

## Artigo

**Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos****Petronilho, E. C.;**\* **Figueroa-Villar, J. D.\****Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (3), 671-686. Data de publicação na Web: 23 de março de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Agents for Defense Against Chemical Warfare: Reactivators of the Inhibited Acetylcholinesterase with Organophosphorus Neurotoxic Compounds**

**Abstract:** The chemical warfare agents or neurotoxic agents are an important threat to people all over the world, and deserve special attention because they are highly dangerous. Most of these agents are organophosphorus compounds (OP) that inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) which is responsible for controlling the transmission of nerve impulses. To be inhibited by these compounds, AChE can be reactivated, being cationic oximes the most used substances for this reactivation. Until today it has not been found agents for treatment of poisoning by OP being effective against all known chemical warfare agents and against all their effects. Therefore, this study aims to do a review on the OP used as chemical warfare agents and the process of inhibition and reactivation of AChE, to motivate the development of new agents for defense against chemical weapons.

**Keywords:** Acetylcholinesterase; AChE reactivators; organophosphorus; oximes; warfare agents.

**Resumo**

Os agentes de guerra química ou agentes neurotóxicos são uma perigosa ameaça à população de todo o mundo e merecem uma atenção especial devido a sua alta periculosidade. A maior parte destes agentes são compostos organofosforados (OF) que inibem a acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pelo controle da transmissão dos impulsos nervosos. Ao ser inibida por esses compostos a AChE pode ser reativada, sendo as oximas catiônicas as substâncias mais utilizadas para esse processo. Até o momento não foi encontrado um agente para tratamento de intoxicação por OF que seja eficaz contra todos os agentes de guerra química conhecidos e contra todos os seus efeitos. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo fazer uma revisão sobre os OF, sua utilização como agentes de guerra química e o processo de inibição e reativação da AChE, para motivar o desenvolvimento de novos agentes para defesa contra guerra química.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase; reativadores de AChE; organofosforados; oximas; guerra química.

\* Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Grupo de Química Medicinal, Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ [nane.cp@gmail.com](mailto:nane.cp@gmail.com); [jdfv2009@gmail.com](mailto:jdfv2009@gmail.com)

DOI: [10.5935/1984-6835.20140042](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140042)

## Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos

Elaine da C. Petronilho,\* José Daniel Figueroa-Villar\*

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

\* [nane.cp@gmail.com](mailto:nane.cp@gmail.com); [jdfv2009@gmail.com](mailto:jdfv2009@gmail.com)

*Recebido em 22 de março de 2014. Aceito para publicação 23 de março de 2014*

1. Introdução
2. Organofosforados
3. Acetilcolinesterase (AChE)
4. Processo de Reativação da AChE
5. Métodos de avaliação de reativação da AChE
6. Considerações finais

### 1. Introdução

O uso de agentes de guerra química constitui uma das maiores ameaças no mundo atual. A guerra química se baseia na utilização de substâncias com propriedades tóxicas, que são capazes de matar, para destruição em massa, além de causar danos severos ao meio ambiente.<sup>1</sup> Os agentes de guerra química mais destacados e perigosos são os organofosforados (OF) neurotóxicos que, devido a sua alta toxicidade, bastam pequenas quantidades para causar convulsões e morte.

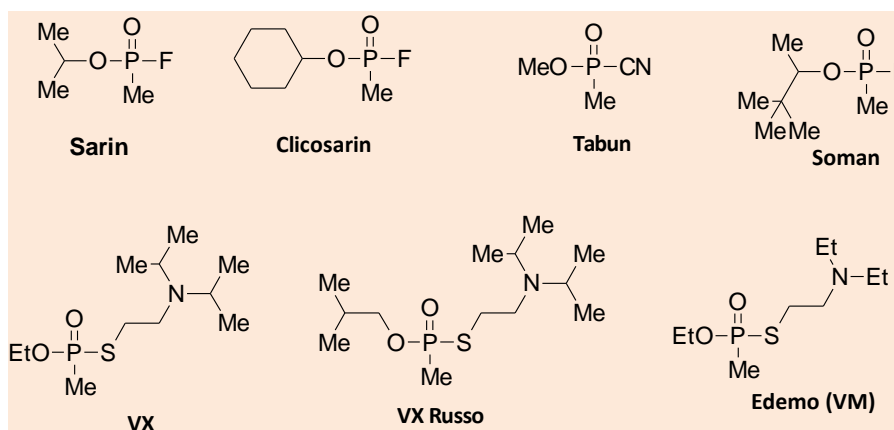
Um dos maiores motivos para o uso de armas químicas em guerra e ações terroristas é que seu uso acaba sendo mais barato que as armas convencionais, como bombas, projéteis e explosivos. Por exemplo, para matar todas as pessoas em uma área de um

quilômetro quadrado, o uso de armas químicas pode chegar a um custo de aproximadamente 40% do que seria gasto se fossem usadas armas normais.<sup>2</sup> O outro motivo é que as armas químicas, além de causarem morte de forma rápida e eficiente, também causam problemas psicológicos aos que conseguem sobreviver à intoxicação, sendo assim mais preocupantes que outras armas.

Os agentes de guerra química foram utilizados diversas vezes em guerras desde a antiguidade, ainda que sendo agentes não bem definidos nem muito eficientes. Já vários agentes tóxicos mais eficientes receberam maior importância em 1915, quando o exército alemão lançou gases como cloro e mostarda contra tropas francesas durante a Primeira Guerra Mundial, causando inúmeras baixas no exército inimigo.<sup>2</sup> A partir dessa data o desenvolvimento de agentes neurotóxicos foi mais intenso para diversos

exércitos. Antes da Segunda Guerra Mundial o exército alemão iniciou o desenvolvimento dos primeiros OF neurotóxicos como agentes de guerra química, especialmente tabun (GA), sarin (GB) e soman (GD) (Figura 1). Apesar disso, estes agentes, assim como o gás mostarda e outras substâncias tóxicas, não foram utilizados durante a Segunda Guerra Mundial. Na década de 1950, foram

desenvolvidos os OF neurotóxicos da família V, que são mais tóxicos e persistentes no ambiente, sendo que o primeiro, chamado VX, foi desenvolvido na Inglaterra. Depois foram criados outros compostos similares, especialmente na antiga União Soviética (Figura 1).<sup>2</sup>



**Figura 1.** Estruturas de alguns agentes neurotóxicos<sup>3</sup>

Um dos primeiros países a usar OF neurotóxicos foi o Iraque, sob o comando de Saddam Hussein na guerra contra Irã entre 1980 e 1988, levando a centenas de mortes de iranianos.<sup>4</sup> No ano de 1988, Hussein também usou o agente neurotóxico tabun contra os curdos, causando muitas outras mortes.<sup>5</sup>

No ano de 1994, o sarin foi utilizado no Japão contra civis em um ataque terrorista que resultou na morte de 7 pessoas e 200 intoxicações.<sup>6</sup> No ano seguinte houve outro ataque no Japão pelo mesmo grupo terrorista utilizando o sarin, sendo desta vez em uma estação de metrô em Tóquio, provocando a intoxicação de 5.000 vítimas e a morte de 12 pessoas.<sup>7-9</sup> Nos anos seguintes, muitas das pessoas intoxicadas também morreram ou ficaram em péssimas condições de saúde.

Por outro lado, aconteceram intoxicações de soldados americanos por sarin durante a Guerra do Golfo, em 1991, possivelmente quando estes soldados destruíram um depósito de armas químicas no Iraque. Em 2003, os Estados Unidos, com o apoio da

Inglaterra, invadiu o Iraque com o argumento de esse país ter depósitos de armas químicas nessa época.<sup>8,9</sup> Em 2004, uma granada de gás sarin explodiu em Bagdá após ser descoberta por soldados da coligação, deixando 2 feridos.<sup>8,9</sup>

Recentemente, armas químicas foram utilizadas na Síria, levando a morte de cerca de 1300 pessoas, especialmente civis e crianças, sendo esse um dos piores eventos de uso de armas químicas no mundo. Esses casos mostram que a utilização de armas químicas continua a representar uma grande ameaça à segurança de qualquer país, apesar de existir a Convenção de Proibição de Armas Químicas da ONU (CPAQ), que proíbe o desenvolvimento, produção, estocagem e o seu uso. Essa convenção também promove a eliminação de estoques existentes de tais armas.<sup>10</sup>

Infelizmente alguns países ainda não participam da CPAQ e as armas químicas podem facilmente ser utilizadas por grupos terroristas. O baixo custo e a facilidade de sua manufatura faz que as armas químicas

interessem as organizações terroristas, o que é uma grande preocupação em todo o mundo.<sup>11</sup>

Outro aspecto importante com relação aos OF é sua aplicação como pesticidas na agricultura.<sup>12</sup> Por exemplo, a ONU tem informado que aproximadamente dois milhões de pessoas por ano tentam cometer suicídio com pesticidas ou inseticidas OF, e cerca de um milhão de pessoas são intoxicadas com esses compostos de forma acidental.<sup>13,14</sup> Um recente exemplo desse problema foi a intoxicação de 50 crianças em uma escola na Índia com OF em 2013, das quais 23 morreram, inclusive algumas que foram hospitalizadas.<sup>15,16</sup> Infelizmente esses pesticidas ou inseticidas são também utilizados para assassinatos e suicídios no mundo todo.<sup>17</sup> Esses pesticidas muitas vezes poluem produtos de agricultura, como frutas e outros vegetais que, se ingeridos sem serem limpos, podem levar a intoxicação com possibilidade de morte ou ações colinérgicas.

Os OF normalmente atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), que é fundamental para nosso sistema de controle de transmissão nervosa. Atualmente não existe nenhum fármaco capaz de reativar essa enzima se ela for inibida por qualquer OF neurotóxico, o que faz necessário primeiro determinar qual foi o composto que intoxicou a pessoa, para selecionar o melhor fármaco reativador para seu tratamento. Infelizmente essa determinação pode levar bastante tempo, fato que muitas vezes inviabiliza o tratamento da pessoa intoxicada em tempo hábil o suficiente para evitar o óbito.

Por esses motivos é de grande

importância o desenvolvimento de novos fármacos para salvar a vida de pessoas intoxicadas por OF, tanto agentes neurotóxicos como pesticidas, sendo necessário desenvolver substâncias que sejam capazes de reativar eficientemente a AChE independente de qual foi o OF utilizado na intoxicação.

## 2. Organofosforados

A maior parte dos OF usados como pesticidas ou intoxicantes são derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico. Eles possuem um átomo central de fósforo pentavalente, com ligação em grupos funcionais diferentes. Em termos gerais o fósforo central possui uma ligação dupla com oxigênio ou enxofre, mas suas três ligações simples podem ser diversas. Além disso, ele está ligado a pelo menos um grupo alquiloxila (RO) em todos os OF, e quando as outras duas ligações simples são desse tipo os compostos são chamados de fosfatos (**1**). Às vezes um desses grupos RO é substituído por um grupo com nitrogênio (R<sub>2</sub>N), sendo chamados fosforoamidatos (**2**). Se dois ligantes simples são via oxigênio (RO) e o terceiro é uma alquila (R) os compostos são chamados fosfonatos (**3**). Ainda é possível que duas ligações simples sejam com alquilas, caracterizando, então, os fosfinatos (**4**). Quando a ligação dupla é com enxofre, os compostos passam a ser fosfortioatos (**5**), fosfonotioatos (**6**) e fosfinotioatos (**7**) (Figura 2). Nos OF os grupos alquiloxila (RO) ou alquila (R) podem ser também ariloxila (ArO) ou arila (Ar).<sup>18,19</sup>

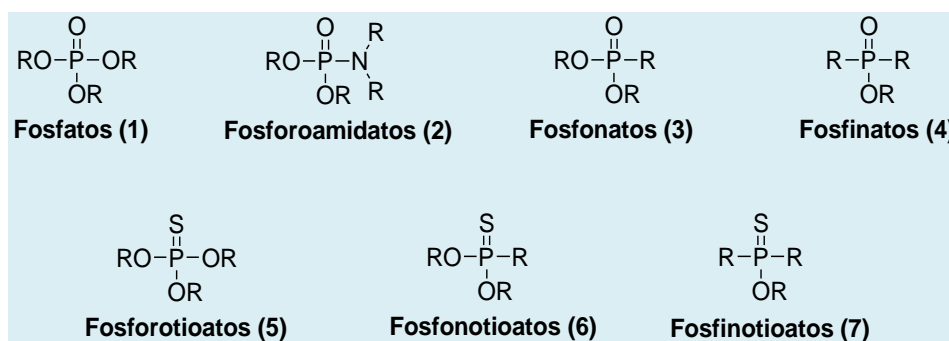


Figura 2. Exemplos de compostos organofosforados

Um dos primeiros trabalhos na preparação de compostos OF foi do cientista Jean Louis Lassaigne, da França, que no início do Século XIX preparou o trietil fosfato e estudou a sua toxicidade, motivando a pesquisa desses compostos. Outro cientista francês, Philippe de Clermont, foi quem desenvolveu o primeiro organofosforado

inibidor da AChE, chamado tetraetil pirofosfato (TEEP) (8) (Figura 3). O efeito desse tipo de composto no sistema nervoso central foi depois descrito pelos cientistas alemães Willy Lange e Gerde von Krueger em 1932, processo que motivou o cientista alemão Gerhard Schraeder a preparar outros OF para ação inseticida.

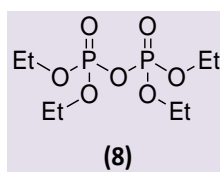


Figura 3. Primeiro inseticida organofosforado sintetizado (TEEP)

Vários dos compostos preparados por Schraeder acabaram sendo muito mais tóxicos, e depois vieram a ser utilizados como armas químicas.<sup>3</sup> Esses compostos são sintetizados usando metodologias relativamente simples. Por exemplo, a reação

de difluoro metilfosfato (9) com isopropanol, como mostrado na Figura 4, leva a formação de sarin (10), que é obtido em duas conformações, S(-)-sarin (10a) e R-(+)-sarin (10b).

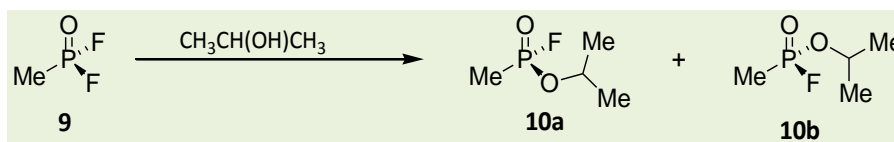


Figura 4. Síntese do organofosforado neurotóxico sarin (10a e 10b)

Os OF neurotóxicos utilizados como armas químicas são compostos com pelo menos um grupo alquila e um grupo de saída ligado ao fósforo. Os mais tóxicos apresentam um grupo alquila ligado diretamente ao fósforo e também possuem grupos que podem ser

facilmente substituídos por cianetos, flúor e grupos com enxofre. Essas características estruturais os fazem serem facilmente atacados nucleofilicamente por grupos hidroxilados, especialmente o aminoácido serina. Outros OF que também apresentam

toxidez são os pesticidas e inseticidas, que são aplicados em processos de agricultura e em controle de insetos. Apesar de possuírem menor toxicidade para seres humanos que os

agentes OF de guerra química, eles levam a diversas intoxicações e mortes mundialmente todos os anos. Um conjunto de pesticidas e inseticidas tóxicos é mostrado na Figura 5.

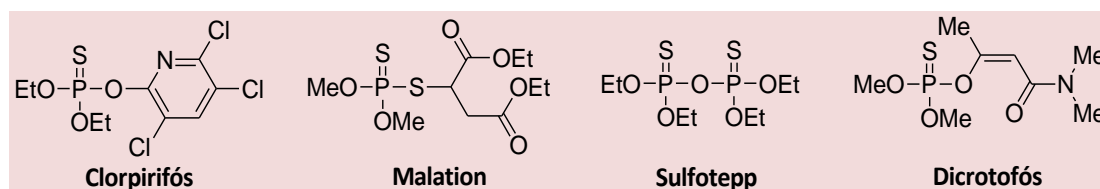


Figura 5. Exemplos de organofosforados pesticidas

A principal característica dos OF neurotóxicos é a fosforilação de alguns grupos funcionais, principalmente em proteínas, sendo o mais comum a reação com serinas, o que acontece fortemente nas enzimas colinesterases; AChE e butirilcolinesterase (BuChE).

### 3. Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é uma das mais importantes enzimas nos sistemas de transmissão de impulsos nervosos. Um impulso nervoso precisa sempre ser transferido de um neurônio para outro, o que é realizado via mediadores químicos, como acetilcolina (ACh), encefalina, dopamina, glutamato, noradrenalina, serotonina e outras. A ACh é um dos neurotransmissores mais importantes, pois funciona no controle da atividade de áreas cerebrais envolvidas nas

ações de atenção, aprendizagem e memória, e atua na junção neuromuscular. Quando esse neurotransmissor é emitido por um neurônio na fenda sináptica ele vai interagir com receptores nicotínicos e muscarínicos do próximo neurônio, transmitindo o impulso nervoso. Para evitar o excesso do impulso nervoso, que levaria a crise colinérgica, é necessário que o neurotransmissor seja anulado. No caso na ACh a enzima AChE promove sua hidrólise, transformando-a em colina e acetato, como mostrado na Figura 6.

Como mostrado na Figura 6, uma vez que a ACh é hidrolisada pela AChE, a colina liberada é reabsorvida pelo neurônio para ser reutilizada na formação de mais ACh. O principal resíduo de aminoácido do sítio ativo da AChE envolvido no processo de hidrólise da ACh é uma serina (Ser<sub>203</sub>), cuja ação é ajudada pelos aminoácidos histidina (His<sub>447</sub>) e ácido glutâmico (Glu<sub>334</sub>), como mostrado na Figura 7.<sup>19</sup>

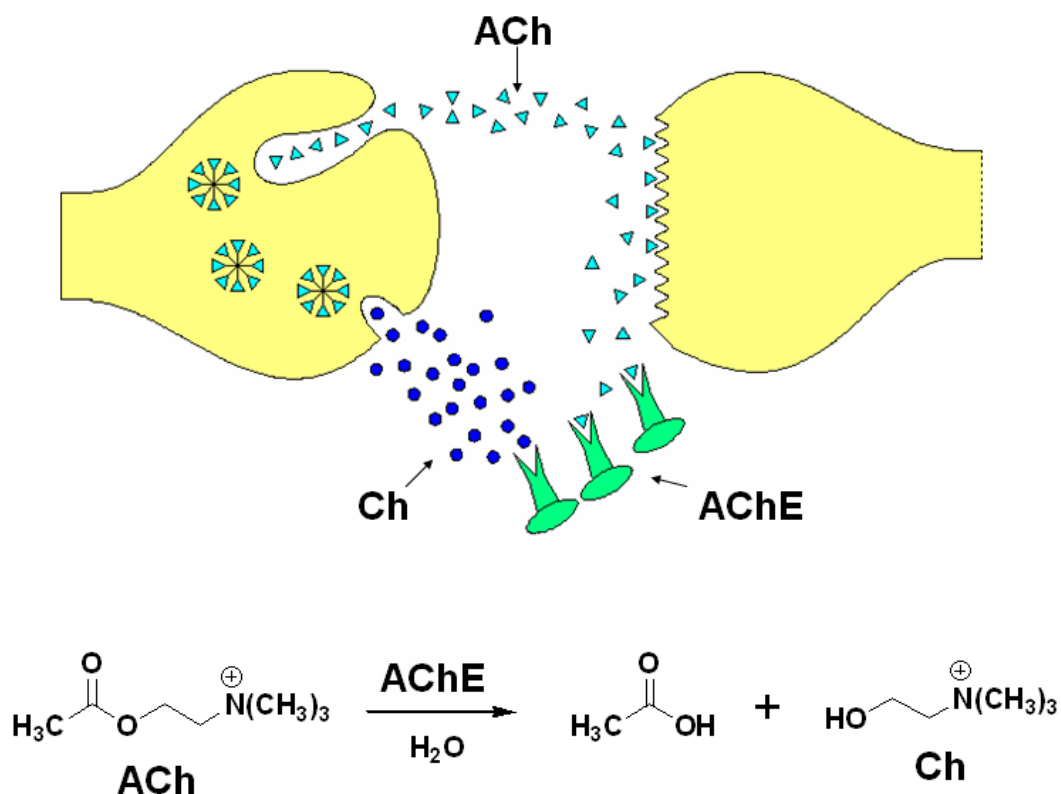


Figura 6. Transmissão neuronal da acetilcolina e sua hidrólise por AChE

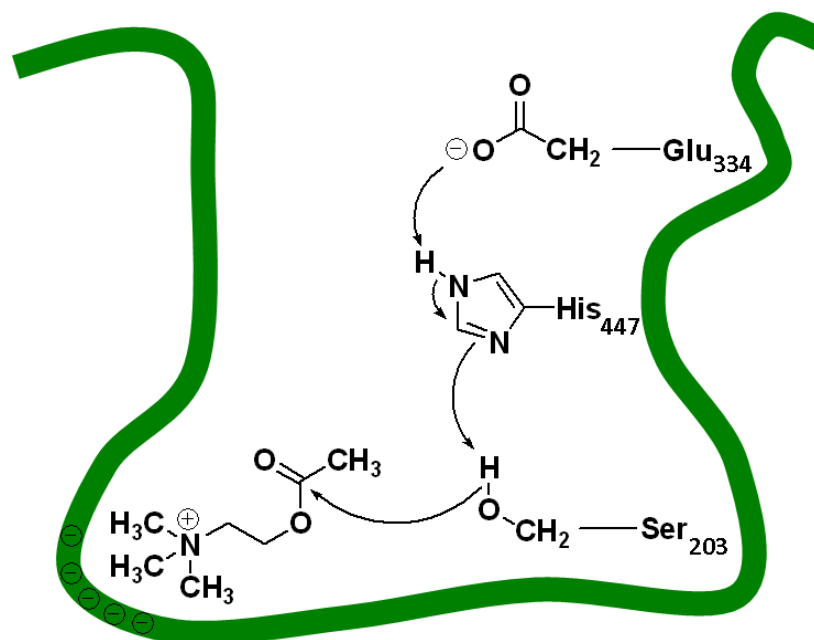


Figura 7. Mecanismo de hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE humana

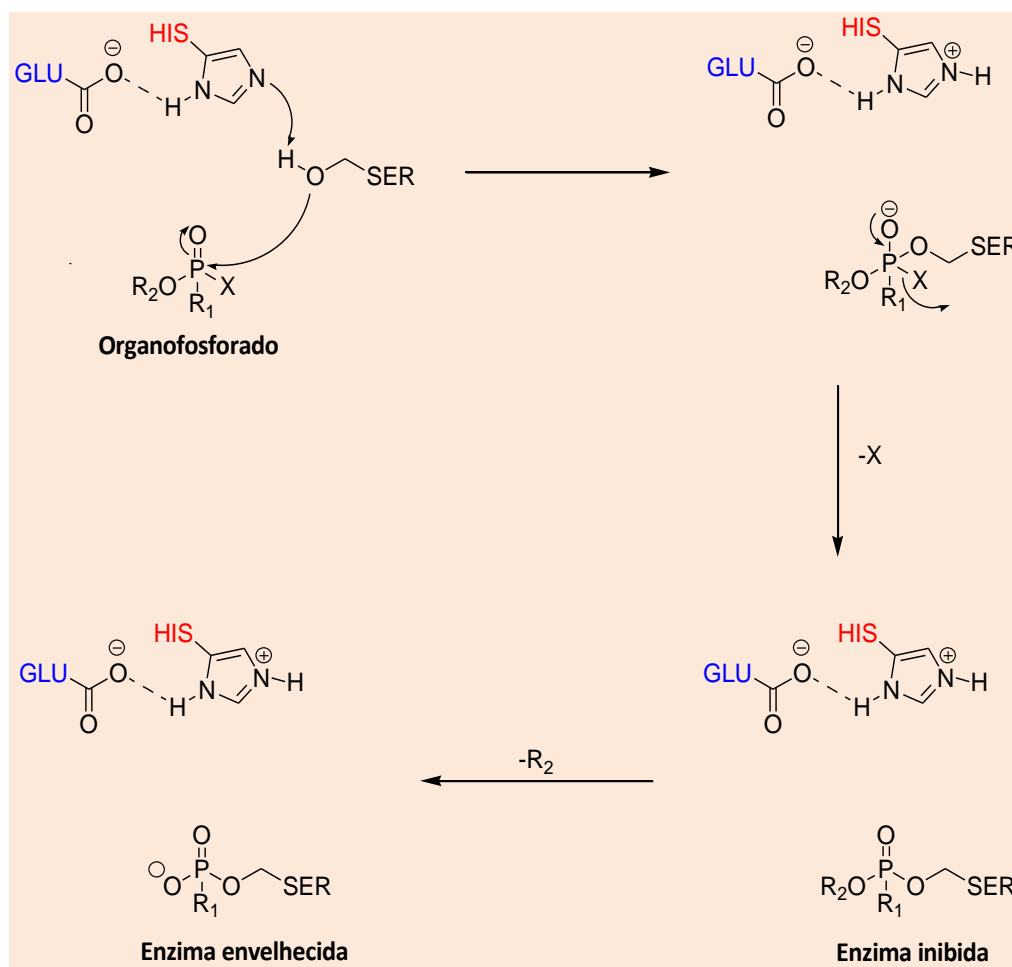
Como mencionado anteriormente, os OF neurotóxicos inibem a ação de várias enzimas, principalmente a AChE.<sup>3</sup> A inibição da AChE resulta em um grande aumento na

concentração de ACh, o que leva a excesso do impulso nervoso e uma crise colinérgica com convulsões, colapso no sistema nervoso central com perda do controle muscular e

graves problemas respiratórios. Esses efeitos podem levar à morte de forma relativamente rápida.

A inibição da AChE por OF neurotóxicos ocorre no sistema nervoso central e no periférico. Os organofosforados têm afinidade com o sítio ativo da AChE, e uma vez ocorrida a reação, a enzima fica inibida e não consegue promover a hidrólise da ACh. A inibição ocorre no interior do sítio ativo, no

aminoácido serina da tríade catalítica (Ser203) através da interação com o organofosforado. No caso da AChE humana (HuAChE), este agente liga-se covalentemente com a Ser203. Esta ligação se dá entre o átomo de fósforo e o oxigênio da serina, com conseqüente despreendimento do grupo de saída do organofosforado, cujo mecanismo é mostrado na Figura 8.<sup>20</sup>



**Figura 8.** Esquema geral de inibição da AChE, onde X é o grupo de saída do composto organofosforado<sup>18</sup>

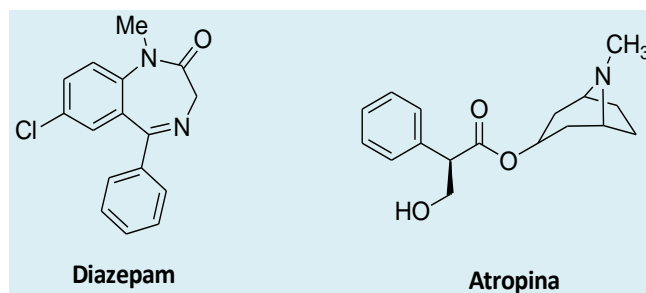
Os tratamentos médicos utilizados para pessoas intoxicadas por OF neurotóxicos são os mesmos princípios aplicados a outras substâncias tóxicas como: não deixar a vítima exposta ao agente tóxico, criar ventilação, administrar os antídotos adequados e também corrigir anomalias cardíacas.<sup>21</sup>

Na quimioterapia utilizada para o tratamento da intoxicação com compostos OF são utilizados três tipos de fármacos. Primeiramente administra-se uma substância anticolinérgica, para antagonizar os efeitos do acúmulo de ACh nos receptores colinérgicos, em seguida utiliza-se um



depressor do sistema nervoso central, que irá atuar como um anticonvulsivante e, após utiliza-se uma oxima que possua a capacidade de reativar a AChE inibida.<sup>21,22</sup> Nestes casos de intoxicação por OF, a atropina é o anticolinérgico mais usado. Ela

compete com a ACh pelos receptores muscarínicos, diminuindo os efeitos causados pelo excesso de ACh. Entre os depressores do sistema nervoso central o diazepam é o mais empregado (Figura 9).



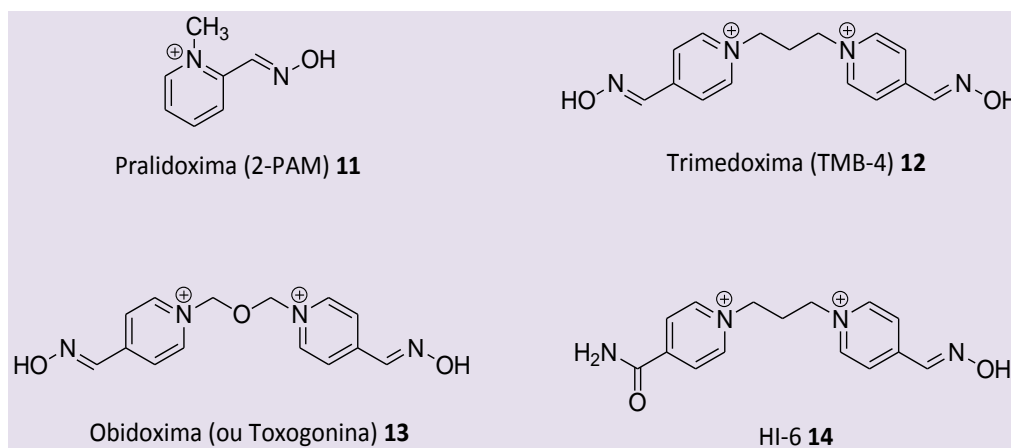
**Figura 9.** Estruturas da atropina e do diazepam, utilizados no tratamento de intoxicação por OF neurotóxicos<sup>19</sup>

#### 4. Processo de Reativação da AChE

Como mencionado anteriormente, os OF inibem a AChE pelo processo de fosforilação (Figura 6). Ao ocorrer esta inibição o local esterásico fosforilado sofre regeneração hidrolítica com uma velocidade muito lenta. Wilson, em 1951, mostrou em suas pesquisas que grupos nucleofílicos como as oximas, hidroxilaminas e também os ácidos hidroxâmicos, conseguiam reativar a enzima com maior velocidade do que a hidrólise espontânea. Além disso, Wilson constatou que a AChE com sua capacidade esterase perdida poderia ser restaurada por compostos que deslocassem o grupo fosforil da enzima. A reativação seletiva da AChE poderia ser alcançada por um nucleófilo, onde o nitrogênio quaternário interagisse com o subsítio negativo do centro ativo, deixando este nucleófilo em posição oposta ao átomo de fósforo.<sup>23,24</sup> Wilson e Ginsburg conseguiram este processo com a

pralidoxima (2-PAM), a qual reativa a enzima 1 milhão de vezes mais rápido em comparação com a hidroxilamina. Também foram testadas algumas oximas bis-quaternárias e estas mostraram ser reativadoras potentes da AChE. Ainda não existe uma oxima com resultados satisfatórios para todos os agentes neurotóxicos, sendo esta a principal deficiência deste tratamento. As principais oximas utilizadas atualmente são a 2-PAM (**11**), a trimedoxima (TMB-4) (**12**), a obidoxima (toxogonina) (**13**) e a HI-6 (**14**).<sup>25-29</sup>

A eficiência das oximas muda em relação à estrutura do organofosforado e geralmente estas são utilizadas para a reativação da AChE pelo salvo-conduto de que a enzima fosforilada ainda não esteja envelhecida. A efetividade do tratamento depende da administração imediata do antídoto após a exposição do paciente ao OF, quando a ligação enzima-OF ainda não é totalmente efetiva.

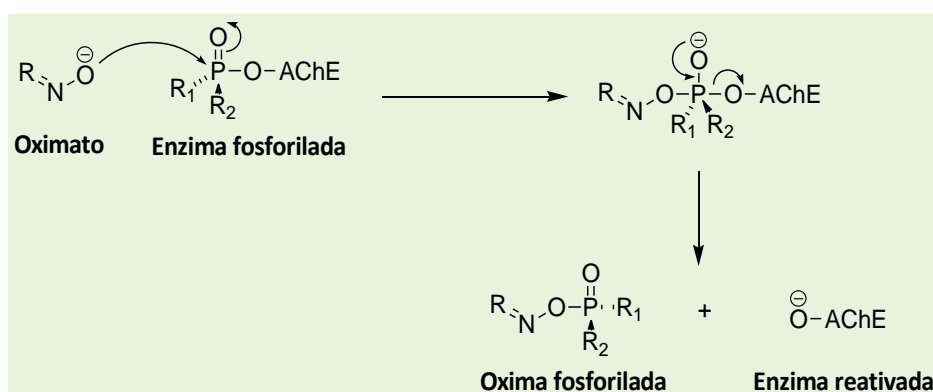


**Figura 10.** Principais oximas empregadas na atualidade como antídotos para intoxicação com organofosforados<sup>18</sup>

Outros tratamentos para evitar e diminuir a intoxicação por OF foram desenvolvidos. Um deles é utilizado quando há uma possibilidade de exposição aos agentes neurotóxicos. Este tratamento é uma proteção da AChE que é feito através da pré-contaminação por carbamatos que são inibidores reversíveis. Estes compostos se ligam a AChE impedindo que a enzima se ligue ao agente neurotóxico de forma irreversível. Um outro tratamento surgiu no final do século XX e faz a utilização de enzimas (colinesterases, fosfotriesterase ou

paraoxonase humana) para degradar os OF na corrente sanguínea antes que ocorra a interação com a AChE. São os chamados "scavengers".<sup>30</sup>

A Figura 11 mostra um mecanismo proposto para a reativação da AChE por uma oxima. Observa-se que para a reativação da enzima ser eficiente esta depende da nucleofilicidade do reativador. Uma fosforiloxima é formada após o ataque nucleofílico da oxima sobre átomo de fósforo.<sup>31</sup>



**Figura 11.** Reativação da AChE por oximas<sup>5</sup>

A reativação precisa ser realizada antes que ocorra o processo de envelhecimento da enzima. O envelhecimento ocorre quando há a dealquilação do grupo fosfato cuja facilidade depende da estrutura química do

inibidor. Quando a enzima está envelhecida a possibilidade de reativação pelas oximas é mínima, pois há uma forte ligação entre o resíduo da histidina protonada do sítio catalítico e o átomo de oxigênio

negativamente carregado do grupo fosfato.<sup>32</sup>

O mecanismo do processo de reativação foi confirmado experimentalmente e por simulações por modelagem molecular usando um método híbrido envolvendo mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM).<sup>33</sup> Essa informação é fundamental para o planejamento de novos potenciais reativadores da AChE inibida por OF.

Para a melhor ação dos reativadores, o ideal é que eles tenham capacidade de permear a barreira hematoencefálica (BBB), o que leva a um melhor tratamento de problemas cerebrais. Dessa forma, reativadores neutros, que normalmente penetram bem a BBB, assim como catiônicos com essa capacidade, são necessários para garantir o tratamento apropriado desse tipo de intoxicação.<sup>34,35</sup> Essa intoxicação acontece tanto com armas químicas como com pesticidas, o que afeta tanto as pessoas civis como os militares em guerra, luta contra terrorismo e até em trabalhos na agricultura.

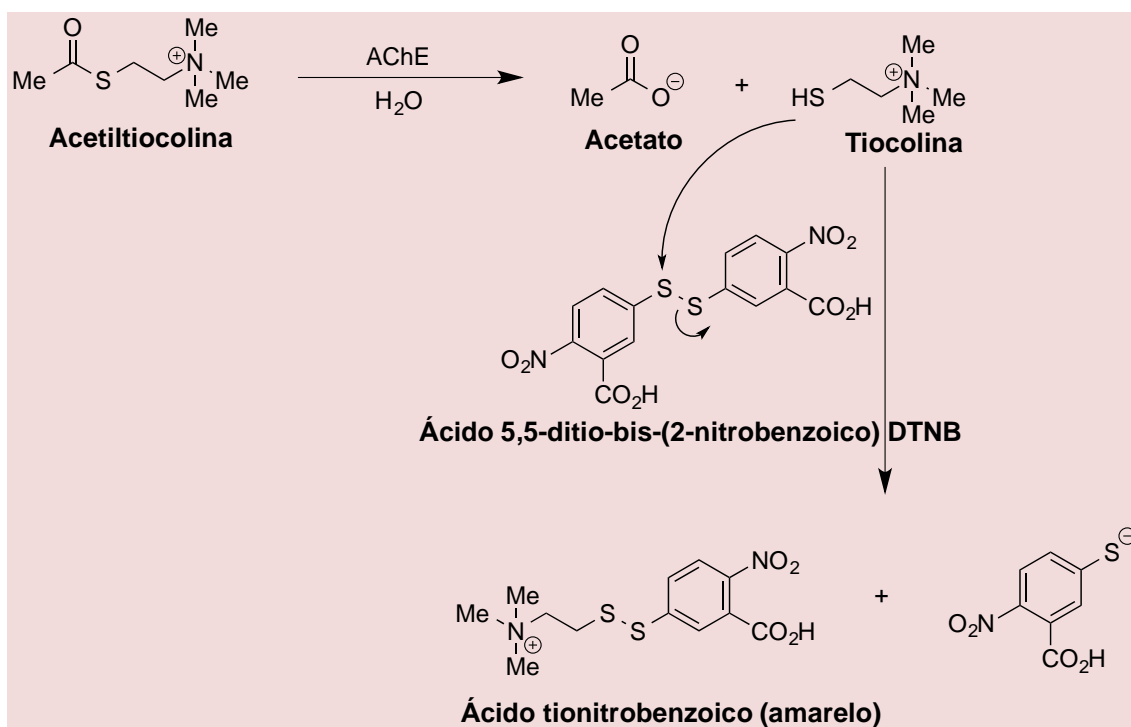
Diante desta necessidade, o Exército brasileiro, principalmente o IME e o CTEx, especialmente o grupo de Química Medicinal do IME, estão dedicados a desenvolver novos agentes eficientes para defesa, tanto contra armas químicas como para pesticidas.

## 5. Métodos de avaliação de reativação da AChE

Para avaliar a atividade das colinesterases (AChE ou BuChE) alguns métodos foram criados. A maior parte destas metodologias se baseia em métodos espectrofotométricos. Uma dessas metodologias capaz de avaliar a reativação da AChE é o método de Ellman que tem por finalidade quantificar a velocidade das enzimas, à medida que a hidrólise do substrato ocorre. É utilizado o reagente de Ellman, ácido

ditiobisnitrobenzoico (DTNB) que, ao entrar em contato com os tióis gerados, produz um ânion de cor amarela (ácido tionitrobenzoico), que pode ser determinado por espectroscopia de UV-Visível em 412 nm. Quando a AChE é inibida, esta não possui a capacidade de hidrolisar a ACh, não ocorrendo a formação da tiocolina, que por sua vez reagiria com o DTNB formando o ácido tionitrobenzoico, como mostra a Figura 12, e sua concentração é determinada por UV-Visível, o que permite determinar a capacidade da enzima.<sup>36,37</sup>

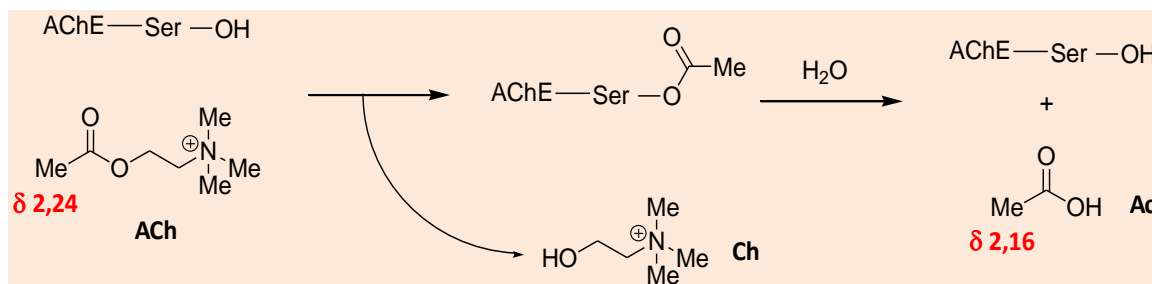
Um exemplo da utilização deste método é o teste de Ellman modificado por Oliveira-Silva,<sup>38</sup> o qual avalia a estabilidade da AChE e da BChE em amostras de sangue congelado. Neste tipo de teste, primeiramente é feita a coleta de amostra de sangue de voluntários, em seguida o sangue coletado é incubado com paraoxon por ser um dos OF mais tóxicos utilizados como inseticidas, devido à impossibilidade de se trabalhar com os agentes químicos de guerra, pois não existe no Brasil, até o momento, laboratório equipado para o manuseio dessa classe de compostos. Posteriormente é feita a separação do plasma sanguíneo das hemácias usando uma centrífuga e em seguida a lise das hemácias, utilizando uma solução tampão apropriada, e o congelamento do sangue por 24h. Após essas etapas, as hemácias são centrifugadas por 3 vezes para separar a suspensão de proteínas chamada “ghost” das membranas das hemácias. O composto reativador sintetizado é adicionado ao “ghost” que é utilizado de forma tamponada para a análise. Em seguida é adicionado a essa mistura o ácido ditionitrobenzoico (DTNB) e o substrato acetilcolina. 30 minutos mais tarde a atividade enzimática é medida em espectrofotômetro de Ultravioleta Visível (UV).<sup>38</sup>



**Figura 12.** Esquema do monitoramento de reação de hidrólise da acetilcolina por espectrofotômetro de Ultravioleta Visível (UV)

Outra metodologia capaz de avaliar a reativação da AChE é a técnica de RMN.<sup>39</sup> Este método é realizado pela observação da reação de hidrólise da ACh ou a formação de acetato em tubos de RMN. Caso a hidrólise aconteça, é observada a formação do produto (acetato) em função do tempo, e

também a diminuição do substrato (ACh), cujas concentrações são determinadas por procedimentos de integração dos sinais. Nesse procedimento é necessário que os deslocamentos químicos do substrato e do produto sejam diferentes, como mostrado na Figura 13.



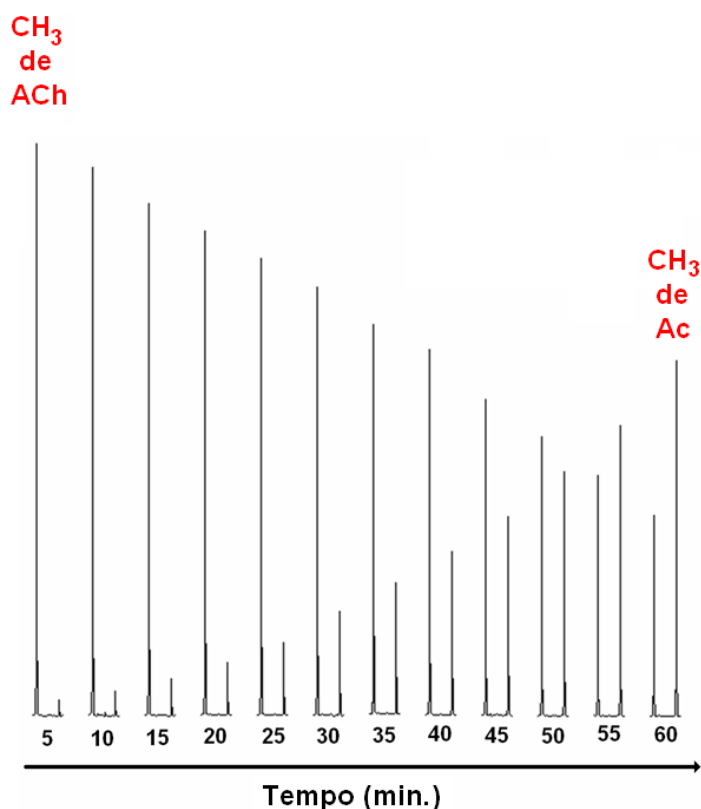
**Figura 13.** Hidrólise da ACh e deslocamentos químicos do substrato (ACh, 2,24 ppm) e do produto (Ac, 2,16 ppm)

Para realizar essa metodologia é necessário utilizar uma baixa concentração da AChE, normalmente 1.0 pM, pois isso permite que a velocidade da reação seja

menor, de forma que seja monitorada por mais tempo via RMN. A amostra é preparada e colocada imediatamente no espectrômetro de RMN, sendo o último material introduzido

nela o substrato (ACh). As etapas de adição da ACh, introdução no magneto e ajuste do espectrômetro (*lock* e *shimming*) devem ser realizadas em um tempo curto (4 a 5 min). Imediatamente depois são adquiridos uma série de espectros de  $^1\text{H}$  RMN com intervalos de tempo iguais entre cada aquisição e normalmente usando somente uma ou duas

varreduras em cada espectro. Essas condições são fundamentais para permitir a análise de cinética da enzima, assim como processos de inibição ou reativação. No final do experimento é possível estimar a concentração do produto que foi formado em relação à diminuição da concentração do reagente em função do tempo (Figura 14).<sup>39</sup>



**Figura 14.** Sequência de espectros de uma varredura de RMN das metilas do substrato ACh e do produto Ac obtidos em períodos de 5 minutos

Como a metodologia de RMN permite de forma bem eficiente determinar a estrutura e os deslocamentos químicos de moléculas, ela fornece as informações da cinética da enzima de forma precisa e sem erros, diferente do que às vezes acontece com outros métodos espectroscópicos, como o UV-Visível.

## 6. Considerações finais

O assunto fundamental para defesa contra guerra química é o desenvolvimento

de reativadores da AChE com agentes de baixa toxidez, capazes de permear a barreira hemato-encefálica e atuar de forma eficiente contra qualquer OF neurotóxico que tenha inibido a enzima. Essa ação levaria a condições apropriadas para defesa contra agentes OF neurotóxicos, tanto gases de guerra como pesticidas e inseticidas, sendo desnecessário determinar qual foi o intoxicante utilizado.

Dessa forma é necessário o desenvolvimento de pesquisa científica para planejar, sintetizar e avaliar novos potenciais reativadores da AChE fosforilada. Os

compostos planejados devem ter alta capacidade para interagir no sítio ativo da enzima, além de potencial para realizar ataque nucleofílico ao grupo fosfato. Um estudo por modelagem molecular<sup>40</sup> já mostrou que outros compostos, além de oximas, podem efetuar reativação, como peróxidos e hidrazonas.

É também necessário que esses reativadores possuam excelente capacidade para interação com o sítio ativo da enzima, processo que pode ser planejado por *docking* e dinâmica e avaliado por RMN ou difração de raios-X, onde seria determinada a estrutura dos complexos formados, sendo que RMN, além de fornecer a estrutura também indica as variações dinâmicas dos complexos.

Evidentemente, a obtenção dos complexos planejados requer eficientes métodos de síntese orgânica, como é comum nos processos de desenvolvimentos de fármacos.

Ainda é possível que grupos terroristas e países que não fazem parte da CPAQ desenvolvam novos agentes de guerra química, o que aumenta a importância do estudo e desenvolvimento de agentes para defesa contra guerra química, que é um processo de grande importância para a proteção da população mundial.

### Referências Bibliográficas

<sup>1</sup> Silva, F. C.; Cardeal, Z. L.; Carvalho, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando micro extração em fase sólida e CGAR-EM. *Química Nova* **1999**, *22*, 197. [CrossRef]

<sup>2</sup> Silva, G. R.; Borges, I.; Figueroa-Villar, J. D.; Castro, A. T. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. *Química Nova* **2012**, *35*, 10, 2083. [CrossRef]

<sup>3</sup> Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F. A química dos ésteres de

fosfato. *Química Nova* **2003**, *27*, 745. [CrossRef]

<sup>4</sup> Hilmas, Corey J., Smart, J. K.; Hill, B. A., "History of Chemical Warfare", *Medical Aspects of Chemical Warfare*, Martha K., Editor-in Chief, Borden Institute: GPO, 2008, Cap 2.

<sup>5</sup> Macilwain, C. Study proves Iraq used nerve gas. *Nature* **1993**, *363*, 3. [CrossRef] [PubMed]

<sup>6</sup> Morito, H.; Yanagisawa, N.; Nakajima, T.; Shimizu, M.; Hirabayashi, H.; Okudera, H.; Nohara, M.; Midorikawa, Y.; Mimura, S. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* **1995**, *346*, 290. [CrossRef] [PubMed]

<sup>7</sup> Szinicz, L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* **2005**, *214*, 167. [CrossRef] [PubMed]

<sup>8</sup> Okumura, T.; Takasu, N.; Ishimatsu, S.; Miyanoki, S.; Mitsuhashi, A.; Kumada, K.; Tanaka K, Hinohara, S. Report on 640 Victims of the Tokyo subway sarin attack. *Annals of Emergency Medicine* **1996**, *28*, 129. [CrossRef] [PubMed]

<sup>9</sup> Holstege, C. P.; Kirk, M.; Sidell, F. R. Chemical warfare: nerve agent poisoning. *Critical Care Clinics* **1997**, *13*, 923. [CrossRef] [PubMed]

<sup>10</sup> Sítio da Organization for the Prohibition of Chemical Weapons. Disponível em: <<http://www.opcw.org>>. Acesso em: 20 dezembro 2013.

<sup>11</sup> Castro, A. T.; Figueroa-Villar, J. D. Molecular structure, conformational analysis and charge distribution of pralidoxime: *Ab initio* and DFT studies. *International Journal of Quantum Chemistry* **2002**, *89*, 143. [CrossRef]

<sup>12</sup> Oliveira-Silva, J. J.; Alves, S. R.; Meyer, A.; Perez, F.; Sarcinelli, P. N.; Mattos, R. C. O. C.; Moreira, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública* **2001**, *35*, 130. [CrossRef]

<sup>13</sup> Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Eyer, P.; Dawson, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* **2008**, *371*, 597. [CrossRef] [PubMed]

<sup>14</sup> Aardewa, H.; Meerteng, J. H. J. M.; Lightemberg, J. J. M.; Peters-Polman, O. M.;

- Tulleken, J. E.; Zijlstra, J. G. Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments. *Netherlands Journal of Medicine* **2008**, *66*, 149. [PubMed]
- <sup>15</sup> Sítio da Rede Renascença. Disponível em: <[http://rr.sapo.pt/informacao\\_detalhe.aspx?fid=26&did=114991](http://rr.sapo.pt/informacao_detalhe.aspx?fid=26&did=114991)>. Acesso em: 20 dezembro 2013.
- <sup>16</sup> Sítio da RFI. Disponível em: <<http://www.portugues.rfi.fr/mundo/20130717-morte-de-21-criancas-intoxicadas-por-merenda-escolar-causa-indignacao-na-india>>. Acesso em 21 dezembro 2013.
- <sup>17</sup> Cavaliere, M. J.; Calore, E. E.; Perez, N. M.; Puga, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. *Revista de Saúde Pública* **1996**, *30*, 267. [CrossRef]
- <sup>18</sup> Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; Dacosta, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova* **2007**, *30*, 159. [CrossRef]
- <sup>19</sup> Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, *20*, 407. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Ordentlich, A.; Barak, D.; Sod-Moriah, G.; Kaplan, D.; Mizhari, D.; Segall, Y.; Kronman, C.; Karton, Y.; Lazar, A.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A. Stereoselectivity toward VX Is Determined by Interactions with Residues of the Acyl Pocket as Well as of the Peripheral Anionic Site of AChE. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11255. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>21</sup> Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R.; *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, John Wiley & Sons, 1996.
- <sup>22</sup> Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M.; Peakall, D. B.; *Principles of Ecotoxicology*, Taylor & Francis Ltd.: London, 1996.
- <sup>23</sup> Goodman Gilman, A.; *As bases farmacológicas da Terapêutica*, 10a. ed., McGraw-Hill, 2005.
- <sup>24</sup> Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* **2005**, *5*, 293. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>25</sup> Gonçalves, A. S.; França, T. C. C.; Figueroa-Villar, J. D.; Pascutti, P. G. Conformational analysis of toxogonine, TMB-4 and HI-6 using PM6 and RM1 methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 179. [CrossRef]
- <sup>26</sup> Silva, G. R.; Borges, I.; Figueroa-Villar, J. D. DFT conformational studies of the HI-6 molecule. *International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *105*, 260. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Petronilho, E. C.; Pinto, A. C.; Figueroa-Villar, J. D. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Revista Militar de Ciência e Tecnologia* **2011**, *28*, 1. [Link]
- <sup>28</sup> 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]
- <sup>29</sup> Petroianu, D. E., 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 in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 1328. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>30</sup> Kuca, K.; Musilova, L.; Palecek, J.; Cirkva, V.; Paar, M.; Musilek, K.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Karasova, J. Z.; Jun, D. Bisquaternary oximes reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon. *Molecules* **2009**, *14*, 4915. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>31</sup> Kuka, K.; Jun, D.; Musilek, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 269. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>32</sup> Worek, F.; Aurbek, N.; Wetherell, J.; Pearce, P.; Mann, T.; Thiermann, H. Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: Pig versus minipig acetylcholinesterase. *Toxicology* **2008**, *244*, 35. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>33</sup> Gonçalves, A. S.; França, T. C. C.; Figueroa-Villar, J. D.; Pascutti, P. G. Molecular

- dynamics simulations and QM/MM studies of the reactivation by 2-PAM of tabun inhibited human acetylcholinesterase. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**, *22*, 155. [[CrossRef](#)]
- <sup>34</sup> Gonçalves, A. S.; França, T. C. C., Silva, A. W. S.; Figueroa-Villar, J. D. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, *17*, 968. [[CrossRef](#)]
- <sup>35</sup> Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S. R.; Oliveira-Silva, J. 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](#)]
- <sup>36</sup> 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](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Castro, N. G.; Costa, R. S.; Pimentel, L. S.; Danuello, A.; Romeiro, N. C.; Viegas Jr., C.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Bolzani, V. S.; Rocha, M. S. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *580*, 339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Oliveira-Silva, J. J.; Alves, S. R.; Inácio, A. F.; Meyer, A.; Sarcinelli, P. N.; Mattos, R. C.; Ferreira, M.; Cunha, J. C.; Moreira, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human and Experimental Toxicology* **2000**, *19*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>39</sup> 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](#)]
- <sup>40</sup> Delfino, R. T, Figueroa-Villar, J. D. Nucleophilic reactivation of sarin-inhibited acetylcholinesterase: A molecular modeling study. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 8402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]