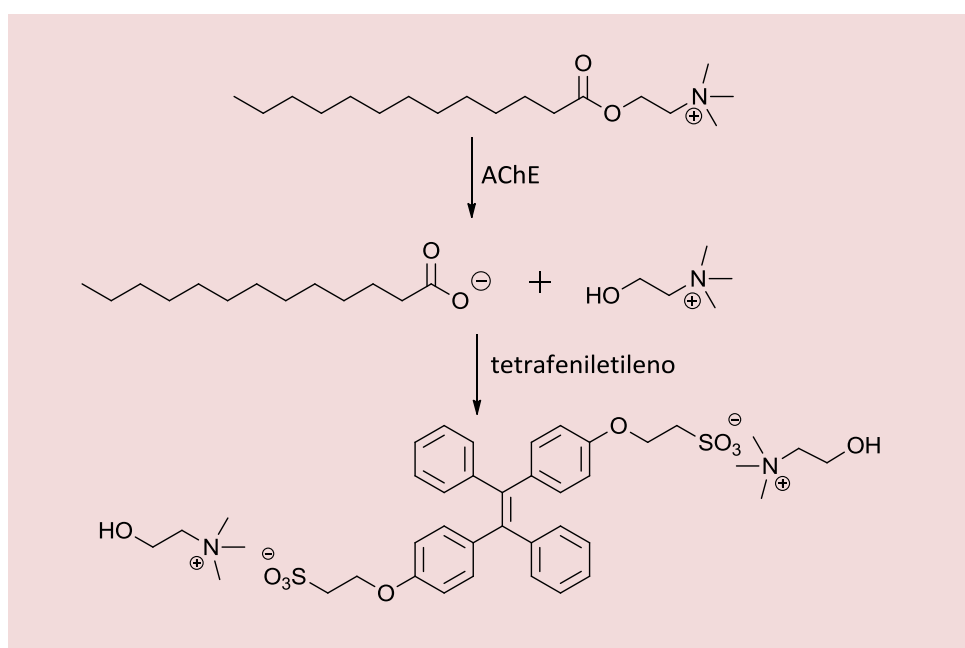


Figura 19. Reação de formação do derivado fluorescente de tetrafeniletileno (Adaptado de Wang *et al.* em 2014)⁷⁰

A alta luminescência das substâncias permitiu uma melhor detecção e quantificação por espectrofotometria. A eficiência de inibição (Ei) foi obtida através da Equação 2.⁷⁰ O método fornece alta

sensibilidade e seletividade podendo detectar concentrações baixas da AChE (2 U/mL).⁷⁰ Os ensaios de inibição foram conduzidos empregando tacrina.

$$Ei = \frac{F_{(inibidor)} - F_{(sem\ inhibidor)}}{F_0 - F_{(sem\ inhibidor)}}$$

Equação 2

$F_{(inibidor)}$ - valor da intensidade de fluorescência da enzima contendo o inibidor,
 $F_{(sem\ inhibidor)}$ - valor da intensidade de fluorescência da enzima sem o inibidor
 F_0 - valor do "branco" (sem a enzima e sem o inibidor) na região de 490 nm.
 (Adaptado de Wang *et al.* em 2014)⁷⁰

4.4. Teste de Ellman

O teste de Ellman é o método mais utilizado na avaliação da reativação e inibição de AChE. Este método é facilmente adaptável à maioria dos espectrofotômetros ou leitores de microplacas, permitindo uma rápida avaliação de grande número de amostras. O método fornece uma relação direta entre a atividade enzimática e a leitura espectrofotométrica, ou seja, o aumento da absorbância é diretamente proporcional à

atividade da enzima (lei de Lambert-Beer).⁷¹

A metodologia de quantificação da atividade da AChE envolve a formação de um composto colorido (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico). A enzima reativada é capaz de hidrolisar a ATCh, produzindo a tiocolina, que reage com o reagente de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), produzindo um ânion de cor amarela (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico), o qual é detectado na região de UV-Vis a 412 nm (Figura 20).⁷¹

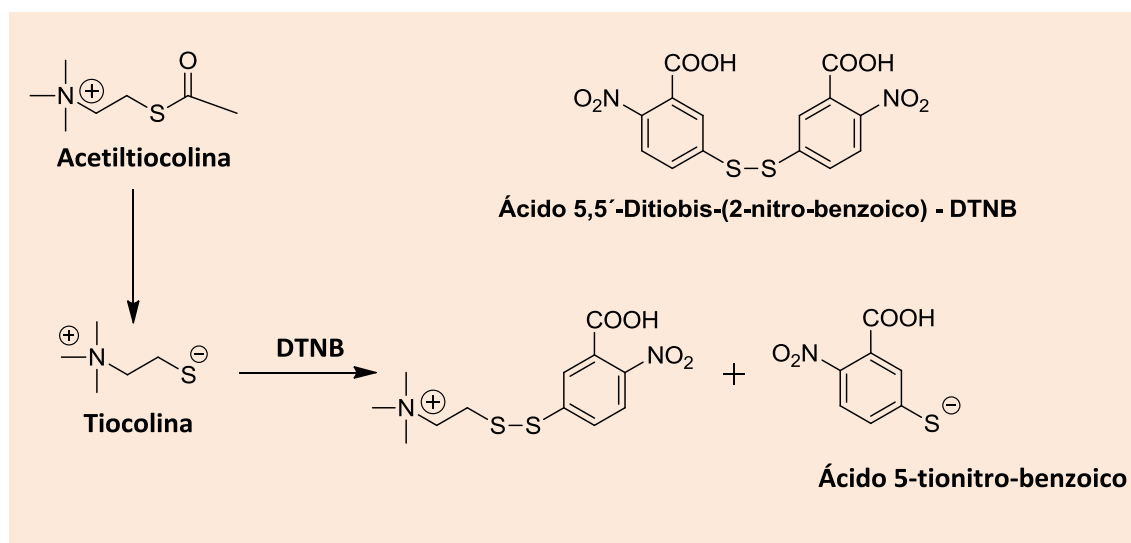


Figura 20. Esquema da reação de formação do ácido 2-nitro-5-tiobenzoico ⁷¹

Kuca *et al.* em 2010 empregaram esta metodologia para quantificar a capacidade de reativação das oximas k-27 e k-48 frente a enzima inibida por VX, as quais tiveram eficiências de reativação de 20 % e 60 %,

respectivamente. Os resultados indicaram que a oxima k-48 apresentou melhor resultado de reativação (~60 %) comparada pralidoxima (~40 %), porém inferior a obidoxima (80 %) (Figura 21).⁷²

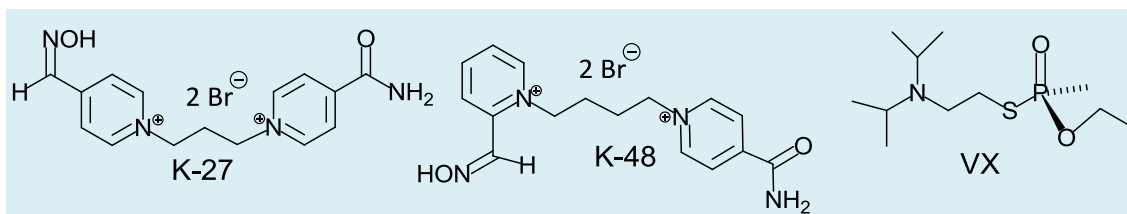


Figura 21. Oximas e organofosforado utilizados nos testes de Ellman conduzidos por Kuca *et al.*⁷²

4.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica baseia-se no método de Ellman, modificado por Rhee *et al.*⁷³ para a análise qualitativa da inibição da AChE. Emprega-se uma fase estacionária constituída de uma camada delgada de sílica depositada sobre uma placa de vidro ou uma folha de alumínio. A amostra é aplicada na placa cromatográfica e eluída. Duas placas devem ser preparadas, uma para o teste de Ellman e a outra para ser aspergida com o revelador específico para os compostos em análise (substância pura ou extrato vegetal).

Na placa destinada ao teste de Ellman, uma solução de ATCh/DTNB (1:1) é aspergida por toda a placa. Após secagem, a enzima (3 U/mL) é aspergida deixando-a completamente amarelada, consequência da hidrólise do substrato e interação deste com o reagente de Ellman. O aparecimento de halos brancos indicam a presença de substância com capacidade inibição.^{73,74} Estes halos são associados aos seus fatores de retenção (Rf), obtidos através da razão entre

as distâncias percorridas pela amostra e solvente.

Compara-se, então, os Rfs nas duas placas, podendo-se identificar o(s) constituinte(s) com capacidade inibitória.^{74,75} O limite de detecção das amostras neste método envolveu uma massa entre 0,5 a 0,01 µg, utilizando AChE (3 U/mL), assim este resultado demonstrou que o método foi mais sensível do que a detecção por UV (>0,8 a 0,05 µg).⁷³

Yang *et al.*, em 2010, otimizou esta técnica viabilizando o emprego de menores volume de enzima (1 U/mL). Neste método adaptado, a enzima converteu o acetato de 4-metóxi-fenila em 4-metóxi-fenol, o qual reagiu com uma solução de ferricianeto de potássio e cloreto férrico hexa-hidratado produzindo uma coloração azul-marinho na placa cromatográfica. As regiões da placa contendo inibidores da AChE produziram halos levemente amarelados. A técnica apresentou uma boa sensibilidade frente a dois inibidores de AChE conhecidos, a huperzina A (0,0001 µg) e fisostigmina (0,001 µg) (Figura 22).⁷⁶

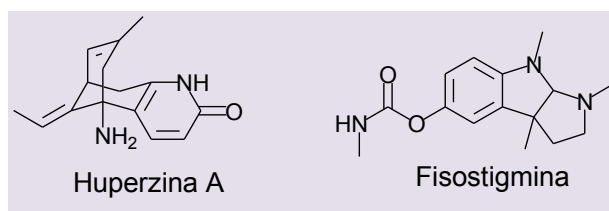


Figura 22. Estruturas dos inibidores da AChE: huperzina A e fisostigmina

A CCD também pode ser utilizada de forma eficiente para avaliar substâncias puras. Em 2014, nosso grupo de pesquisa investigou a capacidade de oximas neutras inibirem a AChE de *Electrophorus electricus* (*eel*) através da técnica modificada por Rhee *et al*⁷³. Neste ensaio, foram empregadas 2 μ L da solução de dez oximas (Figura 23) em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,1 mM,

1 mM, 10 mM e 100 mM). O OP etil-paration (0,01 mM = 0,0058 g) e o fármaco pralidoxima (0,1 mM = 0,027 g) foram utilizados como controles (Figura 23). Os resultados obtidos indicaram que todas as oximas na concentração de 100 mM (30 μ g) inibiram a AChE, assim como o derivado da amidoxima (6) apresentou inibição em todas as concentrações investigadas.

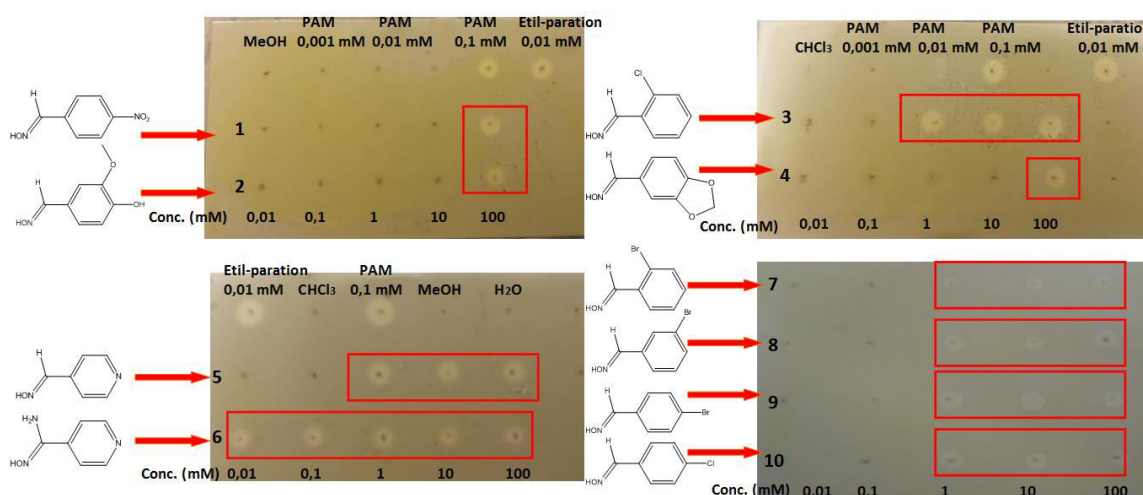


Figura 23. Inibição (halos brancos) da AChE de *Electrophorus electricus* por oximas neutras

4.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O método de análise de inibição e reativação da AChE por RMN de ^1H foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Química Medicinal do Instituto Militar de Engenharia.¹⁷ Neste experimento, a atividade enzimática foi quantificada a partir da integração dos hidrogênios das metilas da AChE (δ 2,24) e do acetato formado (δ 2,16), os quais foram produzidos na reação de hidrólise do neurotransmissor (ACh)

catalisada pela enzima.

Soares *et al.* avaliaram a atividade de inibição por oximas neutras e reativação de AChE de *Electrophorus electricus* (Tabela 4) através da espectrometria de RMN de ^1H (Figura 24).¹⁷ No ensaio de reativação da AChE inativada com paraoxon foram usados derivados de benzaldoxima *para*-substituídos (NO_2 , OCH_3 , F, Cl) de modo a dimensionar a influência da natureza do substituinte. Uma aldoxima heteroaromática (2-tiofenoaldoxima) foi selecionada com a finalidade de comparar os resultados de reativação nos experimentos monitorados com teste de

Ellman e RMN de ^1H . Esta aldoxima apresentou uma reativação (93%) de AChE humana maior que 2-PAM (83%) nos ensaios monitorados com o teste de Ellman, sendo estes resultados divergentes dos obtidos empregando a técnica de RMN de ^1H , os quais apresentaram valores de reativação de 8,02% e 97,40% (Tabela 4). Os ensaios de reativação da enzima inibida com paraoxon empregando as oximas neutras produziram uma baixa eficiência (Tabela 4) comparada a 2-PAM (97%) usada como controle (Tabela 4).¹⁷

Os autores postularam que o monitoramento por RMN de ^1H pode ser mais preciso, considerando que esta técnica pode diferenciar os produtos e inibidores

envolvidos na reação sem a necessidade de qualquer substrato fluorogênico ou enzima adicional comparado a outras metodologias (por exemplo, teste de Ellman).¹⁷

Os autores acreditam que o uso de RMN no monitoramento da inibição e reativação da enzima pode ser mais apropriado que o teste de Ellman, o qual utiliza ATCh ao invés de ACh e tal substituição poderia influenciar no resultado, visto que estes substratos podem envolver interações moleculares diferenciadas. Em adicional, esta técnica pode ser influenciada caso um inibidor ou reativador da enzima possua absorções na mesma região do ácido 5-mercaptoparaoxon (UV-Vis), usado no teste de Ellman.¹⁷

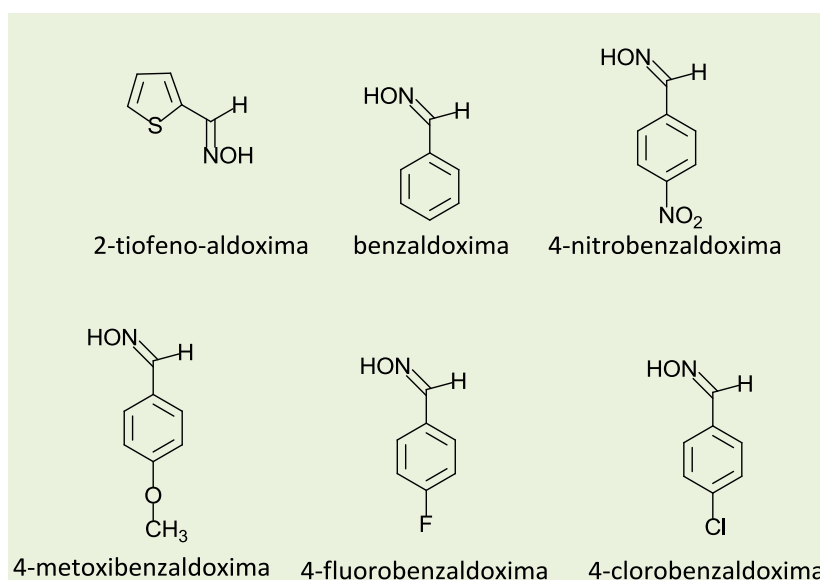


Figura 24. Oximas neutras utilizadas no ensaio de avaliação da reativação da AChE por RMN de ^1H

Tabela 4. Quantificação do percentual de inibição e reativação empregando RMN

Oximas	(%) inibição de AChE*	(%) reativação de AChE-paraoxon**
2-pralidoxima	34	97,40
2-tiofeno-aldoxima	61	8,02
benzaloxima	37	10
4-nitrobenzaloxima	0	6,61
4-metoxibenzaldoxima	4	7,60
4-fluorobenzaldoxima	1	4,04
4-clorobenzaldoxima	22	4,42

(*) tempo de reação= 30 min.; (**) tempo de reação = 85 min (Adaptado de Soares *et al.* em 2013).¹⁷

4.7. Condutivimetria

Esta técnica tem como fundamento a medida da condutividade da amostra, ou seja, a capacidade da solução de conduzir a corrente elétrica, sendo diretamente proporcional à concentração de íons presentes na solução.⁵⁷ O método consiste no uso de um condutivímetro para detectar a atividade da AChE na reação de hidrólise da ACh produzindo acetato e colina. O aumento da condutividade da solução é registrada por um transdutor condutimétrico.^{53,75} Um biossensor detecta o sinal de 1 mM de ACh

na célula experimental e seu valor é ajustado para 100%. Em seguida, a amostra contendo o inibidor é inserida na célula promovendo uma diminuição da resposta do biossensor.⁷⁷

Soldatkin *et al.*⁷⁷ investigaram a inibição da AChE pela micotoxina aflatoxina B1 (Figura 25). Os autores plotaram uma curva analítica empregando diferentes concentrações de micotoxina (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 µg/mL) *versus* atividade enzimática. Os resultados apresentaram uma atividade inicial de 100 % (sem inibição), a qual foi reduzida sistematicamente até alcançar uma atividade final de 45%.

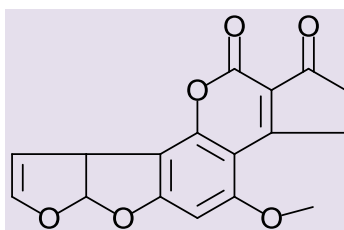


Figura 25. Estrutura da micotoxina aflatoxina B1

5. Considerações finais

Apesar das restrições ao uso de derivados OPs como armas químicas, estas substâncias ainda são armas de primeira escolha de grupos terroristas. Além disso, o número crescente de casos de intoxicação por defensivo agrícola (OP) despertam o interesse dos grupos de pesquisa para a investigação de agentes capazes de reativar a enzima AChE inibida por OP e para o desenvolvimento de métodos de monitoramento da reativação ou inibição desta enzima.

Até o momento, derivados de oxima são utilizados como principais agentes de reativação. No entanto, muitos apresentam baixa penetração na barreira hematoencefálica ou uma ação limitada a OPs específicos. Neste aspecto, pesquisas com foco na síntese de novos antídotos

eficazes no processo de reativação de AChE são estratégicas.

Os métodos analíticos de avaliação da inibição e reativação da enzima AChE compõe um conjunto de procedimentos importantes. Estes métodos podem contribuir no monitoramento clínico envolvendo intoxicação humana por OP, quer seja no âmbito civil ou militar, ou mesmo originada por contaminação ambiental (pesticidas em alimentos, animais e plantas). Dentre os métodos analíticos relatados nesta revisão destinados a avaliação da inibição e/ou reativação, a cromatografia em camada delgada (qualitativo), a titulometria potenciométrica e o teste de Ellman (ambos quantitativo) são os mais utilizados. A facilidade de acesso a estas técnicas, o baixo consumo de reagentes, rapidez de análise e a sensibilidade são parâmetros determinantes no processo.

Referências Bibliográficas

- ¹ Faria, N. M. X.; Fassa, A. G.; Facchini, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência e Saúde Coletiva* **2007**, *12*, 25. [CrossRef]
- ² Carey, L.; Dunn, C.; Gaspari, R. J. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2013**, *189*, 403. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Eyer, P. Dawson, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* **2008**, *371*, 597. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S. R.; Oliveira Silva, J.; Riehl C. A. S.; Figueroa-Villar, J. D. The effect of neutral oximes on the reactivation of human acetylcholinesterase inhibited with paraoxon. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23*, 1216. [CrossRef]
- ⁵ Tafuri, J.; Roberts, J. Organophosphate poisoning. *Annals Emergency Medicine* **1987**, *16*, 193. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Holmstedt, B. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacological Reviews* **1959**, *11*, 567. [PubMed]
- ⁷ Wilson, I. B.; Ginsburg, S. A powerful reactivator of alkylphosphateinhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1955**, *18*, 168. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Vale, A.; Marrs, T. C.; Rice, P. Chemical terrorism and nerve agents. *Medicine* **2012**, *40*, 77. [CrossRef]
- ⁹ Nurulain, S. M. Efficacious oxime for organophosphorus poisoning: a minireview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2011**, *10*, 341. [CrossRef]
- ¹⁰ Petroianu, G. A.; Lorke, D. E. Pyridinium oxime reactivators of cholinesterase inhibited by diisopropyl-fluorophosphate (DFP): Predictive value of *in vitro* testing for *in vivo* efficacy. *Mini Reviews of Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 1328. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Kuca, K.; Juna, D.; Musilek, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 269. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Kuca K.; Cabal J.; Jun, D.; Hrabínova.; Kassa, J. *In vitro* reactivation potency of newly developed oximes K027 and K048. *Türk Hij Den Biyol Dergisi*, **2006**, *63*, 1. [Link]
- ¹³ Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Design, evaluation and structure–activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Medicinal Research Reviews* **2011**, *31*, 548. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Garcia, G. E.; Campbell, A. J.; Olson, J.; Moorad-Doctor, D.; Morthole, V. I. Novel oximes as blood–brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187*, 199. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Zhang, J.; Cashman, J. R. Amidine-oximes: reactivators for organophosphate exposure. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 3319. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Cashman, J. R. Nonquaternary reactivators for organophosphate-inhibited cholinesterases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 465. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Soares, S. F. C. X.; Vieira, A. A.; Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. NMR determination of *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase inhibition and reactivation by neutral oximes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 5923. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Childs, A. F.; Davies, D. R.; Green, A. L.; Rutland, J. P. The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1955**, *10*, 462. [CrossRef]

- ¹⁹ Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Karasova, J.; Soukup, O.; Pejchal, J.; Hrabnova, M. Structure-activity relationship for the reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agent VX. *Medicinal Chemistry* **2013**, *9*, 689. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Bombardi, L. M. Agrotóxicos e agronegócio: arcaico e moderno se fundem no campo brasileiro. *Boletim Dataluta*, **2012**. Disponível em: <<http://ciorganicos.com.br/sustentabilidade/agrotoxicos-e-agronegocio-arcaico-e-moderno-se-fundem-no-campo-brasileiro/>>. Acesso em: 25 abril 2015.
- ²¹ Korbes, D.; Silveira, A. F.; Hyppolito, M. A.; Munaro, G. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. *Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia* **2010**, *15*, 146. [CrossRef]
- ²² Eddleston, M.; Szinicz, L.; Eyer, P.; Buckley, N. A. Oximes in acute organophosphorous pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *International Journal of Medicine* **2002** *95*, 275. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Kavalci, C.; Durukan, P.; Ozer, M.; Cevik, Y.; Kavalci, G. Organophosphate poisoning due to a wheat bagel. *Internal Medicine* **2009**, *48*, 85. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Bombardi, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: A nova versão do capitalismo oligopolizado. Disponível em: <http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf>. Acesso em: 10 janeiro 2016.
- ²⁵ ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reavaliação de agrotóxico: 10 anos de proteção à população. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm>>. Acesso em: 30 abril 2015.
- ²⁶ Husain, K. Delayed neurotoxicity of organophosphorus compounds. *Journal of Environmental Immunology and Toxicology* **2013**, *1*, 14. [CrossRef]
- ²⁷ Mileson, B. E.; Chambers, J. E.; Chen, W. L.; Ehrich, M.; Eldefrawi, A. L.; Gaylor, D. W.; Harmenick.; Hodgson, E.; Karczmar, A. G.; Padilha, S.; Pope, C. N.; Richardson, R. J.; Saunders, D. R.; Sheets, L. P.; Sultatos, L. G.; Wallace, K. B. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. *Toxicological Sciences* **2008**, *41*, 8. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Eddleston, M.; Hillips, M. R. Self Poisoning with Pesticides. *British Medical Journal* **2004**, *328*, 42. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Moshiri, M.; Darchini-Maragheh, E; Balali-Mood, M. Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *20*, 81. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Thiermann, H.; Worek, F.; Kehe, K. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *206*, 435. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry* **2004**, *38*, 151. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Wiener, S. W.; Hoffman, R. S. Nerve agents: a comprehensive review. *Journal of Intensive Care Medicine* **2004**, *19*, 22. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Bajgar, J.; Hajek, P.; Slizova, D.; Krs, O.; Fusek, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Bartosova, L.; Blaha, V. Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: biochemical and histochemical study. *Chemico-Biological Interactions* **2007**, *165*, 14. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Bajgar, J. The influence of inhibitors and other factors on cholinesterases, *Sbornik Vedeckych Praci Lekarske Fakulty University v Hradci Kralove* **1991**, *34*, 5. [PubMed]
- ³⁵ Shih, T. M.; Kan, R. K.; McDonough, J. H. *In vivo* cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. *Chemico-Biological Interactions* **2005**, *157–158*, 293. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Gupta, R. C.; Patterson, G. T.; Dettbarn, W. D. Biochemical and histochemical alterations following acute soman intoxication in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1987**, *87*, 393. [CrossRef]
- ³⁷ Gupta, R. C.; Goad, J. T.; Milatovic, D.; Dettbarn, W. D. Cholinergic and non-

- cholinergic brain biomarkers of insecticide exposure and effects, *Human and Experimental Toxicology* **2000**, *19*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Talesa, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **2001**, *122*, 1961. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Arieal, N.; Barak, D.; Harel, M.; Silman, I.; Susmann, J.; Baruch, V. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 17640. [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Taylor, P.; Lappi, S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **1975**, *14*, 1989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, *2*, 294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Sussman, J. L.; Harel, M.; Farlow, F. Atomic structure of acetylcholinesterase from torpedo californica: A prototypic binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 2340. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P.; Taylor, S. Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH₂-terminal and active center sequences. *The Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 12185. [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Gibney, G.; Camp, S.; Dionne, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* **1990**, *87*, 7546. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* **1987**, *87*, 955. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁷ Araújo, C. R. M.; Gonsalves, A. A. Oximas: Propriedades Químicas, Métodos de Preparação e Aplicações na Síntese de Grupos Funcionais Nitrogenados. *Revista Virtual de Química* **2015**, *7*, 1469. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Saint-André, G.; Kliachyna, M.; Kodepelly, S.; Louise-Leriche, L.; Gillon, E.; Renard, P. Y.; Nachon, R.; Baati, R.; Wagner, A. Design, synthesis, and evaluation of new alpha-nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated AChE. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6352. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁹ Louise-Leriche, L.; Paunescu, E.; Saint-André, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P. Y. A HTS assay for the detection of organophosphorus nerve agent scavengers. *Chemistry European Journal* **2010**, *16*, 3510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Wei, Z.; Liu, Y.; Zhou, X.; Luo, Y.; Huang, C.; Wang, Y.; Zheng, Z.; Li, S. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 5743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Johs, H.; Blum, M. M. Review of UV spectroscopic, chromatographic and electrophoretic methods for the cholinesterase reactivating antidote pralidoxima (2-PAM). *Drug Testing and Analysis* **2012**, *4*, 179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Informa Healthcare* **2012**, *7*, 1207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Michel, H. O. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *Journal of the Laboratory Clinical Medicine* **1949**, *34*, 1564. [[Link](#)]
- ⁵⁴ Kassa, J.; Musilek, J.; Karasova, J. D.; Kuca, K.; Bajgar, J. Two possibilities how to increase the efficacy of antidotal treatment of nerve agent poisonings. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2012**, *12*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ⁵⁵ Cabal, J.; Kuca, K.; Kassa, J. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Pharmacology and Toxicology*, **2004**, *95*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Ivnitskii, D. M.; Rishpon, J. A potentiometric biosensor for pesticides based on the thiocholine hexacyanoferrate (III) reaction. *Biosensors & Bioelectronics* **1994**, *9*, 569. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Miao, Y.; He, N.; Zhu, J. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chemical Review* **2010**, *110*, 5216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Mulchandani, P.; Mulchandani, A.; Kaneva, I.; Chen, W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, **1999**, *14*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Pundir, C. S.; Chauhan, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* **2012**, *429*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Cuartero, M.; Ortuño, J. A.; García, M. S.; García-Cánovas, F. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Analytical Biochemistry* **2012**, *421*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Ryu, H. W.; Oh, S.; Curtis-Long, M. J.; Lee, J. H.; Song, H.; Park, K. H. Rapid identification of cholinesterase inhibitors from the seedcases of mangosteen using an enzyme affinity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Boer, A. R.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; Irth, H. Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme inhibitor screening. *Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 867. [[CrossRef](#)]
- ⁶³ Van Breemen, R. B.; Huang, C.; Nikolic, D.; Woodbury, C. P.; Zhao, Y.; Venton, D. L. Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 2159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Cancilla, M. T.; Leavell, M. D.; Chow, J.; Leary, J. A. Mass spectrometry and immobilized enzymes for the screening of inhibitor libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 12008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Santos, D. I. V.; Gil, E. S. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. *Revista Eletrônica de Farmácia* **2010**, *7*, 1. [[Link](#)]
- ⁶⁶ Rhee, I. K.; Appels, N.; Luijendijk, T.; Irth, H.; Verpoorte, R. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. *Phytochemical Analysis* **2003**, *14*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Parvari, R.; Pecht, I.; Soreq, H. A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine. *Analytical Biochemistry* **1983**, *133*, 450. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁸ Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. Fluorometric system employing immobilized cholinesterase for assaying anticholinesterase compounds. *Analytical Chemistry* **1965**, *37*, 1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Jong, C. F.; Derks, R. J. E.; Bruyneel, B.; Niessen, W.; Irth, H. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Wang, M.; Gu, X.; Zhang, G.; Zhang, D.; Zhu, D. Convenient and continuous fluorometric assay method for acetylcholinesterase and inhibitor screening based on the aggregation-induced emission. *Analytical Chemistry* **2014**, *81*, 4444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, Jr. V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, 88. [[CrossRef](#)]
- ⁷² Kuca, K.; Cabal, J.; Juna, D.; Musilek, K.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Pejchal, J.; Kyung-Ae Oh; Yang, G. Y.; Jung, Y. Reactivation of VX-inhibited AChE by novel oximes having two oxygen atoms in the linker.

Environmental Toxicology and Pharmacology **2010**, *30*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷³ Rhee, I. K.; Meent, M. V.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography* **2001**, *915*, 217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁴ Cies'la, L. M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Wojtunik, K. A.; Hajnos, M. Thin-layer chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads. *Phytochemistry Letters* **2015**, *11*, 445. [[CrossRef](#)]

⁷⁵ Aquino Neto, F. R.; Nunes, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*, 1a. ed., Interciência: Rio de Janeiro, 2003.

⁷⁶ Yang, Z.; Song, Z.; Ren, J.; Yang, M.; Li, S. Improved thin layer chromatography bioautographic assay for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* **2010**, *22*, 509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁷ Soldatkin, O. O.; Burdak, O.; Sergeeva, T.; Arkhypova, V.; Dzyadevych, S.; Soldatkin, A. P. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *188*, 999. [[CrossRef](#)]