

ESTELA MUNHOZ SEGA

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **ESTELA MUNHOZ SEGA**.

Campinas, 27 de abril de 2006.

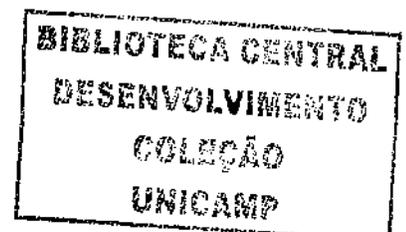
Prof(a). Dr(a). Nelci Fenalti Höehr

Orientador(a) *Nelci Fenalti Höehr*

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE NOVOS ORGANOFOSFORADOS E
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO
CLORETO DE ACETILCOLINA**

CAMPINAS

2006



ESTELA MUNHOZ SEGA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE NOVOS ORGANOFOSFORADOS E
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO
CLORETO DE ACETILCOLINA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção de título de Mestre em
Ciências Médicas, área de concentração Patologia Clínica*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO RITTNER NETO

CAMPINAS

2006

ii

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	T/unicamp
	Se 37 d
V	EX
TOMBO BC/	69925
PROC.	06-123-06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	11-9-06

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

DB ID 386510

Se37d

Sega, Estela Munhoz

Determinação da toxicidade in vitro e in vivo de novos organofosforados e ressonância magnética nuclear do cloreto de acetilcolina / Estela Munhoz Sega. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: Nelci Fenalti Höehr, Roberto Rittner Neto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Toxicidade. 2. Acetilcolina. 3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. 4. Toxicidade - Testes. I. Höehr, Nelci Fenalti. II. Rittner Neto, Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles : Determination of toxicity of the news organophosphorus and nuclear magnetic resonance of acetylcholine chloride

Keywords: • Toxicity

- Acetylcholine
- NMR spectroscopy
- Acute toxicity testing

Área de concentração : Patologia Clínica

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Prof Dr Ernani Abicht Basso

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

Data da defesa: 27-04-2006

À Deus e N. S. Desatadora dos nós por tudo e por todos os amigos.

Aos meus pais Pedro e Ana Marina pelo incentivo durante toda vida.

Aos meus irmãos Alice e Daniel pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório do CCI, Sueli, Paula e Márcia pela ajuda e ensinamentos na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética pela colaboração e ensinamentos principalmente a Dra. Anna Maria A. P. Fernandes que muito me ensinou.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do CPQBA pelos ensinamentos e colaboração principalmente a bióloga Ana Possenti que muito me ajudou na realização dos testes.

Aos amigos do Laboratório de Físico-Química pela paciência e ensinamentos, principalmente os doutores Paulo R. de Oliveira e Adriana K. C. Amorim Reis que tanto me ajudaram.

Aos amigos de todas as horas que foram muitos, pelo incentivo e amizade.

A Prof. Dra. Nelci Fenalti Höehr pela atenção, colaboração e a oportunidade da realização desse mestrado.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner pelos ensinamentos, paciência, atenção e pela oportunidade de aprender uma nova técnica.

Ao Prof. Dr. Cláudio F. Tomena pela atenção e pelos experimentos que contribuíram para esse mestrado.

Aos doutores Luzineide W. Tinoco e José D. Figueroa-Villar pela atenção e pelos experimentos que contribuíram para esse mestrado.

A Prof. Dra. Wanda Pereira de Almeida pelos ensinamentos, pela atenção e pelas valiosas sugestões recebidas no exame de qualificação.

Aos Profs. Dr. Roger Castilho e Dr. João Ernesto Carvalho, por permitirem a utilização de seus laboratórios, pela atenção dispensada e sugestões dadas no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ernani Abicht Basso pela participação no exame de defesa de tese.

Às secretárias da pós-graduação, Márcia, Silvia, Regina, pela atenção, paciência e profissionalismo.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Clínica pelo incentivo, amizade e colaboração.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

(Processo: 03/10202-8)

Ao FAEP, Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa, pelo apoio financeiro parcial para realização desta pesquisa.

(Processo: 1521-03)

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1.1- Organofosforados e Acetilcolina	18
1.2- Avaliação de toxicidade de novas substâncias	27
1.3- Células PC 12	29
1.4- RMN de Acetilcolina	29
2- OBJETIVOS	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Organofosforados	35
3.2- Inibição <i>in vitro</i> da colinesterase	35
3.3- Cultura de células	36
3.4- Estudos de citotoxicidade e determinação da IC 50	36
3.5- Estudos de toxicidade aguda em camundongos	38
3.6- Métodos de RMN	39
3.6.1- Materiais.....	39
3.6.2- Espectro de RMN.....	39
3.7- Experimentos de RMN de PFG	40
3.8- Tempo de relaxação nos espectros de RMN	40
4- RESULTADOS	42

4.1- Inibição <i>in vitro</i> da colinesterase.....	43
4.2- Estudos de citotoxicidade e determinação da IC 50.....	44
4.3- Estudos de toxicidade aguda e determinação da DL 50.....	45
4.4- Estudos da RMN da acetilcolina.....	45
5- DISCUSSÃO.....	50
5.1- Inibição da acetilcolinesterase.....	51
5.2- Citotoxicidade e Toxicidade Aguda.....	51
5.3- RNM do Cloreto de Acetilcolina.....	53
6- CONCLUSÃO.....	59
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
6- ANEXOS.....	68
Anexo 1.....	69
Anexo 2.....	71
Anexo 3.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
C₂D₂Cl₄	Tetracloroetano deuterado
CD₃CN	Acetonitrila deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CCI	Centro de Controle de Intoxicações.
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Gás carbônico
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.
D₂O	Água deuterada
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dullbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL50	Dose letal média (Concentração que é letal para 50% da população (estudada))
DTNB	Ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	E outros (as)
g	Gramas
h	horas
Hz	Hertz
IC50	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
IQ	Instituto de Química

kg	Kilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
MHz	Megahertz
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
ms	Milisegundos
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Solução salina de tampão fosfato (phosphate buffered saline)
PC12	Células de feocromocitoma de rato
PFG	Pulso com gradiente de campo
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
%	Percentual
UI	Unidade Internacional
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
°C	Graus Celsius

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase.....	43
Tabela 2 Valores de IC50 para os diferentes organofosforados.....	44
Tabela 3 Valores de DL50 para os diferentes organofosforados.....	45
Tabela 4 As constantes de acoplamento J_{HH} , ${}^3J_{NH}^a$ e J_{NC} (em Hz), para o sistema A_2B_2X do cloreto de acetilcolina (ACh), carbonos metilenos C-3 e C-4, em solventes de constantes dielétricas diferentes (ϵ).....	46
Tabela 5 Coeficiente de difusão de RMN ACh em diferentes concentrações de D_2O a $25^\circ C$	49
Tabela 6 Viscosidade, Coeficiente de difusão e Coeficiente de difusão corrigido para 100 mM ACh em $CDCl_3$, D_2O e CD_3OD	49

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Fórmula geral dos organofosforados.....	18
Figura 2 Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....	20
Figura 3 Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos.....	21
Figura 4 O confôrmero mais estável do cloreto de acetilcolina.....	30
Figura 5 Espectros de RMN de ^1H do $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+$ fragmento do cloreto de acetilcolina.....	47
Figura 6 Espectro expandido de RMN de ^1H do grupo OCH_2 (em campo baixo) de Ach.....	48
Figura 7 Confôrmeros estáveis para moléculas do tipo $\text{XCH}_2\text{CH}_2\text{Y}$	53

RESUMO

Esse estudo analisou as propriedades toxicológicas de novos compostos organofosforados. Foram realizados experimentos para avaliar a atividade anticolinesterásica desses organofosforados, *in vitro*, no sangue total através do método de Ellman modificado. Para determinar a sua citotoxicidade foram utilizadas células PC 12, com as quais avaliamos a viabilidade celular após contato com os organofosforados e determinamos a IC 50, encontrando valores muito diferentes para os diversos organofosforados estudados.

Estudos de toxicidade aguda *in vivo* foram realizados com camundongos, através da metodologia recomendada pela OECD nos quais determinamos a DL50 para três dos organofosforados estudados, sendo que um apresentou toxicidade moderada.

Foram analisados os efeitos dos solventes nas constantes de acoplamento $^2J_{HH}$, $^3J_{HH}$, $^1J_{NC}$ e $^2J_{NC}$ em espectros de RMN de 1H e ^{13}C do cloreto de acetilcolina.

Os valores das constantes de acoplamento em solventes de diferentes constantes dielétricas (ϵ) não sofreram variações, indicando uma ausência de efeitos de solvente no equilíbrio conformacional do cloreto de acetilcolina (ACh). As constantes de acoplamento mostram que o sistema $OCH_2CH_2N^+$ tem uma conformação *gauche* (*sinclinal*).

O J_{NH} e J_{NC} são observados na maioria dos solventes, mas não em solventes clorados e não são dependentes da viscosidade do solvente, esse comportamento foi explicado usando dados de medidas de T_1 . Os valores dos coeficientes de difusão de RMN mostraram que a ACh tem uma grande tendência de se agregar quando dissolvida em solventes clorados, fato que pode explicar as diferenças observadas em valores de T_1 para o ^{14}N .

ABSTRACT

This study analyzed the properties of the new organophosphorus.

Experiments had been carried through to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase of these organophosphorus, *in vitro*, through the modified Ellman's method. In order to determine its cytotoxicity cells PC12 had been used, with which we evaluate the cellular viability after contact with the organophosphorus and determined the IC₅₀, different values were found for the diverse organophosphorus.

Studies of acute toxicity had been carried through with mice, following the methodology recommended by the OECD in which determine the DL₅₀ for three of the organophosphorus studied, being that one presented moderate toxicity.

Coupling constants values (J_{HH} and J_{NC}) obtained from the 1H and ^{13}C NMR spectra of acetylcholine chloride (ACh) in several solvents with a wide range of dielectric constants (ϵ) are remarkably invariant, indicating an absence of solvent effects in the conformational equilibrium of this compound.

Those values show that the $OCH_2CH_2N^+$ system occurs in a synclinal conformation. The J_{NH} and J_{NC} are observable in most solvents, but not in chlorine-containing solvents and are not dependent on solvent viscosity. This behavior was explained using data from T_1 measurements. The measurement of NMR diffusion coefficients show that ACh has a greater tendency to aggregate when dissolved in chlorinated solvents, a fact that could explain the observed differences in $^{14}N T_1$.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Organofosforados e acetilcolina

Os compostos organofosforados têm atualmente uma ampla utilização na agricultura, como inseticidas e acaricidas, na medicina como medicamentos e estão entre as principais armas químicas existentes, conhecidas como os “gases dos nervos”, incluindo os gases: sarin (DAMODARAN et al.,2003; KHAN et al.,2000) , tabun e soman.

Devido à sua utilização como defensivos agrícolas, os organofosforados são de grande importância em diferentes áreas da toxicologia.

Esses compostos têm em sua estrutura um átomo de fósforo e um átomo de oxigênio, podendo apresentar uma grande variedade de substituintes como R₁ e R₂. Os grupos mais comuns são: alquila, alcóxi, arilóxi, amido, etc. e X pode ser um halogênio, cianeto, tiocianato, fenóxi, tiofenóxi, tiocolina ou carboxilato (HOLMSTEDT,1963), segundo fórmula geral (SCHRADER,1952) apresentada abaixo na Figura 1:

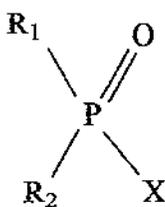


Figura 1- Fórmula geral dos organofosforados

Os organofosforados são conhecidos por causar efeitos neurotóxicos em humanos e animais por inibir a enzima acetilcolinesterase, por isso há necessidade de se realizar a dosagem de acetilcolinesterase nos trabalhadores que os aplicam e os que manipulam tais substâncias nas indústrias de síntese e formulações de inseticidas.

Acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima pertencente ao grupo das hidrolases, sua principal função fisiológica é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), para que a acetilcolina possa funcionar como neurotransmissor na transmissão juncional periférica, o éster precisa ser retirado ou inativado dentro dos limites de tempo impostos pelas características das respostas das junções neuroefetoras viscerais, placas motoras terminais e vários tipos de neurônios (GILMAN et al., 1996).

A acetilcolinesterase é encontrada nos neurônios colinérgicos (dendritos e axônios), nas proximidades das sinapses colinérgicas e em outros tecidos, essa enzima está presente em grandes quantidades na junção neuromuscular.

A acetilcolina é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico.

As ações deste transmissor são efetivadas pelos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais de um neurônio para outro, sendo que a acetilcolina precisa estar na conformação antiperiplanar para se ligar no receptor nicotínico.

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal axônico, quando um impulso nervoso atinge a junção neuromuscular, cerca de 125 vesículas de acetilcolina são liberadas pelos terminais no espaço sináptico, após ser liberada, a acetilcolina pode ter três destinos: ligar-se a um receptor muscarínico, ligar-se a um receptor nicotínico ou ser hidrolisada pela acetilcolinesterase transformando-se em íon acetato e colina.

A AchE é encontrada tanto no terminal nervoso como na superfície do órgão receptor e a colina recém formada é ativamente reabsorvida pelo terminal neural para ser utilizada na formação de nova acetilcolina (GUYTON e HALL, 1997) como demonstra a Figura 2.

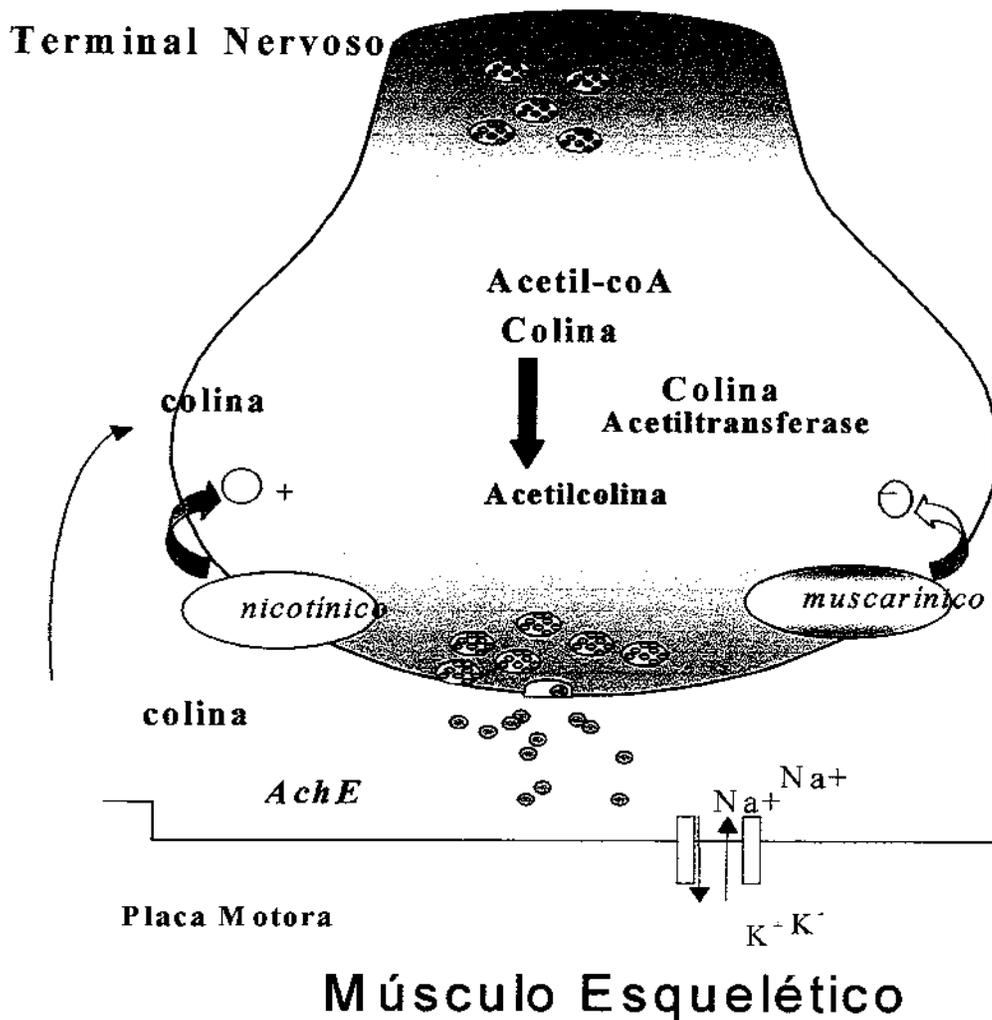


Figura 2- Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase

Substâncias que inibem a acetilcolinesterase são denominadas anticolinesterásicos (Figura 3), estes provocam um acúmulo de acetilcolina nos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos produzindo efeitos equivalentes à estimulação excessiva dos receptores colinérgicos no sistema nervoso central e periférico.

Os efeitos dos agentes anti-AChE são ativação das respostas dos receptores muscarínicos nos órgãos efetores autônomos, estimulação seguida de paralisia de todos os gânglios autônomos e músculos esqueléticos (ações nicotínicas) e estimulação subsequente dos receptores colinérgicos no SNC.

Após a administração de doses tóxicas ou letais de agentes anticolinesterásicos, esses efeitos podem ser na maioria observados.

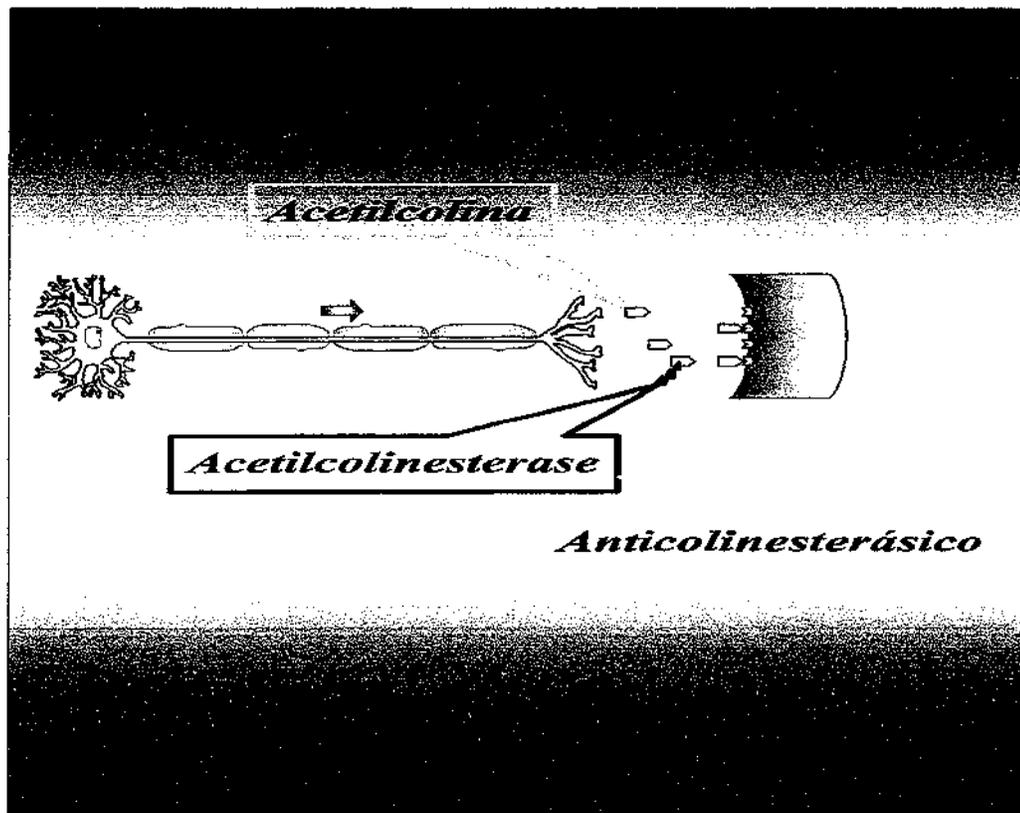


Figura 3- Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos

Devido à ampla distribuição dos receptores colinérgicos, os anticolinesterásicos têm uma extensa aplicação na forma de inseticidas agrícolas, armas químicas e no uso terapêutico (GILMAN et al., 1996) no caso de doenças como glaucoma, miastenia *gravis*, doenças do trato gastrointestinal e doença de Alzheimer (DARVESH et al., 2003; TARIOT et al., 2003).

Os compostos organofosforados são importantes agentes anticolinesterásicos e agem inibindo a AChE, para entendermos o mecanismo de inibição da enzima pelos organofosforados é necessário saber que a acetilcolinesterase possui dois sítios de ação: um sítio aniônico e um esterásico.

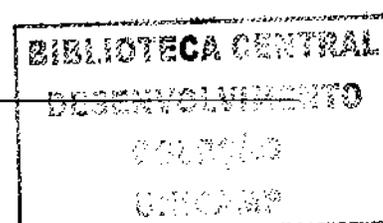
O sítio aniônico liga-se ao nitrogênio da acetilcolina, carregado positivamente, enquanto que no sítio esterásico há uma hidroxila de um resíduo do aminoácido serina, que se liga covalentemente à carboxila da acetilcolina, após a ligação da enzima com a acetilcolina ocorre a liberação de colina e a inclusão de água, com liberação do acetato.

Os organofosforados inibem a enzima ligando-se aos seus sítios esterásicos de forma estável. O átomo de fósforo do composto liga-se à hidroxila do resíduo do aminoácido serina do sítio esterásico, porém a liberação do grupo derivado do ácido fosfórico é muito lenta, e o sítio esterásico fica ocupado por muito tempo, não podendo receber a acetilcolina, inativando a AChE de forma irreversível em virtude da ligação covalente entre a enzima e o organofosforado. (MÍDIO e SILVA, 1995).

A capacidade inibitória dos organofosforados depende da sua estrutura química, por exemplo, os organofosforados pertencentes aos grupos dos fosforotiolatos são geralmente mais ativos que os fosfatos correspondentes e que os fosforoamidatos são menos ativos que os demais compostos (ETO,1974).

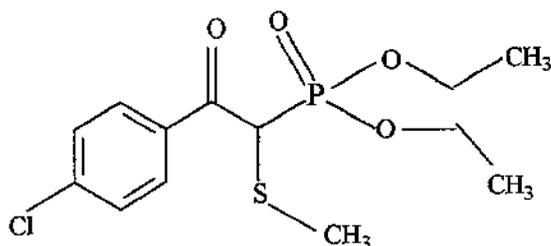
A intoxicação aguda por organofosforados é caracterizada por sinais e sintomas como salivação, sudorese, diarreia, miose, bradicardia, broncoconstrição, fraqueza muscular, convulsões (GILMAN et al., 1996). No tratamento em casos de intoxicação por organofosforado é recomendado o uso de um anticolinérgico (atropina) e um reativador da enzima, pertencente ao grupo químico das oxinas (pralidoxima).

A síntese de novos compostos organofosforados (compostos de 1 a 12) pelo laboratório do Professor Paulo Olivato do IQ-USP (REIS et al.,2005), nos levou a testar esses compostos quanto a sua toxicidade, pois estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado que a simples presença de um substituinte é suficiente para afetar significativamente algumas propriedades físico-químicas e biológicas de compostos anticolinesterásicos (HÖEHR, 1993).



As estruturas detalhadas dos compostos testados quanto a toxicidade são apresentadas a seguir:

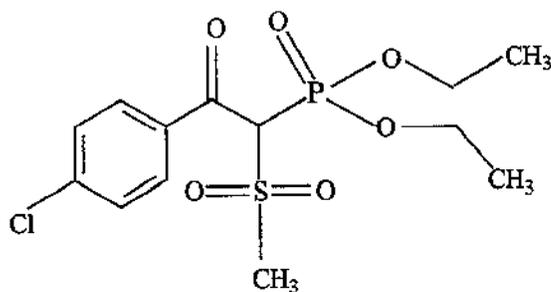
Organofosforado 1:



Cl-S-P

***α*-metiltio-*α*-dietoxifosforil-*para*-cloroacetofenona**

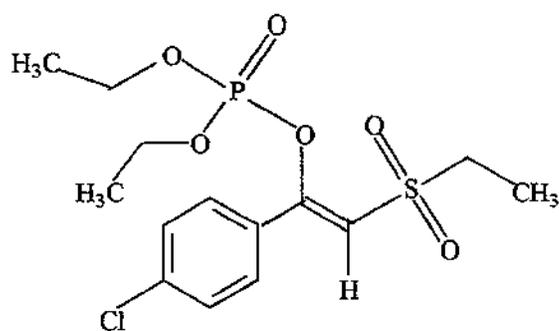
Organofosforado 2:



Cl-SO₂-PO

***α*-metilsulfonil-*α*-dietoxifosforil-*para*-cloroacetofenona**

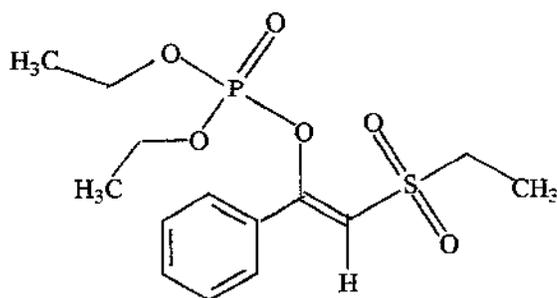
Organofosforado 3:



Cl-enol-PO

(Z) 1-(4'-clorofenil)-2-(etilsulfonil) vinil fosfato de dietila

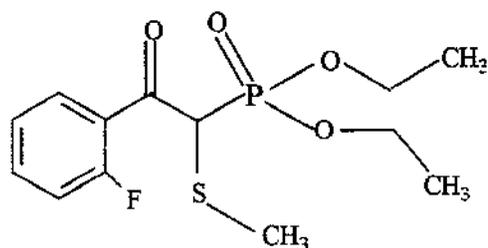
Organofosforado 4:



H-enol-PO

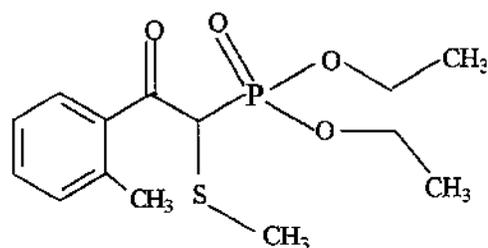
(Z)1- (4' – metoxifenil)- 2-(etilsulfonil) vinil fosfato de dietila

Organofosforado 5:



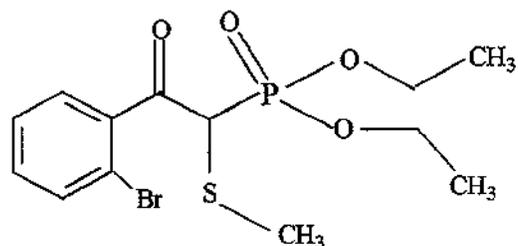
α -metiltio- α -dietoxifosforil-*orto*-fluoracetofenona

Organofosforado 6:



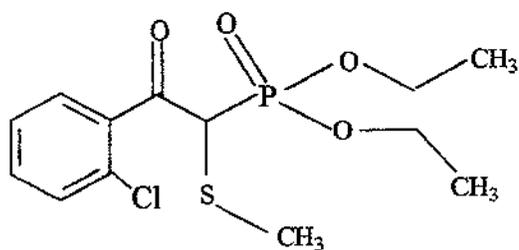
α -metiltio- α -dietoxifosforil-*orto*-metilacetofenona

Organofosforado 7:



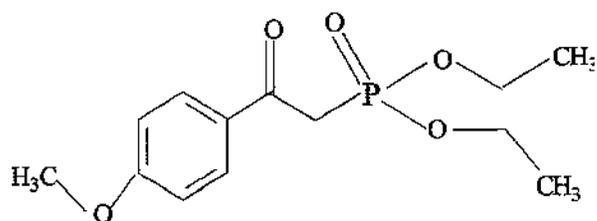
α -metiltio- α -dietoxifosforil-*orto*-bromoacetofenona

Organofosforado 8:



α -metiltio- α -dietoxifosforil-*orto*-cloroacetofenona

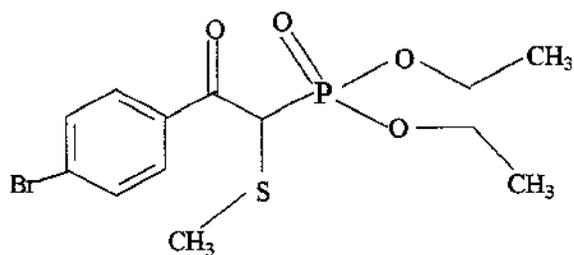
Organofosforado 9:



MeO-PO

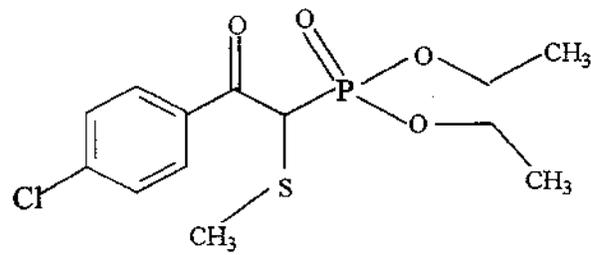
α - dietoxifosforil-*para*-metoxiacetofenona

Organofosforado 10:



α -metiltio- α -dietoxifosforil-*para*-bromoacetofenona

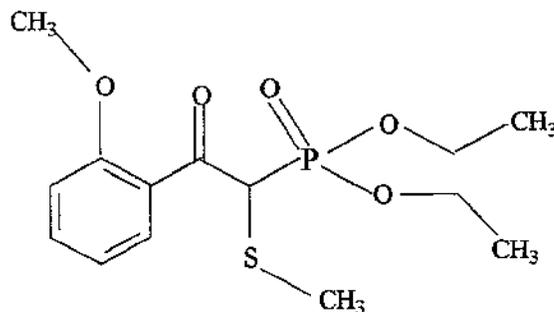
Organofosforado 11:



Cl-S-PO

***α*-metiltio-*α*-dietoxifosforil-*para*-cloroacetofenona**

Organofosforado 12:



***α*-metiltio-*α*-dietoxifosforil-*orto*-metoxiacetofenona**

1.2- Avaliação de toxicidade de novas substâncias

A introdução no mercado de novas drogas, cosméticos, aditivos de alimentos e outras substâncias, exigem que os mesmos passem por extensivos testes de toxicidade antes de obterem autorização para comercialização (FRESHNEY, 2005).

Testes de toxicidade aguda realizados em animais, envolvem avaliação de um efeito tóxico geral de uma única dose de um produto químico, ou em muitos casos, o efeito de múltiplas doses.

O estudo da toxicidade aguda tem como objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz a determinação da dose letal média (DL50) que corresponde a concentração do composto estudado que é letal para 50% da população estudada. Geralmente a substância estudada é administrada a ratos ou camundongos por via oral ou intraperitoneal em várias doses até atingir a faixa letal. O número de animais mortos num período de 14 dias é utilizado para calcular a DL50 (OGA,1996).

Os testes de toxicidade aguda fornecem a base para classificar produtos químicos com relação a sua manipulação, transporte e uso, também para definir os mecanismos de ação tóxica, estabelecer níveis de doses para outros testes e propor recomendações médicas em caso de envenenamento.

Estes testes envolvem normalmente um grande número de animais, os quais são caros e acarretam problemas de ordem ética (MEYER,2003).

Nesse estudo todos os organofosforados foram testados através de testes de toxicidade *in vitro* e apenas três deles foram testados em animais.

Não se pode afirmar que os mesmos sistemas *in vitro* irão prover dados tóxicos que serão totalmente equivalentes àqueles derivados de um sistema *in vivo*, da mesma forma que os resultados dos testes com animais não são totalmente representativos da experiência humana à exposição a uma substância tóxica.

Apesar das diferenças, a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* para simular uma resposta toxicológica em humanos tem se mostrado muito útil na proteção da população e houve avanços na nossa compreensão dos sistemas biomédicos (STARK et al.,1986).

Muitos estudos têm demonstrado boa correlação entre citotoxicidade *in vitro* obtida com linhagens celulares indiferenciadas e dados de DL50 (ROGUET et al.,1993; GULDEN e SEIBERT, 2003), entretanto a toxicidade aguda pode ser causada por uma variedade de mecanismos, muitos destes estudos podem não corresponder aos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade.

1.3-Células PC12

Nesse estudo utilizaremos a linhagem celular adrenal feocromocitoma PC12 de rato, linhagem esta clonada inicialmente de células tumorais da medula adrenal de rato (WARREN e CHUTE, 1972), que podem ser mantidas por muitos anos, sem que ocorram alterações em suas características fisiológicas.

Estas células possuem receptores colinérgicos e uma série de outros receptores para neurotransmissores (JAMES E WOOD, 1992) sendo semelhantes a células adrenérgicas, pois possuem a enzima acetilcolinesterase (AChE) e a capacidade de sintetizar, armazenar e liberar acetilcolina (GREENE e REIN, 1977).

Por apresentarem essas características essas células são utilizadas em diversos estudos (DAS e BARONE, 1999; LI e CASIDA, 1998; SONG et al., 1998) para avaliação da neurotoxicidade de anticolinesterásicos.

1.4- RMN de acetilcolina

A conformação da acetilcolina (ACh) tem sido objeto de estudo de um grande número de investigações teóricas (BERTHIER et al., 2000; MARINO et al., 2001; SONG et al., 2004) e experimentais (JENSEN, 1982; CASSIDEI e SCIACOVELLI, 1981; KIM et al., 1992), entretanto os resultados indicam que toda conformação de ACh em estado desidratado é controlado por energias conformacionais vindas de interações eletrostáticas causadas por uma forte interação eletrostática entre os átomos de O(OCH₂) e N⁺ (Figura 4).

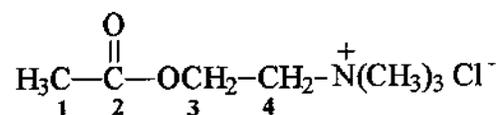
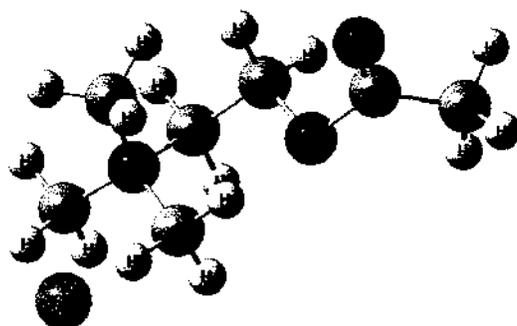


Figura 4- O conformero mais estável do cloreto de acetilcolina.

Como no estado desidratado, a interação íon-dipolo entre os átomos de O e N⁺ também tem um significado importante na estabilidade da conformação mais estável da ACh no estado hidratado.

A conformação *antiperiplanar (trans)* é menos estável por 1 kcal mol⁻¹ em relação a conformação *sinclinal (gauche)* durante o processo de hidratação (KIM et al.,1992; LICHTENBERG et al.,1974).

A relevância de um espectro de RMN de núcleo de spin 1/2 (¹H ou ¹³C) para a química orgânica é a influência que um núcleo quadrupolar (¹⁴N) tem na multiplicidade dos sinais em virtude do seu acoplamento escalar mútuo e sua relaxação.

O acoplamento para o núcleo quadrupolar de spin I produz, em teoria, linhas 2nI + 1, entretanto, se a relaxação do núcleo quadrupolar é relativamente rápida para a magnitude do acoplamento, o sinal pode não ser observado.

A ressonância do carbono em CDCl₃ é somente um tripleto porque o deutério tem um momento quadrupolo relativamente pequeno fazendo um acoplamento aparente, visto que todos os acoplamentos com núcleos clorados (³⁵Cl e ³⁷Cl, tem I=3/2) não aparecem devido a uma relaxação muito rápida desses spins (CLARIDGE, 1999).

A relaxação quadrupolar do ^{14}N (spin 1, $Q = +2.044 \text{ fm}^2$) é muito dependente da simetria de substituição ao redor do núcleo de nitrogênio e dos efeitos de ressonância de outros núcleos, com spin 1/2, na sua vizinhança, portanto a relaxação quadrupolar de ^{14}N e os acoplamentos quadrupolares $^1\text{H} - ^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C} - ^{14}\text{N}$ (J_{NH} e J_{NC} , respectivamente) são sensíveis a mudanças no ambiente ao redor do nitrogênio (BOVEY, 1969). Por isso, para maioria dos compostos, existe o interesse no estudo das propriedades do núcleo do ^{14}N , uma vez que os átomos de nitrogênio estão geralmente localizados em posições moleculares estratégicas e estão diretamente envolvidas nas interações soluto-solvente (RICHARDS e THOMAS, 1974; GEROTHANASSIS, 1987).

Outros fatores importantes que afetam a relaxação quadrupolar são a temperatura e a viscosidade. Os formatos das linhas observadas pelo núcleo acoplado são alterados pelas mudanças de viscosidade e temperatura, assim como o acréscimo na temperatura leva a uma lenta relaxação e uma melhor resolução dos multipletes (AKITT, 1992).

Alternativamente, baixas temperaturas aumentam a velocidade de relaxação quadrupolar e se a ressonância de núcleos de spin 1/2 acoplados for ampla, a relaxação se torna muito rápida para que qualquer acoplamento seja exibido (AKITT, 1992).

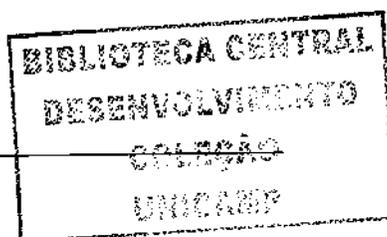
2- OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

Determinar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* desses novos organofosforados e investigar sua atividade anticolinesterásica.

Fazer uma triagem inicial da toxicidade desses organofosforados e comparar a toxicidade desses novos compostos com os organofosforados já existentes no mercado.

Estudar o comportamento do cloreto de acetilcolina (ACh) em vários solventes para se determinar quais as interações com os solventes que afetam a sua conformação, a sua mobilidade e formas de agregação, dando ênfase às mudanças que ocorrem com a constante de acoplamento e a relaxação quadrupolar do ^{14}N com o aumento na polaridade do solvente, procurando entender os fatores que governam as interações soluto-solvente.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Organofosforados

Os organofosforados foram sintetizados pelo laboratório do Prof. Dr. Paulo Olivato do IQ-USP.

3.2- Inibição *in vitro* da acetilcolinesterase

Estes experimentos foram realizados utilizando-se de amostras de sangue total heparinizadas que foram gentilmente cedidas pelo Centro de Controle de Intoxicações (CCI) da Unicamp, coletadas de pacientes do ambulatório de Toxicologia e Medicina do Trabalho do Hospital das Clínicas da Unicamp. A utilização dessas amostras foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Unicamp segundo parecer número 441/2003 expedido em 18/11/2003 (**Anexo 1**).

As amostras foram inicialmente analisadas quanto a sua atividade colinesterásica pelo laboratório do CCI e posteriormente após a determinação da pseudocolinesterase plasmática e acetilcolinesterase eritrocitária caso os valores estivessem dentro da faixa de normalidade (pseudocolinesterase plasmática entre 1,5–3,5 UI/ mL e acetilcolinesterase eritrocitária entre 2,6 – 4,1 UI/mL) o material era utilizado em nossos estudos.

A dosagem dessas amostras foi realizada por espectrofotometria em 405 nm pelo método de Ellman (ELLMAN et al., 1961; VAN SITTERT, 1987) modificado usando ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e como substrato o iodeto de propioniltiocolina.

Os novos organofosforados foram testados primeiramente como inibidor para acetilcolinesterase substituindo a eserina (também denominada fisostigmina) normalmente no método de Ellman. Neste teste foi utilizado o diclorometano como veículo para o organofosforado.

Posteriormente esses compostos foram adicionados diretamente no sangue na concentração de 10 mg/mL para posterior dosagem da colinesterase pelo método de Ellman para avaliação da atividade anticolinesterásica desses compostos (SILVA, 1996).

3.3- Cultura de células

Nesse trabalho foram utilizadas células de feocromocitoma de rato da linhagem PC12, gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Roger Castilho. As culturas celulares foram mantidas em frascos de cultura (75 cm²) em meio de Eagle modificado por Dullbecco (DMEM) contendo 4,5g de glicose por litro suplementado com 10% de soro equino inativado por calor, 5% de soro fetal bovino inativado e 1% de penicilina 10.000 UI/mL e streptomicina 10 mg/mL.

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, em cultura contínua através de repiques periódicos. Os repiques foram feitos durante a fase de crescimento logarítmico, quando as mesmas atingissem a densidade de confluência em torno de 3 x 10⁶ células por ml. Para verificar a densidade de confluência era feita a contagem das células em câmara de Neubauer utilizando-se do corante azul de tripan.

Para descolamento das células do substrato sólido é adicionado ao frasco de cultura 10 mL do próprio meio DMEM suplementado e descolamos as células com “cell scraper”(raspagem), mantendo sempre em cada frasco um volume total de 20 ml sendo 5 ml de células PC 12 e 15 mL de meio DMEM suplementado como descrito acima.

3.4- Estudos de citotoxicidade e determinação da IC50

Os estudos de citotoxicidade foram realizados no laboratório de Bioenergética da faculdade de Ciências Médicas, esses estudos determinaram os valores de IC 50 que corresponde à concentração do composto em estudo que inibe 50% do crescimento celular.

Os testes foram feitos em discos de cultura de células que tinham a dimensão de 35 mm x 10 mm. Nestes discos foram colocados o meio DMEM suplementado e as células PC 12 que foram retiradas dos frascos de cultura iniciais que possuíam em torno de 3 x 10⁶ células por mL.

Foi colocado nos discos de cultura um volume final de 3 mL de meio suplementado misturado às células que tinham numa concentração final aproximadamente 1x10⁶ células /ml. Os discos de cultura ficavam na estufa a 37°C, em atmosfera contendo

5% de CO₂, durante 12hs. Após esse período as células foram tratadas com os organofosforados, sendo usado como veículo para o organofosforado o dimetilsulfóxido (DMSO) e no grupo controle foi colocado somente DMSO.

Os estudos foram feitos com diferentes concentrações dos organofosforados que variavam de 0 mM a 20 mM para se determinar a IC 50. A viabilidade celular era observada no período de 72hs após a administração do organofosforado.

A taxa de sobrevivência celular inicialmente estava sendo quantificada fluorimetricamente utilizando-se o espectrofluorímetro Hitachi F-4010, no comprimento de onda entre 365-580 nm, utilizando-se 4 µL de brometo de etídio e 0,005% de digitonina, as leituras eram realizadas comparando-se as amostras de células controle com amostras de células expostas aos organofosforados. Para alguns organofosforados não foi possível obtermos leituras devido à alta turvação apresentada pela amostra.

Optamos por alterar a forma de avaliar a taxa de sobrevivência celular e passamos a avaliar a viabilidade celular através do corante azul de tripan a 0,1% em solução de PBS, contando as células viáveis em câmara de Neubauer, para termos uma avaliação uniforme de todos os organofosforados.

A contagem das células foi realizada contando-se os quatro quadrantes presentes na câmara de Neubauer na qual as células que apresentavam coloração azul eram consideradas inviáveis e as células não coradas eram as células viáveis. Os valores encontrados foram divididos por 4 e em seguida multiplicados por 10⁴ que é o valor correspondente a área de cada quadrante (1mm²) somado ao espaço encontrado entre a lamínula e a câmara (0,1 mm) que equivale a 0,1 µl ou 10⁻⁴ ml. Por isso multiplica-se por 10⁴ para obter o número de células em cada mililitro, e o resultado é multiplicado por 10 que é o valor de diluição no azul de tripan.

A diluição foi realizada utilizando-se 100µL de células retiradas do disco de cultura com organofosforado e 900µL de azul de tripan.

Após a contagem das células, a porcentagem de células viáveis foi utilizada para estabelecer a IC50, que foi estabelecida através da inserção dos dados de viabilidade no programa GraphPad Prism 4 (<http://www.graphpad.com>).

3.5- Estudos de toxicidade aguda em camundongos

Os testes foram realizados no laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e tiveram como objetivo avaliar os riscos desses compostos para saúde humana através do estudo com camundongos.

Os estudos de toxicidade *in vivo* foram realizados através da determinação da dose letal média (DL50) que é a concentração do composto estudado, letal para 50% da população estudada. A DL 50 foi calculada após a inserção dos dados num programa rotineiramente utilizado no laboratório de Farmacologia e Toxicologia para o cálculo da DL 50.

De acordo com o valor da DL 50 encontrado, o organofosforado recebe uma classificação de acordo com “The globally harmonized system for hazard classification and labelling 2003” (<http://www.unece.org>) da organização UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) que indica o seu nível de toxicidade (**Anexo 2**).

Os testes para determinar a DL50 foram realizados com camundongos da linhagem Swiss machos adultos pesando entre 20-30 g, ambientados a 22°C com fotoperíodo de 12/12 h, mantidos com ração e água *ad libitum*. A utilização dos animais para esse estudo foi aprovada pela comissão de ética na experimentação animal da UNICAMP, segundo protocolo 607-1 de 03/10/2003 (**Anexo 3**).

Para determinação da DL50, os camundongos permaneceram em jejum por 12 horas, no dia do teste os camundongos foram pesados e divididos em grupos de cinco animais nos quais são administradas diferentes concentrações do organofosforado para cada grupo.

As doses são uma mistura do organofosforado dissolvido em uma solução salina (NaCl a 1%), caso não haja diluição completa do organofosforado é necessário adicionar uma gota de Tween (detergente não-iônico).

As doses foram administradas aos camundongos por via oral através de sonda gástrica em diferentes concentrações num intervalo de 30 a 1000 mg/kg.

Os valores que correspondem a essas concentrações são calculados por regra de três após pesagem dos animais, o volume de solução salina adicionado ao organofosforado também é calculado pelo peso do camundongo e corresponde a 0,01 ml/g e ao grupo controle foi administrado apenas solução salina.

Após a ingestão das doses, foi observada a taxa de mortalidade durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante o primeiro dia e diariamente num período de 14 dias.

Adicionalmente à taxa de mortalidade, foram observadas as ocorrências de sinais ou sintomas do sistema nervoso autônomo (salivação, diarreia) e do sistema central e periférico (tremor, convulsão, coma).

Para a realização dos testes de DL50 escolhemos apenas três organofosforados dos testes para que não houvesse um grande número de animais sacrificados, uma vez que para cada dose testada são utilizados 5 animais.

Os organofosforados estudados nos animais foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos com o trabalho realizado com as células, optamos por utilizar os organofosforados que tiveram a IC50 num valor mais elevado o que significa que são menos tóxicos, portanto foram utilizados os organofosforados 9 e 11 e o organofosforado 4 que apresentou um valor intermediário de IC 50 entre os valores mais tóxicos e menos tóxicos.

3.6- Métodos de RMN

3.6.1- Materiais

O Cloreto de acetilcolina (Aldrich) foi utilizado sem purificação.

3.6.2- Espectro de RMN

O espectro de RMN de ^1H em solventes de diferentes constantes dielétricas (ϵ) foram obtidos no espectrômetro Varian Gemini 300 com concentração de 0.15 mol L^{-1} , sendo usados como referência interna SiMe_4 (TMS) e 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS).

O espectro de RMN de ^1H foi obtido nas seguintes condições: 128 transientes acumulados em 32k pontos de dados com um pulso de 37° , largura de varredura de ca. 3000 Hz e tempo de aquisição (AT) de ca. 2.7 s; e para o espectro de ^{13}C NMR: 1024 transientes, 32k pontos de dados, pulso de 45° , largura de varredura de ca. 10000 Hz e AT 1 s. A atribuição dos sinais nos espectros de ^1H e ^{13}C NMR da ACh foram realizados através de experimentos bidimensionais HETCOR.

3.7- Experimentos de RMN de PFG

Para os experimentos de RMN de pulso com gradiente de campo (PFG), as amostras de ACh nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100mM foram preparadas em D_2O .

O espectro de RMN com PFG para ACh foi também determinado na concentração de 100 mM nos solventes: D_2O , CD_3OD e CDCl_3 . Os espectros de PFG (WIDER et al., 1994) foram adquiridos a 25°C num espectrômetro Bruker DRX 400 usando-se sondas de 5mm de diâmetro com detecção no modo inverso com um único gradiente(Z) . Uma seqüência de pulsos de repetição foi estimulada usando pulsos de gradiente bipolar para difusão (ANTALEK, 2002). Os coeficientes de difusão medidos através de um aumento da amplitude de gradientes de pulsos em 8 passos [$0.68 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$ (2%) para $13.62 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$ (50%)]. A duração do gradiente de pulso (10 ms) e o tempo de difusão (20ms) foram constantes. O espectro foi adquirido com um tempo de relaxação de 1.5 s e com 16 varreduras.

3.8- Tempo de relaxação nos espectros de RMN

O tempo de relaxação do ^{14}N foi determinado através de experimentos de inversão-recuperação no espectrômetro Bruker Advance DPX 300 operando em 21.68 MHz para ^{14}N .

A amostra foi preparada em um tubo de RMN de 5mm com 100mg de ACh diluída em 0.7 mL do solvente, sendo utilizados como solventes CDCl_3 e DMSO-d_6 .

A seqüência de pulsos começa com tempo de reciclagem ($D_1=2s$), que é suficientemente longo para assegurar que toda magnetização retorne ao equilíbrio. Um pulso de 180° é aplicado para inversão de toda magnetização.

Durante o tempo de reciclagem a magnetização é feita para recuperar uma certa soma (tempo de reciclagem variando de 5 até 60 ms) e para finalizar um pulso de 90° converte a z-magnetização residual em uma observável magnetização transversa, que é detectada durante o período de aquisição ($AQ=0.9s$) (BRAUN et al.,1996).

4- RESULTADOS

4.1- Inibição *in vitro* da acetilcolinesterase

O primeiro teste realizado consistiu em testar os organofosforados como inibidores para acetilcolinesterase substituindo a eserina normalmente no método de Ellman (ELLMAN et al., 1961), nos testes realizados nenhum organofosforado se mostrou eficiente na substituição da eserina, pois não houve a interrupção total da reação enzima - substrato (colinesterase - iodeto de propioniltiocolina) como normalmente ocorre com a eserina.

Os resultados da inibição da colinesterase total (T), plasmática (P) e eritrocitária (E) encontrados após adição dos organofosforados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase

Organofosforado	Inibição T	Inibição P	Inibição E
1	36,5%	40,9%	33,3%
2	20%	0%	24%
3	100%	100%	100%
4	100%	100%	100%
5	11,5%	8,2%	14,3%
6	18,7%	20,3%	18,8%
7	0%	0%	0%
8	0%	0%	0%
9	56,4%	69,3%	42,5%
10	57,7%	92,75%	29,95%
11	28%	39%	16%
12	22,4%	23%	22%

4.2- Estudos de citotoxicidade e determinação da IC 50

Nos estudos de citotoxicidade estabelecemos os valores de IC50, que representa o valor da concentração de organofosforado que tem 50% das células viáveis, os valores encontrados foram calculados após a contagem das células, a porcentagem de células viáveis relacionadas com o logaritmo da concentração do organofosforado foi inserida programa GraphPad Prism 4 (<http://www.graphpad.com>) que nos forneceu o valores de IC 50 para os diferentes organofosforados, esses valores estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de IC50 para os diferentes organofosforados

Composto	IC 50 (mM)	R2
Organofosforado 1	33,9	0,945
Organofosforado 2	1,7	0,99
Organofosforado 3	8,95	0,97
Organofosforado 4	7,5	0,98
Organofosforado 5	19,44	0,965
Organofosforado 6	6,85	0,97
Organofosforado 7	3,18	0,95
Organofosforado 8	1,3	0,95
Organofosforado 9	67,5	0,97
Organofosforado 10	7,38	0,95
Organofosforado 11	2302	0,97
Organofosforado 12	7,32	0,96

4.3- Estudos de toxicidade aguda e determinação da DL 50

Os valores da DL 50 encontrados para os organofosforados 4, 9 e 11 estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de DL50 para os diferentes organofosforados

Composto	DL 50 (mg/kg)
Organofosforado 4	40
Organofosforado 9	300
Organofosforado 11	950

Os animais após a administração dos organofosforados apresentaram sinais típicos de estimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático como sialorréia intensa, diarreia e aumento de micção, quando administramos o composto 4 as mortes foram rápidas e não observamos sinais apresentados pelos compostos 9 e 11 como sinais de alteração do SNC como fraqueza muscular, hipotonia, ataxia, falta de coordenação motora e sonolência, a morte dos animais nas doses mais elevadas de todos os compostos era produzida após convulsão.

4.4- Estudos da RMN da acetilcolina

Os resultados de RMN descritos foram obtidos através de uma metodologia utilizada em nosso laboratório, inicialmente foi feita uma interpretação completa dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de ACh. As atribuições dos sinais dos grupos OCH_2 e CH_2N^+ foram feitas utilizando o mapa de contorno 2D HETCOR, no qual são mostrados os sinais em 4.58 e 3.76 ppm correspondentes aos grupos OCH_2 e CH_2N^+ respectivamente.

Então, o efeito dos solventes no equilíbrio conformacional da ACh foi comparado entre solventes de diferentes polaridades (ϵ 4.8 to 80.0). As constantes de acoplamento J_{HH} e J_{NC} para os hidrogênios H-3 e H-4 foram extraídos dos espectros de

hidrogênio, do mesmo modo o acoplamento J_{NC} foi mensurado diretamente no espectro de ^{13}C com próton desacoplado e seus valores são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- As constantes de acoplamento J_{HH} , $^3J_{NH}$ ^a e J_{NC} (em Hz), para o sistema A_2B_2X do cloreto de acetilcolina (ACh), carbonos metílenos C-3 e C-4, em solventes de constantes dielétricas diferentes (ϵ). ^a $^3J_{NH} = 2.5$ Hz. ^b Não observável. ^c Sinal expandido, incluindo $^3J_{NH}$. ^d Insolúvel. ^e Multiplete.

Solvente	ϵ	$^2J_{H_3H_3'}$	$^3J_{H_3H_4}$	$^2J_{H_4H_4'}$	$^3J_{H_4H_3}$	$^2J_{NC3}$	$^1J_{NC4}$
CDCl ₃	4.8	7.1	2.5	7.2	2.6	^b	^b
C ₂ D ₂ Cl ₄	8.5	7.1	2.7	7.1	2.7	^b	^b
Piridina	12.4	15.1 ^c	-	7.2	2.6	^d	^d
Acetona	20.7	14.9 ^c	-	7.2	2.6	3.9	3.3
CD ₃ OD	33.0	15.0 ^c	-	7.1	2.5	3.7	3.1
CD ₃ CN	37.5	14.9 ^c	-	7.2	2.7	^e	3.1
DMSO	46.7	14.4 ^c	-	7.3	2.6	3.3	^e
D ₂ O	80.0	14.8 ^c	-	7.2	2.3	3.9	3.4

Os espectros de RMN de 1H do O-CH₂-CH₂-N⁺ fragmento do cloreto de acetilcolina em diferentes frequências e solventes estão apresentados na Figura 5.

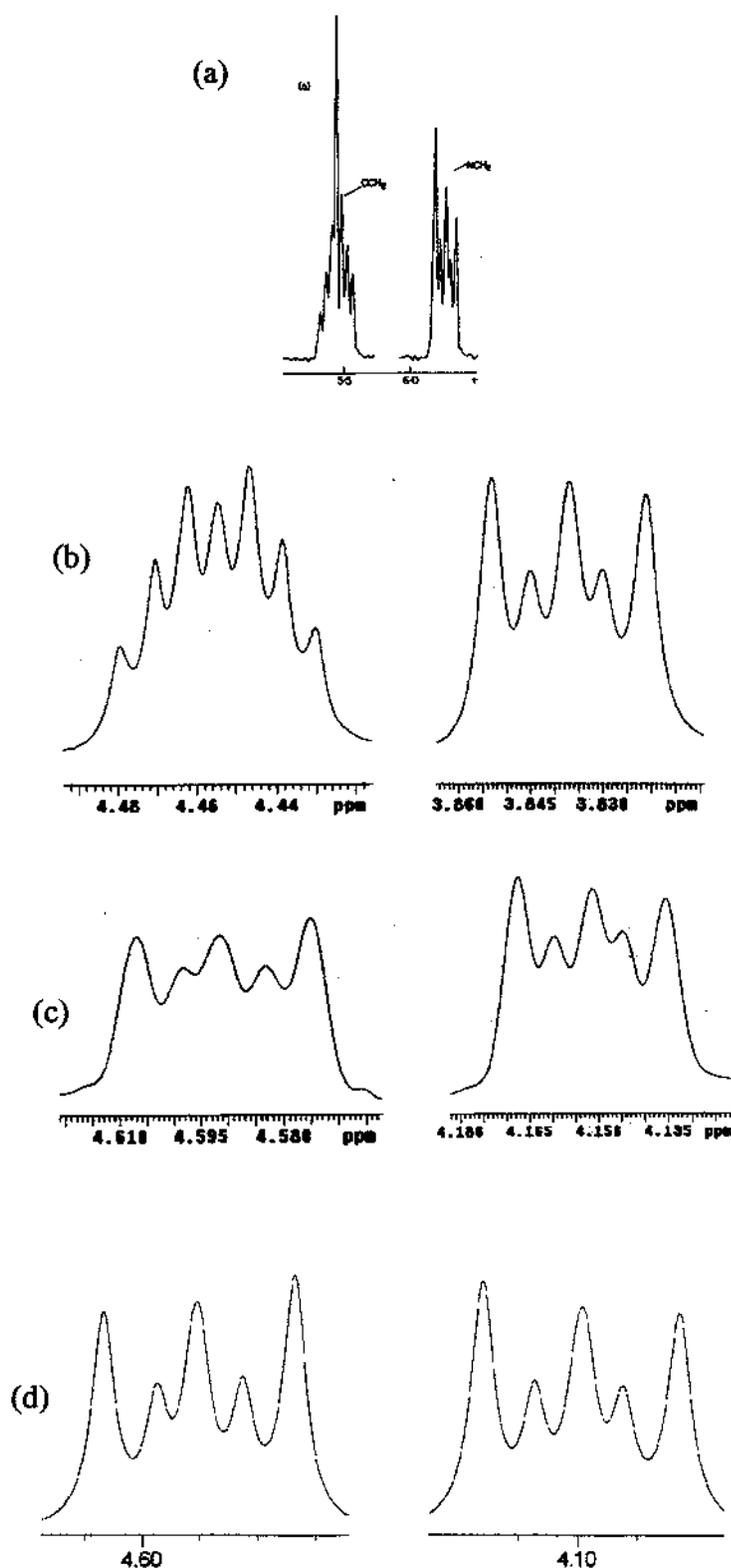


Figura 5- Espectros de RMN de ^1H do $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+$ fragmento do cloreto de acetilcolina: (a) em 60 MHz; em 300 MHz: (b) em CD_3CN ; (c) em CDCl_3 e (d) simulado. O sinal de OCH_2 é mostrado a esquerda.

Os espectros simulados no programa MESTRE-C estão apresentados na

Figura 6.

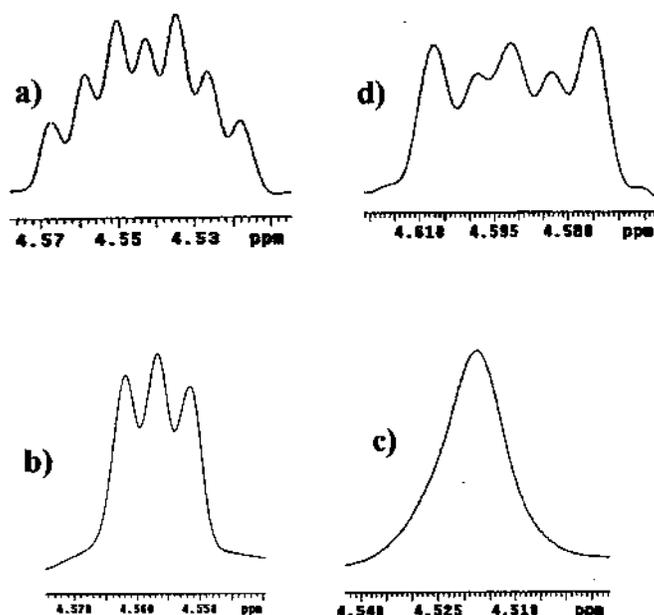


Figura 6- Espectro expandido de RMN de ^1H do grupo OCH_2 (em campo baixo) de ACh. a) em D_2O ; b) em CDCl_3 ; espectro de RMN de ^1H do grupo OCH_2 com desacoplamento dos hidrogênios do grupo CH_2N^+ c) em D_2O e d) em CDCl_3 .

Os resultados dos experimentos de PFG realizados para avaliar o coeficiente de difusão em diferentes concentrações de D_2O estão representados na Tabela 5.

Tabela 5- Coeficiente de difusão de RMN ACh em diferentes concentrações de D₂O a 25 °C.

Concentração (mM)	ACh D x 10 ¹⁰ (m ² /s)	Desvio Padrão (x10 ¹⁰)	HDO* D x 10 ⁹ (m ² /s)
1	5.29	0.06	1.52
5	5.48	0.10	1.62
10	5.52	0.24	1.69
25	5.58	0.25	1.56
50	5.51	0.30	1.59
100	5.44	0.53	1.51
Desvio Padrão		0.09x10 ⁻¹⁰	0.07x10 ⁻⁹

*O coeficiente de difusão foi determinado quando a pureza do HDO era 1.51x10⁻¹⁰ m²/s.

São apresentados na Tabela 6 os coeficientes determinados para acetilcolina em D₂O, CD₃OD e CDCl₃.

Tabela 6- Viscosidade, Coeficiente de difusão e Coeficiente de difusão corrigido para 100 mM ACh em CDCl₃, D₂O e CD₃OD

Solvente	Viscosidade (η, mPa, 25°C)	Coeficiente de difusão (D x 10 ¹⁰ , m ² s ⁻¹)	Coeficiente de difusão corrigido (η x D x 10 ¹⁰)
D ₂ O	0.890	5.44	4.84
CD ₃ OD	0.544	10.6	5.77
CDCl ₃	0.537	4.58	2.46

5- DISCUSSÃO

5.1- Inibição da acetilcolinesterase

Uma das maneiras de estudar a inibição da acetilcolinesterase é a inibição enzimática *in vitro*. Esta pode ser obtida adicionando-se compostos inibidores de colinesterases diretamente à amostra de sangue.

Alguns pesquisadores (CLOTHIER et al., 1981; SILVA, 1996; SKRINJARIC-SPOLJAR et al., 1988; SMITH, 1974) utilizaram inseticidas anticolinesterásicos na inibição *in vitro*, para pesquisas de diferentes objetivos.

Para o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) os organofosforados não se mostram eficientes na substituição da eserina, pois não houve a interrupção total da reação enzima - substrato.

Os resultados da inibição da colinesterase total (T), plasmática (P) e eritrocitária (E) encontrados após adição dos organofosforados descritos na Tabela 1, demonstram grande variação entre os organofosforados enquanto os organofosforados 3 e 4 inibem a total das colinesterases mostrando-se altamente tóxicos, os organofosforados 7 e 8 não apresentaram nenhuma inibição, apresentando baixa toxicidade.

É interessante observar que os compostos 3 e 4 são os únicos que apresentam uma dupla ligação C=C conjugada com o anel e com o grupo sulfonila.

5.2- Citotoxicidade e Toxicidade Aguda

Os futuros compostos a serem lançados no mercado precisam ser cuidadosamente avaliados quanto aos seus riscos potenciais, antes de se iniciar o seu uso.

Um dos testes utilizados na avaliação e classificação de compostos como os organofosforados é o teste de toxicidade aguda, no qual se determina o valor da DL50.

Para se determinar o valor da DL50 é necessário um grande número de animais, para evitar o uso de animais, os testes de toxicidade aguda tem sido substituído por ensaios *in vitro* (SEIBERT et al., 1996; KATZUNG, 1994; TRIGLIA, et al., 1991)

Um dos ensaios *in vitro* mais utilizados em substituição aos testes de toxicidade aguda é o teste de citotoxicidade em cultura de células. Nesse estudo foram feitos testes de citotoxicidade para os 12 organofosforados estudados, de acordo com o resultado dos testes de citotoxicidade foram escolhidos apenas três organofosforados para serem feitos testes de toxicidade aguda.

Os testes de citotoxicidade demonstram diferentes valores para os diversos organofosforados, os compostos que apresentaram maior toxicidade foram os organofosforados 2 e 8 e os menos tóxicos foram os organofosforados 9 e 11. Ao compararmos os organofosforados estudados com os já existentes no mercado podemos dizer que todos são menos tóxicos que paraxon ($IC_{50}=0,04mM$), que é um organofosforado extremamente tóxico, entretanto se compararmos os 12 compostos ao fenthion que é um organofosforado de toxicidade moderada ($IC_{50}=4,8mM$), os organofosforados 2,7 e 8 são mais tóxicos (FLASKOS et al.,1994; VERONESI e EHRICH, 1993).

Após os testes de citotoxicidade, foram escolhidos 3 compostos para serem realizados os testes de toxicidade aguda, escolhemos os compostos que tiveram a IC_{50} num valor mais elevado o que significa que são menos tóxicos, portanto foram utilizados os organofosforados 9 e 11 e o organofosforado 4 que apresentou um valor intermediário de IC_{50} entre os valores mais tóxicos e menos tóxicos.

De acordo com os valores de DL_{50} encontrados os organofosforados receberam uma classificação de acordo com os critérios da UNECE (Anexo 2), o composto 4 recebeu a classificação 2 o que significa que se trata de um composto altamente tóxico, o composto 9 recebeu classificação 3 sendo considerado tóxico, no entanto o composto 11 recebeu classificação 4 e pode ser considerado pouco tóxico em concordância com os dados obtidos nos testes de citotoxicidade.

Comparando-se o composto 11 com organofosforados já existentes no mercado, este tem a mesma classificação que os organofosforados malathion, fenitrothion, menazon (GAINES, 1969). Com essa classificação o composto tem potencial para ser comercializado, porém ainda são necessários outros testes como de toxicidade crônica, potencial mutagênico e carcinogênico, testes que não foram feitos nesse estudo, pois o objetivo desse estudo foi fazer uma primeira triagem da toxicidade desses compostos.

Analisando os sinais clínicos apresentados pelos camundongos notamos alterações no sistema autônomo e SNC, típicas de intoxicação por organofosforados como fraqueza muscular, perda da coordenação motora e sialorréia (HAYES, 1989).

5.3- RNM da Acetilcolina

Para realização desse estudo foi necessária uma completa interpretação sem ambigüidades do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da ACh. Os resultados foram apresentados na Tabela 4, as atribuições dos sinais dos grupos OCH_2 e CH_2N^+ demonstram que os sinais em 4,58 e 3,76 ppm correspondem aos grupos OCH_2 e CH_2N^+ respectivamente.

Existem três possíveis conformêros para moléculas do tipo $\text{XCH}_2\text{CH}_2\text{Y}$, uma *antiperiplanar* (estrutura I) e duas formas *sinclinal* que são equivalentes (estrutura II e III, figura 7).

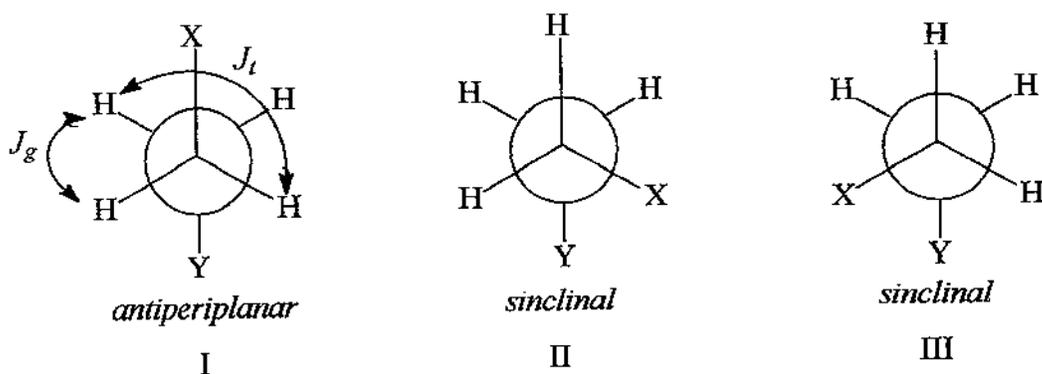


Figura 7- Conformêros estáveis para moléculas do tipo $\text{XCH}_2\text{CH}_2\text{Y}$

Em cada conformêro pelo menos duas constantes de acoplamentos vicinais distintas estão envolvidas; em I há um acoplamento J *antiperiplanar* e um J *sinclinal*. Em II há um acoplamento J *antiperiplanar* e três J *sinclinal*.

A rápida interconversão dos confôrmeros por rotação das ligações C-C restituem cada par geminal de prótons quimicamente equivalentes e o sistema de quatro hidrogênios é descrito como AA'XX' ou AA'BB' dependendo dos deslocamentos químicos entre pares de metileno se são altos ou pequenos. A designação A₂X₂ ou A₂B₂, também são determinadas por este sistema, sendo estritamente reservado a casos raros, os quais ambos os núcleos A são acoplados em igual extensão com os dois núcleos X ou B.

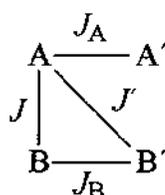
A mesma rotação, entretanto, não leva a uma única média de constante de acoplamento vicinal exceto quando as populações de confôrmeros são iguais, portanto os espectros obtidos são complexos e não podem ser analisados em primeira ordem.

A análise detalhada desses sistemas (POPLE et al.,1959; WILBERG e NIST,1962; EMSLEY,1965) está fora do objetivo desse trabalho , mas certas características são resumidas nesse trabalho.

O sistema AA'BB' (e AA'XX') são simétricos em seus pontos médios, metade é devido a AA' e outra a BB'(XX') e ambos podem ser usados para análise espectral.

Cada metade de um espectro AA'XX' tem um centro de simetria (é centrosimétrico) adicional para o grupo como um todo.

Na maioria dos casos, quatro constantes de acoplamento estão envolvidas, elas podem não ser diretamente derivadas do espectro, mas podem ser calculadas segundo os parâmetros definidos por K, M, N:



$$K = J_A + J_B; L = J - J'$$

$$M = J_A - J_B; N = J + J'$$

Em muitos casos $J_A = J_B$ quando $M = 0$.

O espectro de ACh 60 MHz em D₂O já foi publicado (CULVENOR e HAM, 1966), porém não tem a resolução usada atualmente.

Nesse trabalho, nós apresentamos sinais para ambos os hidrogênios metilênicos no espectro de RMN de ¹H em acetonitrila (figura 5b) e em clorofórmio (figura 5c) em 300MHz, que demonstram sinais com melhor resolução em comparação com espectros obtidos a 60 MHz (figura 5a).

A região dos dois prótons metilênicos pode ser classificada como um sistema AA'XX', porque a diferença entre os deslocamentos químicos ($\delta_A - \delta_X$) é maior que J_{AX} (ABRAHAM et al., 1993). O multiplete no campo menor (figura 5b), devido aos prótons OCH₂, é mais complexo do que o multiplete de NCH₂ porque existe um acoplamento adicional de aproximadamente 2 Hz entre os prótons de OCH₂ e o átomo de nitrogênio positivamente carregado (spin nuclear 1).

O sal de nitrogênio quartenário possui um acoplamento nas três ligações ³J NCCH que é maior (1,5-2Hz) que o acoplamento nas duas ligações ²J NCH (0-0,6Hz) (KAWAZOE et al., 1967).

Os valores de N e L são estimados no multiplete que está no campo alto e redefinido por cálculos de interatividade e programas computacionais como MESTRE-C, versão 3.6.9; <http://www.mestrec.com> (PAN e ROGERS, 1968), sendo N , 9,70 Hz e L , 4,49 Hz; então $2J = 14,19 (N + L)$, assim $J = 7,10$ e $J' = 2,60$ Hz. Estes resultados foram comparados com os valores calculados se os conformeros *antiperiplanar* (estrutura I, figura 7) ou *sinclinal* (estrutura II e III, figura 7) forem favorecidos.

No caso de uma conformação *antiperiplanar* com um acoplamento menor (2,6Hz) pode corresponder a J_g , mas um valor maior (7,0Hz) é anormalmente baixo para J_t devido aos efeitos do substituinte.

Entretanto, para a conformação *sinclinal*, o acoplamento de 2,6Hz é condizente com os valores de J_g , sendo $J = 7,1$ Hz aproximadamente o valor esperado de $\frac{1}{2} (J_t + J_g)$, sendo $(9,7 + 2,6)/2 = 6,2$ Hz.

Esses resultados mostram claramente que o fragmento $OCH_2CH_2N^+$ está num arranjo *sinclinal*, então se for observado que não existem mudanças nos valores das constantes de acoplamento (J_{HH} and J_{NC}) quando se altera o solvente.

De um solvente não-polar para um muito polar, existe a indicação da ausência do efeito do solvente no equilíbrio conformacional da acetilcolina e conseqüentemente também indica uma alta estabilidade do confôrmero *sinclinal*.

Os acoplamentos observados (7,2 e 2,3 Hz em D_2O) estão próximos aos acoplamentos encontrados por Culvenor e Hams (7,0 e 2,5 Hz em D_2O) e com os dados para perclorato de acetilcolina (6,9 e 2,4 Hz em D_2O) (BOVEY, 1972).

Além disso, a conclusão da ocorrência da forma *sinclinal* também está de acordo com um trabalho anterior para ACh em D_2O (SONG et al., 2004) e no estado cristalino (JENSEN, 1982), no qual a estabilidade pode ser atribuída a uma forte interação íon-dipolo entre a alta eletronegatividade de O e a carga positiva do átomo N^+ .

O espectro de acetilcolina merece alguns comentários, o espectro expandido na figura 5b ,em CD_3CN , difere do espectro correspondente em $CDCl_3$ como mostra a figura 5c , que é similar ao espectro simulado (figura 5d) através do programa MESTRE-C .

Além disso são semelhantes os espectros experimentais. Em ambos os solventes, com os espectros simulados para o sinal de $CH_2 N^+$, o sinal experimental para o grupo OCH_2 em solvente não-clorado é mais complexo do que no espectro calculado.

Entre todos os solventes usados nesse trabalho, o espectro em $C_2D_2Cl_4$ é também similar ao espectro em $CDCl_3$, enquanto para os solventes restantes o sinal para o grupo OCH_2 aparece como um multiplete complexo como em CD_3CN .

A comparação do sinal expandido do grupo OCH_2 nos solventes D_2O e $CDCl_3$ é mostrado na figura 6 (a e b , respectivamente), esta é uma clara indicação que o primeiro sinal pode ser incluído no acoplamento $^3J_{NH}$, envolvendo o núcleo de ^{14}N (spin 1), que foram confirmados por irradiação dos hidrogênios de $CH_2 N^+$.

Para eliminar os acoplamentos próton-próton, que tem um triplete no espectro em D₂O (figura 6c) e um singlete para o espectro em CDCl₃ (figura 6d).

Esses resultados sugerem que o tempo de relaxação do ¹⁴N (*T*₁) em solventes não-clorados e solventes clorados devem ser diferentes.

Os tempos de relaxação foram medidos e foi observado que *T*₁ é 45 ms em DMSO-d₆ e em CDCl₃, o valor de *T*₁ é 18ms.

A possível influência do efeito da viscosidade no tempo de relaxação do ¹⁴N nesse caso pode ser excluída pela investigação de dados de viscosidade no estudo dos solventes. Enquanto o acoplamento com o ¹⁴N não é observado em CDCl₃ e C₂D₂Cl₄ (*η* 0,537 e 1,437 mPa s, a 25⁰C, respectivamente), é claramente observado em todos os outros solventes, por exemplo, piridina, acetona, CD₃OD, CD₃CN, DMSO e D₂O (*η* 0,879, 0,306, 0,544, 0,369, 1,987 e 0,890 mPa s, a 25⁰C, respectivamente).

A única possibilidade para explicar as diferenças no espectro RMN de ¹H de ACh é explicada pelo seu comportamento em solução. Para estudarmos essa possibilidade foram feitos experimentos RMN PFG nos solventes D₂O, CD₃OD e CDCl₃.

É esperado que o coeficiente de difusão diminua quando os movimentos moleculares diminuem por agregação molecular ou variação na viscosidade. Também foram escolhidos para esses experimentos o metanol e o clorofórmio devido suas viscosidades serem muito próximas isso reduz os efeitos da viscosidade nos coeficientes de ACh em solução.

Primeiramente foram encontrados os valores dos coeficientes de difusão nas soluções com diferentes concentrações de acetilcolina em D₂O, para determinar se haviam variações devido ao aumento na agregação. Os resultados desses experimentos para ACh em diferentes concentrações em D₂O estão na Tabela 5.

Uma pequena variação é observada para o coeficiente de difusão, dentro da margem de erro experimental, indicando que a ACh apresenta o mesmo comportamento em todas as concentrações estudadas.

Os coeficientes de difusão determinados para acetilcolina em D_2O , CD_3OD e $CDCl_3$ a $25^{\circ}C$ foram mostrados na Tabela 6. Como os solventes CD_3OD e $CDCl_3$ tem viscosidades muito semelhantes e o coeficiente de difusão da ACh em solução de metanol é cerca de duas vezes o valor na solução de clorofórmio, podemos concluir que existe agregação da ACh em clorofórmio, mas não em metanol.

Além disso, se a correção das diferenças na viscosidade é incluída multiplicando o valor de D para a viscosidade, valores do coeficiente de difusão mostram que a agregação da acetilcolina em metanol e em água são muito semelhantes, mas muito diferente para o clorofórmio, o que confirma que o comportamento da acetilcolina em solução é diferente para solventes clorados e não clorados.

6- CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, concluímos que:

Nos testes de citotoxicidade observamos que os organofosforados estudados apresentaram diferentes níveis de toxicidade com valores de IC50 bem distintos comprovando que presença de um substituinte é suficiente para afetar significativamente algumas propriedades físico-químicas e biológicas de compostos anticolinesterásicos.

Os estudos de toxicidade aguda demonstraram que os organofosforados 4 e 9 tem uma toxicidade elevada, porém o organofosforado 11 apresenta uma toxicidade mediana portanto poderia ser utilizado comercialmente.

Foi observado através dos valores das constantes de acoplamento (J_{HH} e J_{NC}) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C que não há efeito do solvente no equilíbrio conformacional da ACh. Os valores das constantes de acoplamento indicam que o sistema $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ está numa conformação *sinclinal*, estando esses resultados de acordo com trabalhos anteriores para ACh em D_2O (SONG et al., 2004) e no estado cristalino (JENSEN, 1982). A preferência pela conformação *sinclinal* pode ser atribuída a uma forte interação íon-dipolo entre os átomos O e N^+ .

Os acoplamentos observados com ^{14}N em solventes não clorados são resultados de longos tempos de relaxação, em relação aos experimentos com solventes clorados, os acoplamentos são observados.

Os valores dos coeficientes de difusão para ACh em diferentes solventes confirmam que o comportamento desse composto depende da natureza do solvente. De fato a ACh demonstra uma grande tendência a agregação molecular em solventes clorados, esta observação pode ser vista nas diferenças no comportamento do ^{14}N em T_1 .

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R.J.; FISHER, J.; LOTUS, P. **Introduction to NMR Spectroscopy**. Chichester: Wiley, 1993.
- AKITT, J. W. **NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy**, 3 ed, London: Chapman & Hall, 1992.
- ANTALEK, B. **Concepts. Magn. Reson.**, 14 (4): 225, 2002.
- BERTHIER, G.; SAVINELLI, R.; PULLMAN, A. **Theor. Chem. Acc.**, 104, 78, 2000.
- BOVEY, F.A. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. New York: Academic Press, 1969.
- BOVEY, F.A. **J. Chem. Soc. Perkin Trans 2**, 1441, 1972.
- BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.O.; BERGER, S. **100 and More Basic NMR Experiments: a Practical Course**. New York, VCH, 1996.
- CASSIDEL, L.; SCIACOVELLI, O. **J. Am. Chem. Soc.** 103, 933, 1981.
- CLARIDGE, T.D.W.; BALDWIN J. E. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Oxford: FRS & R. M. Williams, Pergamon, 1999. v. 19 Tetrahedron Organic Chemistry Series.
- CLOTHIER, B.; JOHNSON, M.K.; REINER, E. Interaction of some trialkyl phosphorothiolates with acetylcholinesterase. Characterization of inhibition, aging and reactivation. **Biochim.Biophys.Acta.** 660:306-16, 1981.
- CULVENOR, C.C.J.; HAM, N. S. **Chem. Commun.** 537, 1966.
- DAMODARAN, T. V.; JONES, K. H.; PATEL, A. G.; ABOU-DONIA, M. B. Sarin (nerve agent GB)-induced differential expression of mRNA coding for the acetylcholinesterase gene in the rat central nervous system. **Biochem Pharmacol.** 65(12): 2041-7. 2003.
- DARVESH S., WALSH R., KUMAR R., CAINES A., ROBERTS S., MAGEE D., ROCKWOOD K., MARTIN E. Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** 17(2):117-26. 2003.

- DAS, K.P.; BARONE, S. Neuronal differentiation in PC 12 cells is inhibited by Chlorpyrifos and its metabolites: Is acetylcholinesterase inhibition the site of action? **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 160:217-230. 1999.
- ELLMAN, G., COURTENY, K. D., ANDRES, V., AND FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7:88-95. 1961.
- EMSLEY, J.W.; FEENEY, J.; SUTCLIFFE, L.H. **High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.** Oxford :Pergamon, 1965. v. 1.
- ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry.** Cleveland: CRC, 123-130.1974.
- FLASKOS J, MCLEAN W.G., HARGREAVES A.J. The toxicity of organophosphate compounds towards cultured PC12 cells. **Toxicol Lett.** 70(1):71-6. 1994
- FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** Inglaterra: Wiley and Sons. 2005.5ed.
- GAINES, T.B. Acute toxicity of pesticides. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 14:515-534.1969
- GEROTHANASSIS, I.P.; KARAYANNIS, T.; SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M.; SAKARELLOS, C.; MARRAUND, M. **J. Magn. Reson.,** 75:513, 1987.
- GILMAN, A.G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman - **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9 ed. 1996. cap. 8, p.118-130.
- GREENE, L.A.; REIN, G. Synthesis, storage and release of acetylcholine by a noradrenergic pheochromocytoma cell line. **Nature .** 268:349-351. 1977.
- GULDEN, M.; SEIBERT, H. In vitro-in vivo extrapolation: estimation of human serum concentrations of chemicals equivalent to cytotoxic concentrations in vitro. **Toxicology.** 189(3):211-22, 2003.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

HAYES, A.W. **Principles and methods of toxicology**. 2 ed. USA: Raven Press. 1989. p141-220.

HÖEHR, N. F. Propriedades Físico-Químicas de Novos Carbamatos com Potencial Atividade Anticolinesterásica. Campinas, 1993. (Dissertação - Doutorado- Universidade Estadual de Campinas)

HOLMSTEDT, B.; In: Koelle, G.B. Structure-activity relationships of the organophosphorus anticholinesterase agents. Cholinesterases and Anticholinesterase Agents. **Handbuch der Experimentellen Pharmakologie**, 15: 428-485. 1963.

JAMES, I.F.; WOOD, J.N. In: Wood, J.N. **A catalogue of neuronal properties expressed by cell lines. Neuronal Cell Lines: A Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p.249-259.

JENSEN, B.J. The structures of acetylcholine hydrogen tartrates. **Acta Crystallogr. Sect. B**, 38:1185-1192, 1982.

KHAN, W. A.; DECHKOVSKAIA, A. M.; HERRICK, E. A.; JONES, K. H.; ABOU-DONIA M. B. Acute sarin exposure causes differential regulation of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and acetylcholine receptors in the central nervous system of the rat. **Toxicol Sci**. 57(1):112-20. 2000.

KIM, Y.J.; KIM, S.C.; KANG, Y.K. Conformation and hydration of acetylcholine. **J. Molec. Struct**, 269:231-241, 1992.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994.

KAWAZOE, Y.; TSUDA, M. OHNISHI, M. **Chem. Pharm. Bull**, 214, 1967.

LI, W.; CASIDA, J.E. Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block outgrowth of neurite-like and cell processes in cultured cells. **Toxicol. Lett**. 98:139-146. 1998.

- LICHTENBERG, D.; KROON, P.A.; CHAN S.I.; **J. Am. Chem. Soc.** 96:5934, 1974.
- MARINO, T.; RUSSO, N.; TOCCI, E.; TOSCANO, M. **Theor. Chem. Acc.**, 107:8, 2001.
- MESTRE-C, versão 3.6.9; <http://www.mestrec.com>.
- MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**.140-141:21-30, 2003.
- MÍDIO, A.F., SILVA, E.S. **Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos**. São Paulo: Roca .1995. p 84
- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu,1996.p.61-64.
- PAN, Y.K.; ROGERS, M. T. **Rev. Pure Appl. Chem.**, 18:17, 1968.
- POPLE, J.A.; SCHNEIDER, W.G.; BERNSTEIN, H.J. **High Resolution Nuclear Magnetic Resonance**. New York : McGraw Hill, 1959.
- REIS A.K., OLIVATO P.R., RITTNER R. Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of some 4'-substituted diethyl 1-methylthio-and diethyl 1-methylsulfonyl -2-oxo-2-phenylethylphosphonates. **Magn. Reson. Chem.** 43(1):85-8, 2005.
- RICHARDS, R.E.; THOMAS, N. A. **J. Chem. Soc. Perkin 2**, 368, 1974.
- ROGUET, R; COTOVIO, J.; GAETANI, Q.; DOSSOU, K.G.; ROUGIER, A. Cytotoxicity of 28 MEIC chemicals to rat hepatocytes using two viability endpoints: correlation with toxicity data in rat and man. **ATLA**, 21(2):216-224, 1993.
- SCHRADER, G. Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage von Organischen Fluor- und Phosphorverbindungen. Monographie n° 62, Verlag Chemie, Weinheim. 1952.
- SEIBERT, H. (coord) **ATLA**, 24, 499.1996.
- SILVA, E.S.. Determinação da atividade de colinesterases sanguíneas por três métodos. São Paulo.1996. (Dissertação - Mestrado. Universidade de São Paulo).

SKRINJARIC-SPOLJAR, M.; SIMEON, V.; REINER, E., KRAUTHECKER, B. Bispyridium compounds: inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase and protection of the enzyme against phosphorylation. **Acta Pharm.Iugosl.**, Zagreb, 38:101-9, 1998.

SMITH, R.L. The estimation of serum cholinesterase in the presence of anti-cholinesterase insecticides. **Clin. Chim.Acta**, Amsterdam, 52:315-9, 1974.

SONG, J.; GORDON, M.S.; DEAKYNE, C.A.; ZHENG, W. **J. Phys. Chem. A**, 108: 11419, 2004.

SONG, X.; VIOLIN, J.D.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro: Macromolecular synthesis in PC12 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 145:158-174. 1998.

STARK, D.M.; SHOPSIS C.; BORENFREUND E.; BABIBICH H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. **Food Chem Toxicol**, 24 (6-7): 449-55, 1986.

TRIGLIA, D.; BRAA, S.S.; YONAN, C.; NAUGHTON, G.K. In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. **In Vitro Cell Dev Biol.** 27 A, 239-44.1991.

TARIOT P.N., FEDEROFF H. J. Current treatment for Alzheimer disease and future prospects. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** 17(3): S105-13. 2003.

VAN SITTERT, N.J. Manual Spectrophotometric Method for the Measurement of Erythrocyte and Plasma Cholinesterase (Modified Ellman Method). Shell Internationale Petroleum. 56-61. 1987.

VERONESI, B.; EHRICH, M. Differential Cytotoxic Sensitivity in Mouse and Human Cell Lines Exposed to Organophosphate Insecticides. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 120:240-246. 1993.

WARREN, S.; CHUTE, R.N. Pheochromocytoma. **Cancer.** 29:327-331. 1972

WIDER, G.; DÖTSCH, V.; WÜTHRICH, K. **J. Magn. Reson. Ser. A.**108:255, 1994.

WILBERG, K.B.; NIST, B.J. **The Interpretation of NMR Spectra.** New York: Benjamin, 1962.

8- ANEXOS



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.htm

📧 cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/11/03.

(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 441/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDOS DE TOXICIDADE "IN VITRO" E "IN VIVO" DE NOVOS ORGANOFOSFORADOS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Estela Munhoz Segal

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas da UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 26/09/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/11/04

II - OBJETIVOS

Determinar a toxicidade "*in vitro*" e "*in vivo*" de novos organofosforados, investigar sua atividade anticolinesterásica. Comparar a toxicidade desses quatro novos compostos com os organofosforados já existentes no mercado.

III - SUMÁRIO

Trata-se de pesquisa experimental em que serão utilizados: uma cultura de células de ratos cedida pelo professor Roger Castilho, células compradas de um repositório dos Estados Unidos; camundongos swiss; amostras de sangue humano total estocado provenientes do Centro de Controle de Intoxicações. As amostras de sangue humano serão coletadas de 20 pacientes do ambulatório de Toxicologia e Medicina do Trabalho do Hospital das Clínicas. Para esses seres humanos, não há riscos com a participação no estudo. Os experimentos avaliarão a atividade anticolinesterásica dos organofosforados, "*in vitro*", no sangue humano total, pelo método Ellman modificado. Para se determinar a neurotoxicidade dos organofosforados, serão utilizadas células de feocromocitoma de ratos (PC12), obtidas no laboratório do Prof. Dr. Roger Castilho, do IQ-USP. Estudos de toxicidade aguda e de atividade anticolinesterásica, "*in vivo*", serão realizados em camundongos de acordo com método recomendado pela OECD.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, informando os riscos benefícios para o sujeito da pesquisa. Os risco a que ele estará sujeito será o aparecimento de um hematoma (mancha roxa) e/ou uma dor no local da punção venosa, não oferecendo outros riscos importantes. Os benefícios esperados serão a contribuição na determinação da atividade anticolinesterásica destes novos pesticidas com menor toxicidade ao homem. Há um orçamento de projeto de pesquisa com fundos da FAEP no total de R\$ 4.000,00 para material de consumo.

Uma vez que foram atendidas, de forma satisfatória, as pendências apresentadas pelos relatores, encaminhamos recomendando a aprovação.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

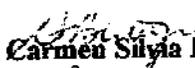
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de novembro de 2003.


Prof. Dra. **Carmen Sylvia Bertuzzo**
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

A2.17 Acute toxicity (See Chapter 3.1 for details)

Hazard category	Criteria	Hazard communication elements	
1	$LD_{50} \leq 5$ mg/kg bodyweight (oral) $LD_{50} \leq 50$ mg/kg bodyweight (skin/dermal) $LC_{50} \leq 100$ ppm (gas) $LC_{50} \leq 0.5$ (mg/l) (vapour) $LC_{50} \leq 0.05$ (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard statement	Fatal if swallowed. (oral) Fatal in contact with skin (dermal) Fatal if inhaled (gas, vapour, dust, mist)
2	LD_{50} between 5 and less than 50 mg/kg bodyweight (oral) LD_{50} between 50 and less than 200 mg/kg bodyweight (skin/dermal) LC_{50} between 100 and less than 500 ppm (gas) LC_{50} between 0.5 and less than 2.0 (mg/l) (vapour) LC_{50} between 0.05 and less than 0.5 (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard Statement	Fatal if swallowed. (oral) Fatal in contact with skin (dermal) Fatal if inhaled (gas, vapour, dust, mist)
3	LD_{50} between 50 and less than 300 mg/kg bodyweight (oral) LD_{50} between 200 and less than 1000 mg/kg bodyweight (skin/dermal) LC_{50} between 500 and less than 2500 ppm (gas) LC_{50} between 2.0 and less than 10.0 (mg/l) (vapour) LC_{50} between 0.5 and less than 1.0 (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard statement	Toxic if swallowed. (oral) Toxic in contact with skin (dermal) Toxic if inhaled (gas, vapour, dust, mist)

Continued on next page

Hazard category (cont'd)	Criteria	Hazard communication elements	
4	<p>LD₅₀ between 300 and less than 2000 mg/kg bodyweight (oral)</p> <p>LD₅₀ between 1000 and less than 2000 mg/kg bodyweight (skin/dermal)</p> <p>LC₅₀ between 2500 and less than 5000 ppm (gas)</p> <p>LC₅₀ between 10.0 and less than 20.0 (mg/l) (vapour)</p> <p>LC₅₀ between 1.0 and less than 5.0 (mg/l) (dust, mist)</p>	Symbol	
		Signal word	Warning
		Hazard statement	<p>Harmful if swallowed. (oral)</p> <p>Harmful in contact with skin (dermal)</p> <p>Harmful if inhaled (gas, vapour, dust, mist)</p>
5	<p>LD₅₀ between 2000 and 5000 (oral or skin/dermal)</p> <p>For gases, vapours, dusts, mists, LC₅₀ in the equivalent range of the oral and dermal LD₅₀ (i.e., between 2000 and 5000 mg/kg bodyweight).</p> <p>See also the additional criteria</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indication of significant effect in humans • Any mortality at Category 4 • Significant clinical signs at Category 4 • Indication from other studies. 	Symbol	No symbol
		Signal word	Warning
		Hazard statement	<p>May be harmful if swallowed (oral)</p> <p>May be harmful in contact with skin (dermal)</p> <p>May be harmful if inhaled (gas, vapour, dust, mist)</p>

