

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE DE FORMAS
ENANTIOMÉRICAS DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS:
ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E DE NEUROPROTEÇÃO**

GUILHERME LUZ EMERICK

Orientador: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Araraquara-SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE DE FORMAS
ENANTIOMÉRICAS DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS:
ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E DE NEUROPROTEÇÃO

GUILHERME LUZ EMERICK

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Araraquara-SP
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

E53a Emerick, Guilherme Luz
Avaliação de neurotoxicidade de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: estudos *in vitro*, *in vivo* e de neuroproteção / Guilherme Luz Emerick. – Araraquara, 2012
174 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Georgino Honorato de Oliveira

Coorientadora: Regina Vincenzi Oliveira

1. Avaliação de neurotoxicidade. 2. Organofosforados. 3. Metamidofós. 4. Quiralidade. 5. Esterase susceptível à neuropatia (ESNp). 6. Acetilcolinesterase (AChE). 7. Tratamento de intoxicação. I. Oliveira, Georgino Honorato de, orient. II. Oliveira, Regina Vincenzi, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, paz, saúde e por estar sempre iluminando os difíceis caminhos de nossas vidas.

Aos meus pais, Heloisa e Tovar, pelo amor e apoio que foram imprescindíveis no cumprimento de todas as etapas de minha vida.

À minha amada esposa, Ludmila, grande companheira que sofreu bastante com minha ausência, mas esteve sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis desta conquista. Jamais esquecerei tantos sacrifícios.

À minha família, em especial minha avó Almerinda e minha irmã Caroline pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus orientadores, professor Georgino, professora Regina e professora Marion pela paciência e disposição em transmitir todo seu conhecimento a este humilde aprendiz.

Aos meus amigos de República e companheiros de Laboratório, em especial Antônio Netto Júnior pela presença, erudição, suporte técnico, cachaçadas e pelos preciosos conselhos em todas as etapas deste trabalho.

Aos voluntários que doaram sangue para a realização desta pesquisa. Este sangue doado pode salvar vidas.

Às galinhas, que foram tratadas com muito respeito e que deram suas vidas para a realização deste trabalho.

Aos professores que participaram das bancas de qualificação e defesa, pelas valiosas contribuições que deram para melhoria deste trabalho.

A todos os funcionários da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial à Maria Aparecida, Elisabete Zocal, Luiz Potenza e funcionário do biotério, por todo suporte técnico prestado nestes anos.

À UNESP, UFSCAr e Virginia Tech que nos deu professores, estrutura física e suporte sem os quais seria impossível executar este trabalho.

À FAPESP (processo 2009/51048-8) que nos consedeu uma bolsa e apoio financeiro no valor total de R\$ 112.584,03 e graças a este apoio foi possível realizar pesquisa de elevada qualidade.

À sociedade brasileira, que pagando seus impostos possibilita a execução de trabalhos científicos de qualidade em universidades públicas.

Enfim, a todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram direta ou indiretamente na produção deste trabalho. Muito Obrigado!!!

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE GUILHERME LUZ EMERICK, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 02 dias do mês de março do ano de 2012, às 14:00 horas, no(a) Sala 116 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. GEORGINO HONORATO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIAO do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. ANTONIO CARDOZO DOS SANTOS do(a) Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Ribeirão Preto da USP, Profa. Dra. ROSÂNGELA GONCALVES PECCININI do(a) Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Profa. Dra. SILVANA APARECIDA CALAFATTI do(a) Universidade São Francisco - UNIFAG, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder à arguição pública da TESE DE DOUTORADO de GUILHERME LUZ EMERICK, intitulado "AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE DE FORMAS ENANTIOMÉRICAS DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS: ESTUDO COMPARATIVO EM CÉLULAS HUMANAS E DE GALINHAS". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. GEORGINO HONORATO DE OLIVEIRA

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIAO

Prof. Dr. ANTONIO CARDOZO DOS SANTOS

Profa. Dra. ROSÂNGELA GONCALVES PECCININI

Profa. Dra. SILVANA APARECIDA CALAFATTI

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	08
Lista de tabelas.....	10
Lista de figuras.....	12
 1. Resumo.....	 19
 2. Abstract.....	 21
 3. Introdução.....	 23
3.1 Os praguicidas no contexto econômico e de saúde pública.....	23
3.2 A intoxicação por praguicidas organofosforados.....	26
3.3 As colinesterases e a ESNp como alvo dos organofosforados.....	31
3.4 A Degeneração do tipo Walleriana.....	36
3.5 A enantiosseletividade e a separação cromatográfica.....	42
 4. Justificativa.....	 47
 5. Objetivo.....	 48
 6. Materiais e métodos.....	 49
6.1 Equipamentos.....	49
6.2 Reagentes.....	50
6.3 Separação cromatográfica.....	50
6.4 Animais.....	53
6.5 Voluntários humanos.....	54
6.6 Cultura de células.....	55
6.7 Preparo de soluções.....	56
6.8 Coleta e preparo de amostras biológicas.....	62
6.9 Experimentos.....	62
6.9.1 Experimentos <i>in vitro</i>	62
6.9.2 Experimentos <i>in vivo</i>	63
6.9.2.1 Delineamento experimental.....	63
6.9.3 Escala de neurotoxicidade.....	65
6.9.4 Estudos histopatológicos.....	65
6.10 Dosagem de proteínas.....	64
6.11 Procedimento para determinação da atividade da BChE e da AChE.....	68
6.12 Cálculo da atividade das colinesterases.....	69
6.13 Separação dos linfócitos.....	70
6.13.1 Sangue de galinhas.....	70
6.13.2 Sangue humano.....	71
6.14 Dosagem da atividade da ESNp.....	72
6.15 Cálculo da atividade da ESNp.....	73
6.15.1 Exemplo de cálculo da atividade da ESNp.....	73
6.16 Citometria de fluxo.....	74
6.17 Dosagem da atividade da PCD.....	75
6.18 Análise estatística dos resultados.....	76

7. Resultados.....	77
7.1 Desenvolvimento do método de separação cromatográfica.....	77
7.2 Proteínas e valores gerais.....	93
7.3 IC ₅₀ da BChE e da AChE em galinhas.....	95
7.4 IC ₅₀ da ESNp em galinhas.....	103
7.4.1 ESNp linfocitária.....	103
7.4.2 ESNp em cérebro.....	106
7.5 IC ₅₀ em material humano.....	108
7.5.1 ESNp em células SH-SY5Y.....	108
7.5.2 AChE eritrocitária.....	110
7.5.3 ESNp linfocitária.....	113
7.5.4 AChE em células SH-SY5Y.....	116
7.6 IC ₅₀ do mipafox.....	118
7.7 Resumo das curvas de inibição.....	121
7.8 Apoptose e ativação da calpaína <i>in vitro</i>	124
7.9 Experimentos <i>in vivo</i>	126
7.9.1 Parâmetros bioquímicos.....	126
7.9.2 Achados histopatológicos.....	132
7.9.3 Sinais clínicos.....	137
8. Discussão.....	139
9. Conclusões.....	156
10. Referências Bibliográficas.....	158
11. APÊNDICE.....	166
12. ANEXO.....	170

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AAP – 4-aminoantipirina

AChE – acetilcolinesterase

α - fator de separação

ANOVA – análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCh - acetiltiocolina

BChE - butirilcolinesterase

BSA – soro albumina bovina

CG – cromatografia gasosa

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CL₅₀ - concentração letal de metade dos organismos testados

d – densidade

Dp – desvio padrão

DL₅₀ - dose letal capaz de matar 50% da população exposta

DTNB - ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

DTT - ditioneitol

DMSO - dimetilsulfóxido

EC – eletroforese capilar

EDTA – etileno diamino tetra acetato de sódio

ESNp – esterase susceptível à neuropatia

FAO - Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas

FEQ – fase estacionária quiral

HPLC – high performance liquid chromatography

IPCS-WHO - International Programme on Chemical Safety – World Health Organization

IP - iodeto de propídio

$K_3Fe(CN)_6$ – ferricianeto de potássio

k - fator de retenção

kDa - quilodaltons

NRIOP – neuropatia retardada induzida por organofosforados

NTE – neuropathy target esterase

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP - organofosforado

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde

PCD – protease cálcio-dependente

pH – potencial hidrogeniônico

PIB – produto interno bruto

PM – peso molecular

PSP - saligenin fenil fosfato

Rs - resolução

SDS – dodecil sulfato de sódio

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

T_0 - tempo de eluição de um soluto não retido

TOCP – tri-*orto*-cresil fosfato

TRIS – tris hidróxido amino metano

UI – unidades internacionais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína.	67
Tabela 2. Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína.	67
Tabela 3. Esquema para doseamento da atividade das ChE.	68
Tabela 4. Parâmetros cromatográficos avaliados na separação quiral analítica do metamidofós.	79
Tabela 5. Características das frações coletadas no sistema preparativo.	91
Tabela 6. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com o tampão fosfato.	93
Tabela 7. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com tampão tris-EDTA.	94
Tabela 8. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com tampão PCD.	94
Tabela 9. Valores gerais encontrados para as esterases em amostras de humanos e de galinhas.	95
Tabela 10. Valores de inibição da atividade da BChE para (+/-)-metamidofós.	96
Tabela 11. Valores de inibição da atividade da BChE para (+)-metamidofós.	97
Tabela 12. Valores de inibição da atividade da BChE para (-)-metamidofós.	99
Tabela 13. Valores de inibição da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.	100
Tabela 14. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.	101
Tabela 15. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.	102
Tabela 16. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.	103
Tabela 17. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	104
Tabela 18. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	105
Tabela 19. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	106
Tabela 20. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	107
Tabela 21. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	108
Tabela 22. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	109
Tabela 23. Valores de inibição da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.	110
Tabela 24. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.	111
Tabela 25. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.	112
Tabela 26. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.	113
Tabela 27. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	114
Tabela 28. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	115

Tabela 29. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.	116
Tabela 30. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.	117
Tabela 31. Valores de inibição da atividade da AChE em cérebro de galinhas para mipafox.	118
Tabela 32. Valores de inibição da atividade da AChE nas células SH-SY5Y para mipafox.	119
Tabela 33. Valores de inibição da atividade da ESNp em cérebro de galinhas para mipafox.	120
Tabela 34. Valores de inibição da atividade da ESNp nas células SH-SY5Y para mipafox.	121
Tabela 35. Resumo das IC ₅₀ dos enantiômeros do metamidofós e do mipafox em relação às enzimas AChE e ESNp.	123
Tabela 36. Valores de % de atividade da ESNp em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.	126
Tabela 37. Valores de % de atividade da AChE em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.	128
Tabela 38. Valores de % de atividade da calpaína em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.	130
Tabela 39. Escores de neurotoxicidade 21 dias após as aves receberem doses dos diferentes OPs avaliados neste trabalho.	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química geral dos organofosforados.	28
Figura 2: Reações dos organofosforados com a AChE e a ESNp.	35
Figura 3: Componentes principais do sistema nervoso periférico.	39
Figura 4: Locais de expressão de lesões no sistema nervoso periférico.	40
Figura 5: As fotografias mostradas são do nervo tibial localizado no músculo gastrocnêmio de galinhas que receberam uma dose de saligenin fenil fosfato (A, B e C) ou do nervo metatarsal dorsal de galinhas que receberam diisopropil fosfofluoridrato (D).	41
Figura 6: Estrutura química do metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotioato).	44
Figura 7: Gaiolas do Biotério do Laboratório de Toxicologia.	54
Figura 8: Cortes de tecidos de aves dissecados para avaliação de lesões histopatológicas causadas por OP neuropáticos.	66
Figura 9: Peças dissecadas colocadas em cassetes individuais.	66
Figura 10: Cromatograma da análise do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna quiral Chiralcel OD [®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm, fase móvel: hexano/isopropanol (90/10, v/v), vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL.	78
Figura 11: Cromatograma da análise do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna quiral Chiralcel OD [®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL. Fases móveis: hexano/isopropanol (90/10) em preto e hexano/isopropanol (92/08) em cinza.	80
Figura 12: Efeito da proporção de isopropanol na resolução dos enantiômeros do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas:	81

coluna (15 x 0,46 cm) de tris(3,5-dimetilfenil carbamato de celulose) revestidas de sílica (APS)-Hypersil (120 Å, 5 µm, 15%, p/p) para A, C e D e coluna Chiralcel OD[®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4) para B, UV 230 nm, , vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL.

Figura 13: Efeito da proporção de etanol na resolução dos enantiômeros do 82
metamidofós (6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm. Fases móveis: hexano:etanol (90:10) em cinza e hexano:etanol (95:05) em preto, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL

Figura 14: Efeito da substituição do hexano pelo heptano na separação do 83
metamidofós. Condições cromatográficas: Coluna tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose em sílica APS-Nucleosil (15 x 0,46 cm, 20 µm) (FEQ 2), UV 230 nm, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL, metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol.

Figura 15: Cromatograma da separação do metamidofós (25 mg/mL em etanol). 85
Condições cromatográficas: Coluna (FEQ 5) Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (20 µm), UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (92:08 v/v), vazão = 3 mL/min, volume de injeção de 50 µL.

Figura 16: Cromatogramas do metamidofós (metamidofós = 25 mg/mL em etanol). 86
Condições cromatográficas: Coluna (FEQ 5) Chiralcel OD (20 x 0,7 cm) (20 µm), UV 230 nm, vazão = 3 mL/min. Fases móveis: hexano:isopropanol (90:10) em preto e hexano:isopropanol (92:08) em cinza. Volume de injeção = 50 µL

Figura 17: Cromatograma ilustrando o efeito da concentração de metamidofós na 87
enantiosseparação obtida. Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (20 µm), UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.

- Figura 18:** Efeito do volume de injeção na separação do metamidofós (75 mg/mL em 88
etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm), 20 µm,
detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min,
volume de injeção de A = 200 µL e de B = 100 µL.
- Figura 19:** Cromatograma da separação enantiomérica do metamidofós (75 mg/mL 90
em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm), 20 µm,
detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min,
volume de injeção = 50 µL.
- Figura 20:** Cromatograma da primeira fração coletada da separação enantiomérica 91
do metamidofós (10 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel
OD[®] (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 µm, detector UV 230 nm, fase móvel:
hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.
- Figura 21:** Cromatograma da segunda fração coletada da separação enantiomérica 92
do metamidofós (10 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel
OD (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 µm, detector UV 230 nm, fase móvel:
hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.
- Figura 22:** Cromatograma das frações coletadas dos enantiômeros do metamidofós 92
(10 mg/mL em etanol). B = (+)-metamidofós (1^a fração). A = (-)-metamidofós (2^a
fração). C = (+/-)-metamidofós (mistura da 1^a e 2^a frações 1:1 v/v). Condições
cromatográficas: coluna Chiralcel OD (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 µm, detector UV 230
nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10 v/v), vazão = 3 mL/min, volume de
injeção = 50 µL.
- Figura 23:** Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0. 93
- Figura 24:** Curva analítica de proteína feita com tampão tris-EDTA pH 8,0. 94
- Figura 25:** Curva analítica de proteína feita com tampão para a PCD. 95

Figura 26: Curva de inibição da BChE para (+/-)-metamidofós. N=3, valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão.	96
Figura 27: Log da % da atividade da BChE em função da concentração de (+/-)-metamidofós.	97
Figura 28: Curva de inibição da BChE para (+)-metamidofós. N=3, valores estão como representados média $\pm$ desvio padrão.	98
Figura 29: Log da % da atividade da BChE para (+)-metamidofós.	98
Figura 30: Curva de inibição da BChE para (-)-metamidofós. N=3, valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão.	99
Figura 31: Log da % da atividade da BChE para (-)-metamidofós.	99
Figura 32: Log da % da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.	100
Figura 33: Log da % da atividade da AChE para (-)-metamidofós.	101
Figura 34: Log da % da atividade da AChE para (+)-metamidofós.	102
Figura 35: Log da % da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.	103
Figura 36: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	104
Figura 37: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	105
Figura 38: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	106
Figura 39: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	107
Figura 40: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	108
Figura 41: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	109
Figura 42: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (+/-)-metamidofós.	110
Figura 43: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (-)-metamidofós.	111
Figura 44: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (+)-metamidofós.	112
Figura 45: Log da % da atividade da ESNP linfocitária para (+/-)-metamidofós.	113
Figura 46: Log da % da atividade da ESNP linfocitária para (+)-metamidofós.	114

Figura 47: Log da % da atividade da ESNP linfocitária para (-)-metamidofós.	115
Figura 48: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.	116
Figura 49: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.	117
Figura 50: Log da % da atividade da AChE para mipafox.	118
Figura 51: Log da % da atividade da AChE para mipafox.	119
Figura 52: Log da % da atividade da ESNp para mipafox.	120
Figura 53: Log da % da atividade da ESNp para mipafox.	121
Figura 54: Comparação das curvas de % da atividade versus concentração de (+)-metamidofós, (-)-metamidofós e mipafox para as enzimas ESNp e AChE de galinhas e de humanos Os resultados para os enantiômeros do metamidofós estão de A-G e para o mipafox estão em H. Cada ponto foi obtido pela média de três amostras analisadas em triplicata. Os valores de IC50 com os respectivos desvios padrão são mostrados na Tabela 35.	122
Figura 55: Apoptose nas células humanas SH-SY5Y do grupo controle (A), mipafox (B), (+)-metamidofós (C) e (-)-metamidofós (D) depois de 1 hora de incubação à 37°C.	124
Figura 56: Ativação da calpaína causada pelo mipafox (0,01 mM), (+)-metamidofós (10 mM) e (-)-metamidofós (100 mM) em cérebro de galinhas e em cultura celular depois de 1 hora de incubação à 37°C.	125
Figura 57: % da atividade da ESNp em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos.	127
Figura 58: % da atividade da AChE em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos.	129
Figura 59: % da atividade da calpaína em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos.	131

Figura 60: Corte histológico transversal (72x) de porções da medula espinhal de aves normais na porção da amígdala caudal (A) e lombar (B). Os espaços delineados mostram os tratos mais afetados em degenerações axonais. EC = trato espino-cerebelar. FG = fascículo grácil. PEM = trato pontino-espinhal medial. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). 132

Figura 61: Corte histológico transversal (A e C) e longitudinal (B e D) do nervo ciático de galinhas normais (A e B) e 21 dias depois de receberem 500 mg/kg de TOCP (C e D). A e B mostram fibras íntegras com proporção correta de bainha de mielina em relação ao tamanho do axônio. C e D mostram fibras em colapso com reduzida proporção de bainha de mielina em relação ao tamanho do axônio (setas). Nota-se também inchaço dos axônios (setas). Cortes corados com H&E. 133

Figura 62: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 500 mg/kg de TOCP via oral. De A a D porção cervical e E e D porção lombar. A e C mostram amplas lesões do trato espino-cerebelar com colapso e inchaço anormal dos axônios (axoplasma corado em cinza) e redução da bainha de mielina (setas). B e D mostram o fascículo grácil com os mesmos tipos de lesões. Em E e D é possível visualizar o trato pontino-espinhal medial também com amplas lesões (setas). Cortes corados com H&E. 134

Figura 63: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 50 mg/kg de (+)-metamidofós via oral. (A) e (B) mostram fibras normais do trato pontino-espinhal medial. (C) e (D) mostram fibras normais do trato espino-cerebelar e fascículo grácil. (E) mostra apenas uma fibra do trato pontino-espinhal medial em colapso e desmielinização (seta). Cortes corados com H&E. 135

Figura 64: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 500 mg/kg de TOCP via oral mais o tratamento (18 horas após o TOCP, 136

as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira). (A) e (B) mostram fibras normais dos tratos fascículo grácil e espino-cerebelar, respectivamente. (C) e (D) mostram fibras normais do trato pontino-espinhal medial.

Figura 65: Fotos de galinhas nos diversos escores de neurotoxicidade. 138

Figura 66: Capacidade de um OP induzir a NRIOP baseando-se em testes *in vitro* em células nervosas humanas 147

1. RESUMO

Clinicamente, os sintomas da intoxicação por organofosforados (OPs) são divididos em quatro categorias: síndrome colinérgica, síndrome intermediária, transtornos neuropsiquiátricos crônicos induzidos por OPs e neuropatia retardada induzida por OPs (NRIOP). Há estudos que comprovam a ocorrência de casos de NRIOP em seres humanos após intoxicação por metamidofós, porém existe grande dificuldade de estudar esta neuropatia no modelo experimental (galinha), devido à forte crise colinérgica que ocorre após a inibição da acetilcolinesterase (AChE). Uma possível explicação para tal diferença de efeito entre a espécie humana e a galinha é o fato de que os OPs possuem centros assimétricos e, assim sendo, se apresentam sob formas enantioméricas que podem apresentar diferenças de inibição da AChE e da esterase susceptível à neuropatia (ESNp). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em sangue de galinhas e de seres humanos, em cérebro de galinhas (*in vitro* e *in vivo*) e em células da linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano, a neurotoxicidade de formas enantioméricas de compostos organofosforados utilizados como praguicidas, tendo o metamidofós como protótipo e utilizando a AChE, butirilcolinesterase (BChE), ESNp e a calpaína como biomarcadores. Inicialmente, foi feita a separação dos enantiômeros do metamidofós utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com emprego de fases estacionárias quirais de polissacarídeos, onde se obteve resolução de até 1,56 para os enantiômeros avaliados. A forma (+)-metamidofós apresentou maior toxicidade *in vitro* para a BChE em galinhas e para ESNp em humanos e em galinhas. Por outro lado, a forma (-)-metamidofós apresentou maior toxicidade para a AChE em humanos e em galinhas. Levando-se em conta somente os resultados *in vitro*, pode-se dizer que a forma (+)-metamidofós apresentou maior possibilidade de

induzir a NRIOP tanto no homem quanto na galinha. Os resultados *in vitro* foram corroborados pelos resultados *in vivo* da inibição da AChE e da ESNp, da ativação da calpaína, histopatológicos e clínicos em galinhas, uma vez que mesmo em dose baixa o (+)-metamidofós apresentou um certo potencial de indução da NRIOP comprovado pela ativação da calpaína 21 dias após a dose. Também foi verificado que o tratamento com nimodipino e gliconato de cálcio evitou os efeitos neuropáticos de um conhecido indutor da NRIOP (tri-*orto*-cresil fosfato) utilizado como controle positivo neste trabalho.

Palavras-chave: Avaliação de neurotoxicidade, Organofosforados, Metamidofós, Quiralidade, Esterase susceptível à neuropatia (ESNp), Acetilcolinesterase (AChE), Tratamento de intoxicação.

2. ABSTRACT

Clinically, the symptoms of organophosphorus (OP) poisoning are divided into four categories: acute cholinergic syndrome, intermediate syndrome, chronic organophosphorus-induced neuropsychiatric disorders (COPIND) and organophosphorus-induced delayed neuropathy (OPIDN). There are studies that prove the occurrence of OPIDN in humans after methamidophos poisoning, but there is great difficulty in studying this neuropathy in the experimental model (hen), due to strong cholinergic crisis that occurs after inhibition of acetylcholinesterase (AChE). One possible explanation for this difference in effect between humans and hens is the fact that the OPs have asymmetric centers and therefore, are presented as enantiomeric forms that may exhibit differences in inhibition of AChE and neuropathy target esterase (NTE). Thus, the objective of this study was to evaluate, in the blood of hens and humans, in the brains of chickens (*in vitro* and *in vivo*) and in the SH-SY5Y human neuroblastoma cells, the neurotoxicity of enantiomeric forms of OPs used as pesticides, having methamidophos as the prototype and using AChE, butyrylcholinesterase (BChE), NTE and calpain as biomarkers. Initially, the complete separation of the methamidophos enantiomers was obtained applying the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) and using polysaccharide chiral stationary phases. A maximum resolution of 1.56 was gotten for the enantiomers evaluated. The form (+)-methamidophos presented higher *in vitro* toxicity than that of the (-)-methamidophos for BChE of hens and NTE of hens and humans. On the other hand, the form (-)-methamidophos presented higher toxicity than of the (+)-methamidophos for AChE of humans and hens. Considering only the *in vitro* results, it is possible to say that the form (+)-methamidophos showed greater ability to induce OPIDN than the (-)-methamidophos in humans and in hens. The *in vitro* results were

corroborated by *in vivo* results of the inhibition of AChE and NTE, activation of calpain, histopathological and clinical data from hens, because still in low dose the (+)-methamidophos showed some potential for induction of OPIDN evidenced by the activation of calpain 21 days after dosing. It was also found that the treatment with nimodipine and calcium gluconate prevented the neuropathic effects of a known inducer of OPIDN (tri-*ortho*-cresyl phosphate) used as positive control in this work.

Keywords: Neurotoxicity evaluation, Organophosphorus, Methamidophos, Chirality, Neuropathy target esterase (NTE), acetylcholinesterase, Treatment of intoxication.

3. INTRODUÇÃO

3.1 Os praguicidas no contexto econômico e de saúde pública

O agronegócio brasileiro vem, nos últimos anos, consolidando sua expressiva participação no Produto Interno Bruto (PIB), se tornando assim a principal locomotiva da economia nacional. Este setor é responsável por 33% do PIB, 42% das exportações totais e 37% dos empregos do país. O PIB do setor chegou a US\$ 180,2 bilhões em 2004. O Brasil conta com 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade. As exportações de produtos agrícolas do país passaram de US\$ 12.761 milhões em 2000 para US\$ 27.215 milhões em 2004, o que fez com que o Brasil se tornasse o quinto maior exportador de produtos agrícolas do mundo (BRASIL, 2009). Contudo, dada a ampla biodiversidade de um país tropical como o Brasil, principalmente com relação ao aparecimento de muitas espécies de insetos, para que o setor agroindustrial brasileiro continue em crescente produtividade, o uso de praguicidas tem aumentado na mesma proporção.

Seguindo esta tendência o mercado nacional de praguicidas teve que se manter em crescente de produtividade. O faturamento líquido das indústrias químicas que produzem os praguicidas passou de 1,1 bilhões de dólares em 1990 para cerca de 4,0 bilhões de dólares em 2005 (SILVA et al., 2006). Assim, o elevado consumo de praguicidas na tentativa de aumentar a produção agrícola propicia o aparecimento de intoxicações.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 1973 mais de 500.000 intoxicações anuais por praguicidas no mundo, com uma provável taxa de letalidade de 1%. Em 1990, esta estimativa passou para cerca de três milhões de intoxicações agudas anuais por agrotóxicos, com 220 mil mortes, sendo que, 70% destes casos ocorreram nos países em desenvolvimento. Além disso, a OMS relata que 750 mil

peessoas adquirem doenças crônicas em decorrência da utilização de praguicidas. Corroborando estas estatísticas, uma pesquisa da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), realizada em 12 países da América Latina e Caribe, mostrou que o envenenamento por produtos químicos, principalmente chumbo e praguicidas, representa 15% de todas as doenças profissionais registradas (PIRES et al., 2005a).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) da Fundação Oswaldo Cruz, divulgou em 1999 que os agrotóxicos são causadores de 10% dos casos de intoxicações registradas no Brasil, fazendo 6.710 vítimas naquele ano, destes, 2.531 foram acidentais e 2.235 foram tentativas de suicídio. No ano de 2009, na estatística deste mesmo sistema, foram notificados 11.484 casos de intoxicações por agrotóxicos de uso geral, sendo 1.320 (11,49%) casos registrados como uso ocupacional e 4.746 (41,33%) casos em que a circunstância de uso foi a tentativa de suicídio. A maior parte destes casos ocorreu nas regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste, com 5.151, 2.708 e 2.191, respectivamente. Os agrotóxicos só perdem para os medicamentos em número de casos de intoxicações (26.540), entretanto, o número de óbitos é o maior em relação a todos os agentes tóxicos atingindo 186 mortes em 2009 (SINITOX, 2009).

O Sinitox (2009) também revela que a circunstância "tentativa de suicídio" foi a maior causa de intoxicação (2.491 casos) relacionada com o uso agrícola de agrotóxicos. Estudos epidemiológicos desenvolvidos com trabalhadores rurais da serra gaúcha demonstraram que a intoxicação por agrotóxicos apresentou forte associação com transtornos psiquiátricos menores, denominados problemas de nervosismo e problemas de tristeza e desânimo (AMORIN et al., 2003). Assim, trabalhadores que manipulam estes compostos de maneira inadequada por um longo período de tempo apresentam transtornos psiquiátricos que podem contribuir

para o elevado índice de tentativas de suicídio. Mais recentemente, estudos epidemiológicos têm relatado forte associação do uso contínuo de organofosforados com a doença de Parkinson (SLOTKIN e SEIDLER, 2011).

Pires, et al. (2005a) relatam que em 2001, enquanto a taxa média de letalidade devido a todos os agentes causadores das intoxicações foi de 0,4%, a mortalidade devido a agrotóxicos foi de 3,4%. Do total de 8.697 casos de intoxicações atribuídas às tentativas de suicídio, 11,6% foram provenientes do uso de agrotóxicos. Estes números refletem apenas parcialmente a realidade do Brasil, já que segundo estimativas do Ministério da Saúde, para cada evento de intoxicação por agrotóxico notificado, existem outros 50 não relatados (PERES et al., 2001).

Os problemas relacionados com o uso de praguicidas têm levado a uma crescente inquietação por parte dos órgãos responsáveis que atuam com o objetivo de se obter boas práticas de utilização destas substâncias. Principalmente porque os países que mais utilizam estes compostos nas culturas agrícolas dispõem de recursos humanos pouco treinados, pouca ou nenhuma infra-estrutura para fiscalização ou formação adequada e populações altamente suscetíveis com elevadas taxas de analfabetismo e precárias condições de saúde (WESSELING et al., 2005).

Os praguicidas estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores rurais e para o meio ambiente. Utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, são ainda utilizados na construção e manutenção de estradas, tratamentos de madeiras para construção, indústria moveleira, armazenamento de grãos e sementes, combate às endemias e epidemias. Enfim, as utilidades desses produtos excedem em muito o que comumente se conhece (SILVA et al., 2006).

Dentre os praguicidas responsáveis pelas intoxicações, destacam-se os OPs e carbamatos com 34% e 26%, respectivamente. Os OPs são os inseticidas mais utilizados nas tentativas de suicídio e levam também ao maior número de mortes, seja por exposição voluntária ou involuntária. O monocrotofós e o metamidofós foram responsáveis pela maioria dos registros das intoxicações e tentativas de suicídio, representando em média, 46% e 29% respectivamente, das ocorrências reportadas aos inseticidas (PIRES et al., 2005b).

3.2 A intoxicação por praguicidas organofosforados

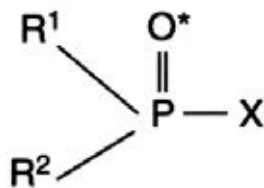
Os praguicidas, segundo a Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), são produtos químicos ou quaisquer substâncias destinadas à prevenção, à destruição, ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer outra forma nos alimentos. Definição semelhante é usada na legislação brasileira, inciso IV do decreto 4074 de janeiro de 2002 para agrotóxicos e afins como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (ANVISA, 2002).

O International Programme on Chemical Safety – World Health Organization (IPCS-WHO) classifica os praguicidas organofosforados e carbamatos como inibidores das colinesterases com menores efeitos ao ambiente, porém com maior toxicidade aguda aos organismos. Estes compostos são classificados como

moderadamente tóxicos (clorpirifós e carbofuran), altamente tóxicos (metamidofós e metomil) e extremamente tóxicos (terbufós e aldicarb). Alguns países industrializados têm restringido o uso de muitos praguicidas OPs e alguns destes compostos, como o monocrotofós e o temefós (muito utilizado no Brasil para o combate à larva do mosquito *Aedes aegypti*), não têm permissão para serem utilizados nos países da união europeia (WESSELING et al., 2005).

Há também uma classificação toxicológica da OMS baseada na dose letal capaz de matar 50% da população exposta (DL_{50}) e adotada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Nesta classificação os compostos são divididos em: Classe I (Extremamente Tóxicos – Faixa vermelha); Classe II (Altamente Tóxicos – Faixa Amarela); Classe III (Medianamente Tóxicos – Faixa azul); Classe IV (Pouco Tóxicos – Faixa verde). Alguns OPs dos mais usados em todo o Brasil fazem parte da classe I (metamidofós) e outros fazem parte da classe II (triclorfom) (ANVISA, 2002). Portanto, a classe de compostos organofosforados é altamente tóxica e deve ser utilizada com muito cuidado pelos trabalhadores.

Quimicamente, os praguicidas OPs normalmente são ésteres, ésteres de tiol ou anidridos derivados de ácidos fosfóricos. A estrutura química geral destes praguicidas está representada na Figura 1. Se os radicais R_1 e R_2 estiverem diretamente ligados ao átomo de fósforo, os compostos serão chamados de fosfinatos. Se ambos radicais (R_1 e R_2) estiverem ligados ao átomo de fósforo via ligação -O- ou -S-, então serão chamados de fosfatos, mas se um radical se ligar diretamente ao fósforo e o outro via ligação -O- ou -S-, aí serão chamados de fosfonatos. Nos fosforoamidatos, o carbono é ligado ao fósforo através de um grupamento amino (JOHNSON et al., 2000).



* ou S

Figura 1: Estrutura química geral dos organofosforados. Onde R_1 e R_2 são geralmente dois grupos metil ou etil para formar dimetil ou dietil. O grupamento X é o grupo que irá abandonar o complexo enzima-organofosforado após a ligação enzimática. Pode ser alifático, aromático ou grupos heterocíclicos que serão ligados ao átomo de fósforo por uma ligação -O- ou -S- (JOHNSON et al., 2000).

Embora os OPs empregados como inseticidas apresentarem preferencial toxicidade aos insetos, eles também são tóxicos aos humanos e outros animais devido à inibição da acetilcolinesterase (AChE) e subsequente acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas. Contudo, clinicamente, os sintomas da intoxicação por OPs não provém apenas da inibição da AChE e são divididos em quatro síndromes: (1) síndrome aguda (colinérgica), (2) síndrome intermediária, (3) transtornos neuropsiquiátricos crônicos induzidos por OPs e (4) neuropatia retardada induzida por OPs (NRIOP).

(1) A síndrome aguda é devido à inibição da enzima AChE no sistema nervoso central e periférico. Esta esterase é uma enzima responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. A inibição desta enzima resulta em um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas. Como consequência disto, há um aumento da atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático e sistema nervoso central (ECOBICHON, 2001). Os sinais devido à estimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático podem ser provenientes da ação em receptores

muscarínicos ou nicotínicos. A estimulação dos receptores muscarínicos leva ao aumento de secreções, broncoconstrição, miose, cólicas gastrintestinais, diarreia, bradicardia e poliúria. Os efeitos sobre os receptores nicotínicos são: fadiga, câibra, fasciculações e fraqueza muscular generalizada. Os efeitos no sistema nervoso central são: confusão mental, cefaleias, convulsões e coma. Estes sintomas exigem atendimento emergencial e geralmente é administrada atropina que age como inibidor competitivo da acetilcolina e oximas (ex: pralidoxima) que agem como reativadores nucleofílicos da AChE (POPE, 2006).

(2) A Síndrome Intermediária foi primeiramente descrita por Senanayake e Karalliedde em 1987 e aparece depois da crise colinérgica e antes da NRIOP. Esta síndrome foi caracterizada por fraqueza dos músculos proximais dos membros, músculos flexores do pescoço, músculos respiratórios e nervos motores cranianos. Também foi atribuído à necrose da fibra muscular após a crise colinérgica aguda. Embora a incidência da Síndrome Intermediária possa ser alta e sendo considerada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade por OPs, a fisiopatologia subjacente desta síndrome permanece não muito clara. Ainda não se sabe quais OPs podem gerar esta síndrome, mas se sabe que, por exemplo, o monocrotofós é capaz de causar a síndrome intermediária (YANG e DENG, 2007).

(3) Os transtornos neuropsiquiátricos crônicos induzidos por OPs podem ser causados pela exposição repetida e a baixas doses pelos OPs. O mecanismo desta síndrome é o menos conhecido dos efeitos crônicos dos OPs, mas se sabe que este mecanismo independe da inibição de esterases. Os sinais clínicos mais comuns incluem comprometimento da memória, dificuldade de concentração e aprendizagem, ansiedade, depressão e sintomas extrapiramidais tais como tremor,

instabilidade postural e rigidez dos músculos da face não responsivos ao tratamento por levodopa (SALVI et al., 2003).

(4) A NRIOP foi observada em mais de 70.000 casos em humanos nos últimos 75 anos. Este tipo de neuropatologia é conhecida desde a década de 30 quando pacientes de tuberculose foram tratados com fosfocresoto, que é uma mistura indefinida de ésteres derivados do ácido fosfórico e fenóis. Na década de 30, milhares de casos de paralisia ocorreram nos Estados Unidos devido ao consumo do extrato de gengibre da Jamaica contaminado com tri-orto-cresil fosfato (TOCP). Após este evento, epidemias similares foram reportadas no Marrocos, Holanda, Iugoslávia, França, África do Sul e Índia (ZHAO et al., 2004).

A NRIOP caracteriza-se por uma axonopatia distal, central e periférica tipo *Walleriana* que se desenvolve de 8 a 14 dias após intoxicação por um OP neuropático. Dentre os OPs que causam a NRIOP, incluem fosfatos, fosfonatos e fosforamidatos. Como exemplo de alguns compostos que já foram relatados como causadores da NRIOP tem-se o TOCP, metamidofós, mipafox, diclorvós, leptofós e triclorfom. O metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotioato) foi o praguicida com mais frequência reportado como causador da NRIOP em seres humanos (MCCONELL et al., 1999). Para que se desenvolva esta neuropatia é necessária uma inibição de 70-80% de uma esterase ligada à membrana conhecida por esterase susceptível à neuropatia (ESNp).

Os sintomas habituais no início são câibras, dores musculares, sensação de formigamento, perda de sensibilidade, fraqueza distal progressiva e queimação maiores nos pés do que nas mãos. Depois segue uma debilidade progressiva, de início nas pernas que evolui para atrofia distal dos músculos. Os casos mais graves

podem levar à paralisia completa, problemas respiratórios e morte (ABOU-DONIA, 2003).

Um estudo realizado na região de Nova Friburgo no estado do Rio de Janeiro detectou uma prevalência de 12,8% de casos de neuropatia em relação a todos os sinais de intoxicações por praguicidas. Um dos fatores que contribuiu para esta alta prevalência foi o uso excessivo de compostos OPs para o combate aos insetos, dentre eles o princípio ativo metamidofós representou 90% de uso em relação a todos os praguicidas utilizados naquela região (ARAÚJO et al., 2007).

3.3 A AChE e a ESNp como alvo dos organofosforados

Atualmente, os indicadores biológicos são ferramentas de rotina nos diversos protocolos de biomonitoramento. Existem duas principais enzimas com atividade colinesterásica no sangue. A acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase eritrocitária (EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE) ou colinesterase plasmática (EC 3.1.1.8) são marcadores úteis para avaliar os efeitos de exposição a inseticidas organofosforados e carbamatos. Estas enzimas pertencem à família das α/β hidrolases e apresentam cerca de 54% da sequência de aminoácidos idêntica, mas diferem na especificidade para diferentes substratos e inibidores (SHENOUDA et al., 2009).

A BChE apresenta maior afinidade para hidrolisar a butirilcolina, e se apresenta mais abundante no fígado e no plasma, pois atua no metabolismo de vários anestésicos de importância clínica tais como procaína, heroína, cocaína e succinilcolina. A AChE apresenta maior especificidade para hidrolisar a acetilcolina e é encontrada em muitos tecidos dentre os quais os eritrócitos, terminações nervosas, pulmões e baço (BERNARDI et al., 2010).

Tradicionalmente, o plasma e os eritrócitos são empregados para se realizar a análise da atividade da BChE e da AChE em caso de exposição a algum OP. A OMS reconhece que o biomonitoramento da atividade da AChE tem se tornado uma medida preventiva contra a superexposição aos OPs (GAGNAIRE et al., 2008). Este marcador se comporta como bioindicador de efeito, pois à medida que a enzima se encontra mais inibida os efeitos tóxicos são mais exarcebados. Com apenas 10% de inibição enzimática aparecem poucos sintomas como náuseas, mal-estar, fraqueza muscular mínima e cólica sem diarreia, não sendo necessário o tratamento antidotal com atropina e pralidoxima. Entretanto, com 80% de inibição enzimática já se tem insuficiência respiratória, paralisia, coma e convulsões, podendo levar ao óbito se não for feito o tratamento com atropina e pralidoxima.

Em condições normais, a célula pré-sináptica sintetiza acetilcolina a partir de colina mais o cofator acetil coenzima A através da ação da enzima colina acetiltransferase. Após a ação da despolarização terminal, as vesículas contendo acetilcolina se fundem com a membrana e então ocorre a liberação deste neurotransmissor na fenda sináptica. A AChE hidrolisa a acetilcolina rapidamente e eficientemente. Entretanto, quando ocorre a inibição da AChE a eficiência desta enzima se perde e o efeito da acetilcolina se prolonga nas sinapses. Existem vários inibidores da AChE que já são empregados no tratamento de doenças como Alzheimer (rivastigmina, tacrina e galantamina). Em todos os casos, a estratégia terapêutica é aumentar a persistência da acetilcolina sináptica pelo bloqueio de sua degradação. Esta estratégia global é baseada em uma condição clínica em que a ativação de receptores colinérgicos é deficiente. Assim, o aumento da residência de moléculas de acetilcolina dentro das sinapses pela AChE inibida pode, pelo menos parcialmente, neutralizar deficiência em qualquer liberação de neurotransmissores

ou redução de receptores colinérgicos. Em alguns casos, estes inibidores de duração mais curta são utilizados como proteção (ex: para soldados) contra outros inibidores mais duradouros tais como os OPs (ex: o soman). Apesar de parecer contraditório utilizar um inibidor de AChE para proteger de outro inibidor, a lógica desta ação se baseia na diferença de duração da inibição entre os dois tipos de inibidores. Enquanto a duração da inibição da fisostigmina é curta, a duração da inibição de um OP é longa (POPE et al., 2005).

O método de Ellman et al. (1961) é o mais utilizado para se avaliar espectrofotometricamente a atividade das colinesterases sanguíneas. O princípio deste método se baseia na reação entre o ácido 5,5-*ditio-bis*(2-nitrobenzóico) (DTNB) e os grupos sulfidril liberados pela hidrólise da acetiltiocolina, que é utilizada como substrato da reação enzimática a concentrações conhecidas. A cor amarelada gerada é medida espectrofotometricamente a 412 nm (TRYFONOS et al., 2009).

A esterase susceptível à neuropatia (ESNp) foi originalmente identificada por Johnson (1969) como alvo dos ésteres OPs, pelos quais, causam a neuropatia retardada em humanos e outros vertebrados. É uma enzima ligada à membrana, com 1327 aminoácidos, pertencente ao grupo das esterases, com peso molecular de 155 kDa e de papel fisiológico ainda não estabelecido (GLYNN, 2006; 2007).

Provavelmente, a ESNp apresenta como substrato compostos carboxil ésteres e é inibida pelos ésteres OPs em um mecanismo de ação geral de uma esterase. O sítio ativo da enzima faz um ataque nucleofílico no acil-carbono do éster. A hidroxila alcoólica é rapidamente liberada e um composto covalente acil-enzima é produzido. Este composto é facilmente hidrolisado liberando o ácido carboxílico e a enzima. Já quando a ESNp reage com um OP neuropático, apesar

de reagir de maneira análoga, a taxa de hidrólise do organofosforilado-enzima é muito menor do que o acil-enzima, o que torna esta inibição praticamente irreversível. A taxa de envelhecimento da enzima fosforilada depende da natureza do grupo R de saída do OP, sendo mais lenta para grupos metil (GLYNN, 2000).

Mais recentemente, a atividade da ESNp tem sido avaliada com substratos lisofosfolipídicos mais relevantes em sua função fisiológica, pelos quais distinguem dos demais lipídios por sua única cadeia hidrofóbica (GREINER et al., 2010). Lisofosfolipídios em células saudáveis de mamíferos constituem entre 0,5 e 6% do total do peso dos lipídios. No entanto, em concentrações elevadas, estes lipídios estão ligados a aterosclerose, inflamação e hiperlipidemia. Ainda, tem sido bem estabelecido que estes lipídios funcionam como agentes neurotóxicos quando em contato com linhagens celulares cerebelares e células da medula espinhal de ratos em concentrações na ordem de micromolares em estudos *in vitro*. Alguns autores propuseram que a atividade fisiológica da ESNp pode estar relacionada com a manutenção da fluidez da bicamada lipídica da membrana plasmática (AKASSOGLU et al., 2004). Portanto a atividade normal da ESNp é essencial para a manutenção da membrana do neurônio e consequentemente para a permeabilidade celular.

O mecanismo de ação tóxica para o desenvolvimento da NRIOP foi descrito por Johnson (1982) e envolve inicialmente a desalquilação fosfórica da ESNp. A simples inibição da ESNp não é suficiente para resultar na NRIOP. É necessária a geração de uma carga negativa na porção terminal do grupamento fosforado ligado à enzima. Isso ocorre como resultado de uma segunda reação, chamada de “envelhecimento”. Este composto negativo é extremamente estável e resiste à quebra hidrolítica ou reativação promovida por agentes como oximas. Já para o

aparecimento dos efeitos colinérgicos agudos não é necessário o envelhecimento da AChE e a consequente formação de um complexo com carga negativa, ou seja, a enzima pode ser reativada por oximas (BATTERSHILL et al., 2004). O mecanismo da inibição das esterases feita pelos praguicidas OPs está esquematizado na Figura 2.

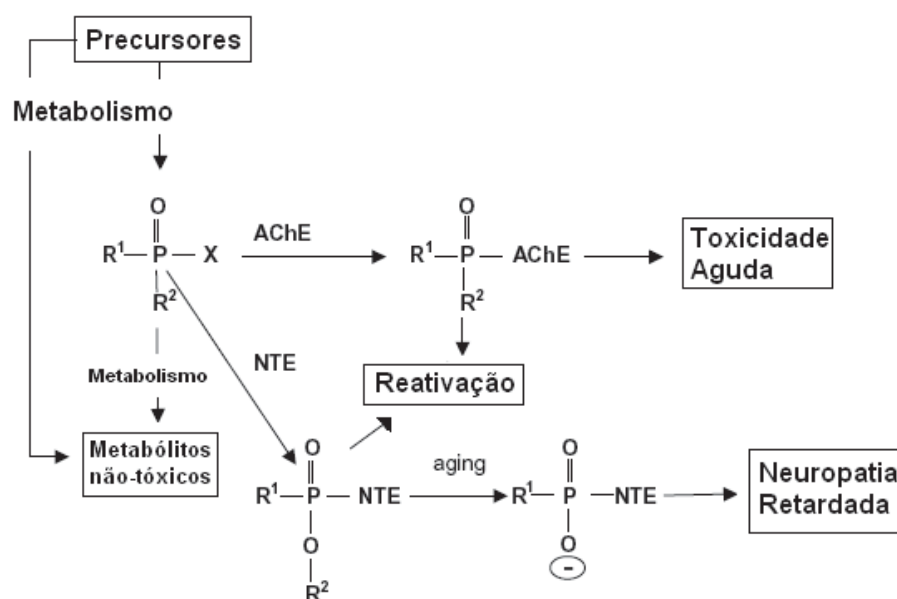


Figura 2: Reações dos organofosforados com a AChE e a ESNp (NTE = *neuropathy target esterase*; sigla em inglês para ESNp) (Fonte: BATTERSHILL et al., 2004).

Certos inibidores da ESNp tais como, fosfinatos, carbamatos, tiocarbamatos e sulfonil fluoretos apresentam ambos radicais "R" diretamente ligados ao átomo de fósforo. Estes compostos também reagem covalentemente com o centro ativo da esterase, mas não promovem a reação de envelhecimento, consequentemente, esterases inibidas por estes compostos não formam um grupo terminal com carga negativa e são reativados por mecanismos endógenos. Quando se administra esta classe de substâncias antes de OPs neuropáticos, ocorre uma proteção e pode evitar o surgimento da NRIOP (MORETTO, 2000).

A atividade da enzima ESNp pode ser verificada nos linfócitos e plaquetas, bem como no sistema nervoso central e nervos periféricos (MARONI; BLEECKER, 1986). O método para avaliar a atividade desta enzima é baseado na detecção na região visível (510 nm) da cor alaranjada formada entre a reação do fenol, liberado pela quebra do fenil valerato (substrato) e o ferricianeto de potássio (GLYNN, 2000).

Várias espécies animais são sensíveis à NRIOP. Nesta lista incluem-se galinhas, gatos, cães, cavalos, carneiros, porcos, macacos e o homem (JOHNSON e GLYNN, 1995). A galinha adulta é o animal modelo para se estudar esta neuropatia (US EPA, 1996), devido à sua sensibilidade e sinais clínicos serem muito semelhantes àqueles vistos na espécie humana. Além disso, o progresso destes sinais é fácil de ser observado e correlacionado com as mudanças histopatológicas. Ainda, a galinha fornece boa reprodutibilidade de resultados em um modelo animal relativamente pequeno e acessível (JOHNSON, 1974). Esses animais, quando administrado uma única dose oral, apresentam lentidão de movimentos, seguida de ataxia (dificuldade de locomoção dos membros inferiores), até impedimento total da locomoção (JOHNSON, 1975; EMERICK et al., 2010).

3.4 A degeneração do tipo *Walleriana*

Em vários distúrbios neurodegenerativos provocados por agentes tóxicos, ocorre a degeneração Walleriana. O conceito de degeneração axonal foi inicialmente reportado por Augustus Waller há cerca de cem anos. De acordo com a sequência de eventos que ocorrem na porção distal do axônio, esta degeneração é chamada de axonal tipo *Walleriana* e se caracteriza pela ativação de proteases cálcio-dependentes (calpaínas) devido à passagem excessiva de cálcio para o meio intracelular. A ativação destas proteases promove a digestão da porção terminal do

axônio, o que impede a transmissão do impulso nervoso para a célula pós-sináptica (ANTHONY et al., 2001). Inicialmente, há um período em que a porção distal do axônio mantém relativa estrutura, transporte e condução normais. A duração deste período latente é proporcional ao tamanho do axônio. Após este período de manutenção, ocorre então a proteólise que promove digestão do axolema e axoplasma, deixando apenas a bainha de mielina circundando o axônio dilatado (JORTNER et al., 2005).

Embora a inibição e subsequente envelhecimento da ESNp tenham sido propostos como os eventos iniciais da NRIOP, as alterações que ocorrem entre a inibição da ESNp e o aparecimento dos sinais clínicos não estão completamente entendidas. O mecanismo proposto é que a inibição da ESNp pelos OPs está associada com o aumento de atividade de calpaínas e com o decréscimo no cálcio extracelular (CHOUDHARY e GILL, 2001; EMERICK, et al., 2010). O que parece é que o cálcio possa estar migrando para o meio intracelular e isto pode então ativar quinases Ca^{+2} /dependentes levando à aberrante fosforilação de proteínas do citoesqueleto, o que é um fato comum em muitos processos neurodegenerativos (SCHLAEPFER e BUNGE, 1973).

As proteases cálcio dependentes intracelulares possuem várias funções na regulação dos diversos sistemas celulares. Dentre elas, as calpaínas que apresentam como principais funções, a degradação de proteínas do citoesqueleto, modificação de receptores de esteróides e a ativação de proteínas quinases. Já está estabelecido que existem, no mínimo, dois tipos de calpaínas. Um tipo requer concentrações de cálcio na ordem de mM para sua atividade, enquanto que o outro tipo requer concentrações de cálcio na ordem de μM (INOMATA et al., 1983).

O sistema nervoso periférico consiste principalmente de axônios, revestimentos da membrana (mielina), populações de corpos celulares dispostos em gânglios, uma variedade de células de suporte, barreiras do tecido conjuntivo e elementos vasculares (Figura 3). Este sistema fornece várias vantagens (em relação ao sistema nervoso central) para o patologista toxicológico que precisa avaliar alterações morfológicas relacionadas à exposição neurotóxica. Como exemplo, o nervo periférico é facilmente acessível durante as dissecações. É bem estabelecido que nem todas as condições neurotóxicas envolvem somente o tecido nervoso periférico. Algumas, especialmente entre as axonopatias e neuronopatias, podem afetar as fibras em ambos (central e periférico). Para as condições que afetam o nervo periférico, a organização deste tecido é particularmente útil na avaliação de gradientes proximo-distal de lesão de fibras nervosas. Além disso, estudos morfométricos são relativamente simples no tecido bem fixado. Deve-se atentar para o fato de que existe um potencial para a regeneração de fibras em nervos periféricos afetados, o que pode complicar essas avaliações em estudos toxicológicos a longo prazo. As principais categorias de lesões causadas por agentes tóxicos no nervo periférico (Figura 4) são: neuronopatias, axonopatias e mielinopatias (JORTNER, 2011).

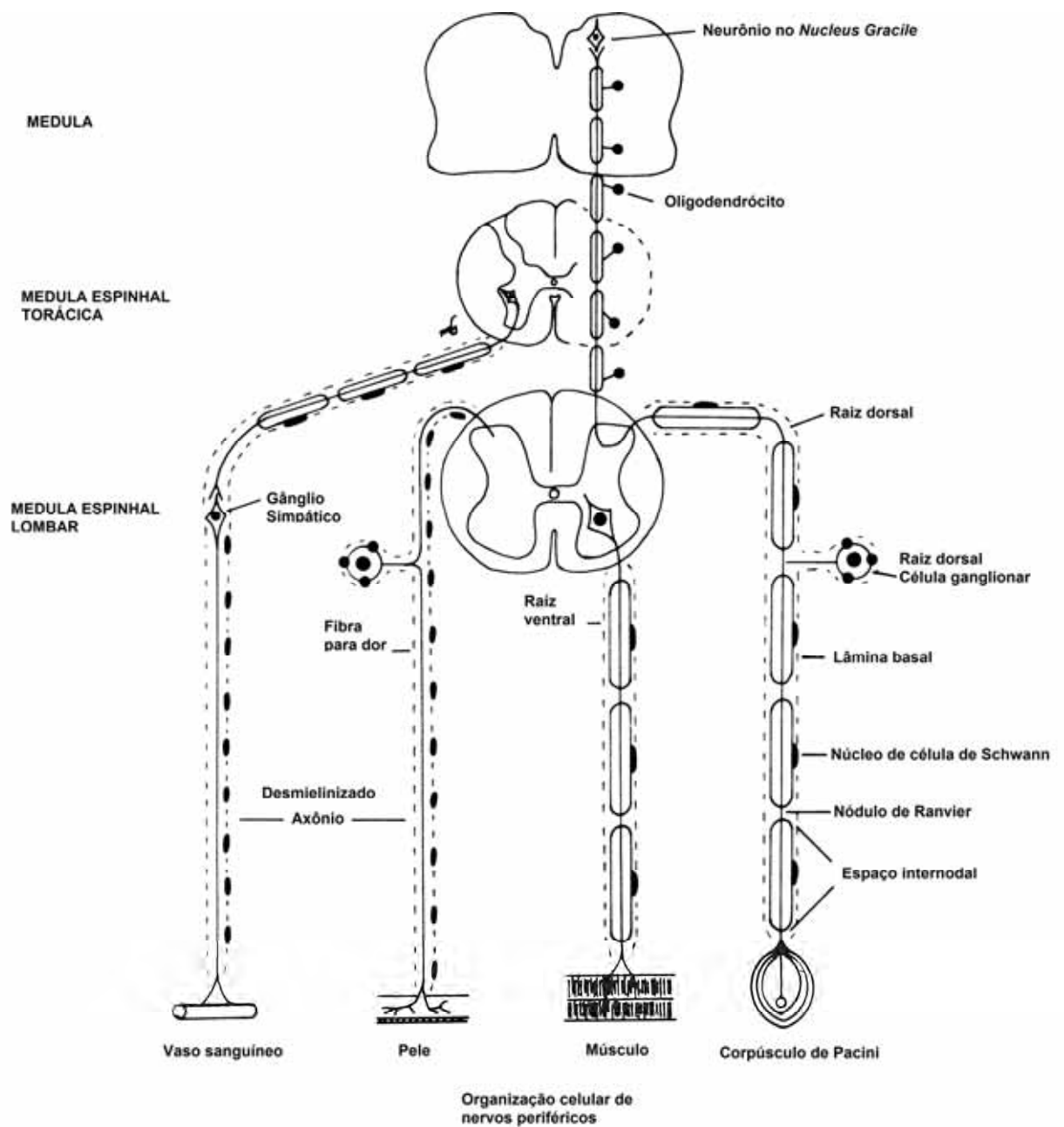


Figura 3: Componentes principais do sistema nervoso periférico (Fonte: JORTNER, 2011).

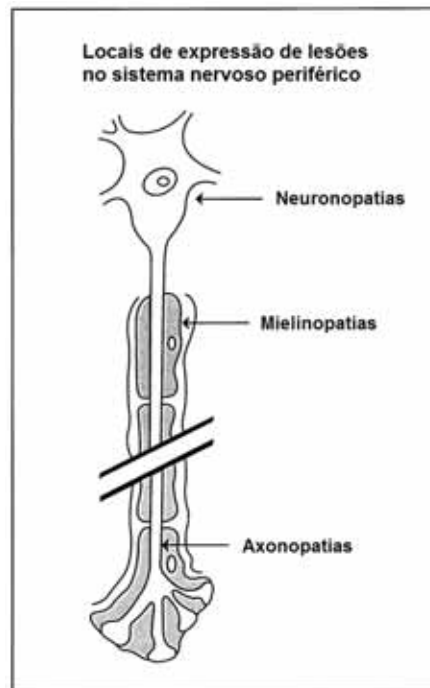


Figura 4: Locais de expressão de lesões no sistema nervoso periférico (Fonte: JORTNER, 2000).

Este trabalho manterá o foco em relação às axonopatias. O tamanho do axônio é um fator importante quando se discute a axonopatia, pois os maiores axônios e mais mielinizados são os mais afetados. A lesão básica é a degeneração axonal seguida pela desmielinização. Pela microscopia óptica estas lesões parecem consistir de inchaço axonal (coloração pálida ou cheio de detritos de coloração escura) com redução da bainha de mielina. Estas lesões são mais intensas em animais que apresentam sinais clínicos mais acentuados. Lesões tardias incluem a fragmentação de segmentos de fibras afetadas, ovóides ricos em mielina e fagocitose de elementos degradados por macrófagos ou células de Schwann. Ultra-estruturalmente, ocorre proliferação de túbulos intra-axonais e cisternas que se assemelham ao retículo endoplasmático liso. Seguindo estes eventos iniciais, ocorre inchaço do axônio com secundária redução da mielina, massas mitocondriais

anormais, corpos multilamelares membranosos e degeneração granular devido à lise do citoesqueleto. Este avanço da neuropatia pode estar relacionado com a ativação das calpaínas. Estas alterações são ilustradas pela Figura 5 (JORTNER, 2000).

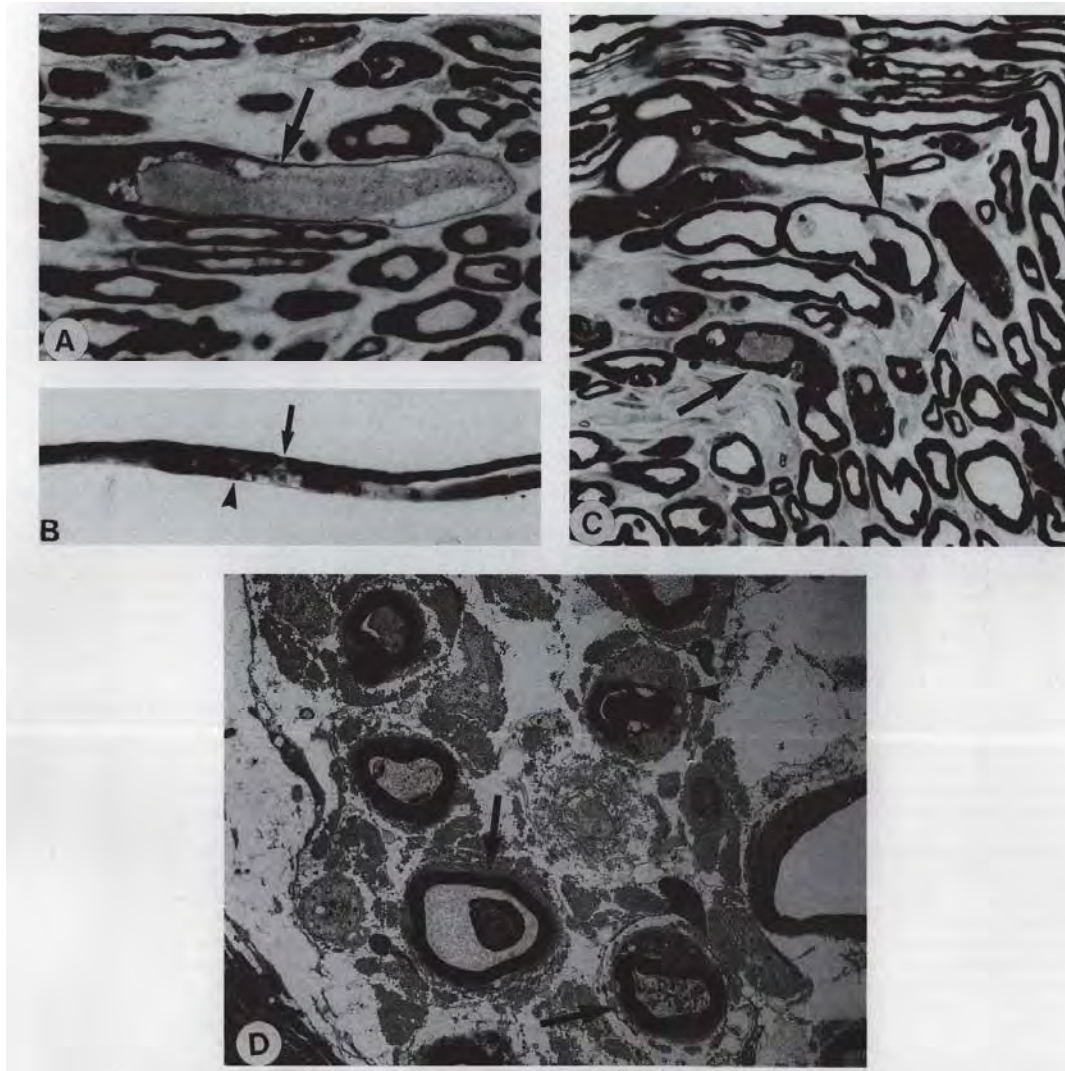


Figura 5: As fotografias mostradas são do nervo tibial localizado no músculo gastrocnêmio de galinhas que receberam uma dose de saligenin fenil fosfato (PSP = metabólito ativo do TOCP) (A, B e C) ou do nervo metatarsal dorsal de galinhas que receberam diisopropil fosfofluoridrato (D). A) Seção longitudinal de axônio inchado com camada de mielina atenuada (seta). Dia 9 após a exposição, coradas com toluidina azul e safranina (também usado em C). B) Fibra mielinizada intacta (a seta aponta para o nódulo de Ranvier) e uma fibra adjacente com degeneração do tipo

Walleriana (cabeça da seta). Dia 14 após a exposição, coradas com tetróxido de ósmio. C) Seção longitudinal que mostra vários estágios da degeneração das fibras (setas). Dia 15 após a exposição. D) Seção transversal que mostra alterações axonais iniciais (setas) e tardias (cabeça de seta). Espaço endoneural aumentado sugere edema (Fonte: JORTNER, 2000).

3.5 A enantiosseletividade e a separação cromatográfica dos praguicidas

Muitos compostos possuem em sua estrutura química centros assimétricos que lhes conferem a estereoisomeria. Compostos com um centro assimétrico podem existir em duas formas isoméricas conhecidas como enantiômeros. Todos os seres vivos apresentam grande quantidade de reações com especificidade quiral e a grande parte das reações enzimáticas que ocorrem dentro dos organismos é enantiosseletiva. Desta maneira, é de se esperar que haja seletividade enantiomérica quando compostos com centros assimétricos, incluindo fármacos e praguicidas sintéticos, penetram no sistema biológico (KURIHARA et al., 1997). Aproximadamente um a cada quatro praguicidas possui centros quirais em sua estrutura química (WANG et al., 2006).

Em laboratórios de síntese de agroquímicos, estes são produzidos como racematos, embora se saiba que a atividade biológica destes compostos seja enantiosseletiva, ou seja, alguns enantiômeros podem ser menos efetivos ou completamente inativos e ainda podem ser responsáveis pelos efeitos adversos nos organismos não-alvos. Por exemplo, o R-(+)-diclorprop é ativo contra erva daninha, enquanto que o S-(-)-diclorprop é inativo como herbicida. Para reduzir a quantidade de herbicida utilizado e a possibilidade da isoforma S- causar algum efeito

indesejado, vários países europeus têm decretado que apenas o R-(+)-diclorprop deve ser comercializado (LEFFINGWELL, 2003). Sendo assim, é desejável que se tenha na formulação do praguicida apenas o isômero responsável pela atividade biológica nos organismos alvos para reduzir os efeitos adversos no ambiente e nos organismos não-alvos.

O metamidofós, que apresenta um centro assimétrico no átomo de fósforo (Figura 6), é um dos OPs de mais amplo espectro de ação e também de mais alta toxicidade. É um potente inibidor da AChE usado para controlar insetos sugadores e ácaros em uma variedade de culturas, tais como: couve, algodão, tabaco, beterraba, alface, batata e árvores frutíferas. No entanto, a toxicidade do metamidofós não se limita a insetos-alvo, mas também humanos e animais têm sofrido com a alta incidência de efeitos tóxicos agudos e retardados deste OP. De acordo com Lotti et al. (1995), os efeitos neuropáticos não foram observados em galinhas quando a mistura racêmica do metamidofós foi administrada a estes animais com uma dose maior do que a DL_{50} e com profilaxia contra os efeitos colinérgicos. Ainda, alguns estudos relatam que este praguicida é altamente tóxico para organismos aquáticos com concentração letal de metade dos organismos testados por 96 horas de exposição (CL_{50}) de 25-51 mg/L para a truta arco-íris. Outro teste de toxicidade de 96 horas mostrou que uma concentração de metamidofós de 0,22 mg/L foi letal para larvas de crustáceos. Como um composto quiral, o (+)-enantiômero do metamidofós foi cerca de 6 vezes mais potente para a mosca do que a sua forma (-)-metamidofós (LIN et al., 2006). Portanto, a falta de informações sobre a enantiosseletividade do metamidofós e o excesso de efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo reforçam a necessidade de realização de novos estudos de toxicidade com os enantiômeros do metamidofós.

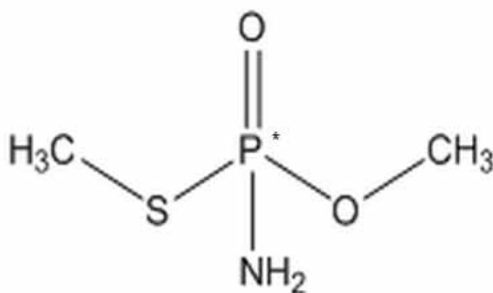


Figura 6: Estrutura química do metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotioato). * centro quiral.

Embora a sensibilidade da AChE e da ESNp sejam semelhantes no homem e em galinhas, uma das formas enantioméricas do metamidofós pode inibir mais a ESNp do que a AChE. E ainda, diferenças metabólicas entre a espécie humana e as galinhas, para as duas formas enantioméricas, podem contribuir para o aparecimento dos sinais colinérgicos nas galinhas e dos sinais retardados no homem. Ou seja, a forma que se apresenta como mais potente inibidor da ESNp pode ser metabolizada mais lentamente em humanos fazendo com que o efeito neuropático seja predominante nesta espécie (BATTERSHILL et al., 2004). Assim, é importante avaliar separadamente a toxicidade de cada enantiômero para que possa ser feita a diferenciação dos efeitos causados nas duas espécies.

É neste contexto de obtenção dos enantiômeros isolados é que entra a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é uma ferramenta analítica que emprega vários tipos de colunas, preparadas com fases estacionárias especiais e utiliza uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em vários tipos de amostra, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além disso, a separação e obtenção dos compostos presentes na

amostra podem ser em escala analítica, semipreparativa ou preparativa, com a possibilidade de emprego de colunas com microdiâmetro até colunas com dimensões elevadas (30 x 500 cm) que podem eficientemente separar quantidades consideráveis de amostra (GUIMARÃES; COLLINS, 1997).

Nas últimas duas décadas houve um crescimento muito significativo na separação de compostos quirais por CLAE. Esse crescimento ocorreu em vários campos de pesquisa tais como, desenvolvimento de fármacos, produtos naturais, agroquímicos, etc., não apenas para determinação da pureza óptica, mas também para separação enantiomérica em escala industrial (Ye et al., 2009; Ye et al., 2010). Embora um número de síntese estereosseletiva tenha sido descrita e aplicada para produção de enantiômeros simples, relativamente poucas destas rotas sintéticas são produzidas em larga escala, particularmente nos primeiros estágios de síntese de novos produtos. O tempo é um fator limitante para se obter enantiômeros puros em testes primários de novas substâncias. Nestes estágios primários, o desenvolvimento de uma síntese assimétrica seria muito caro e gastaria muito tempo. Logo, técnicas preparativas para a separação enantiomérica são de grande importância (MAIER et al., 2001).

O desenvolvimento de uma fase estacionária quiral capaz de reconhecer enantiômeros é o ponto chave da CLAE quiral. Existem várias colunas quirais comercializadas e, geralmente, estas consistem em uma molécula quiral pequena ou polímeros quirais fixados em um suporte de sílica gel. As colunas quirais de polissacarídeos estão entre aquelas de maior uso e geralmente são derivadas de benzoato e fenilcarbamato. Celulose e amilose apresentam capacidade de separar vários compostos quirais inclusive derivados de aminoácidos. A coluna de polissacarídeo Chiralcel OD[®] [tris-(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose] apresenta

excelente potencial de separação para uma variedade de compostos quirais. Esta coluna separa melhor as moléculas que possuem os substituintes nas posições *meta* e *para* do que na posição *orto* e o mecanismo de separação quiral por parte dos polímeros dependerá da unidade monossacarídica, da posição de ligação e do tipo de ligação (OKAMOTO e IKAI, 2008).

O mecanismo de reconhecimento quiral tem sido muito estudado e esta abordagem pode fornecer muita informação, particularmente, parâmetros termodinâmicos para interações entre solutos e fase estacionária durante a resolução. No entanto, para entender a resolução quiral ao nível molecular, abordagens espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear, se tornam necessárias. Por exemplo, fenilcarbamatos de celulose são as fases estacionárias quirais mais utilizadas e a separação dos enantiômeros é fortemente influenciada pelos substituintes no grupamento fenil desde que altere a polaridade do produto. Isto sugere que o sítio mais importante nas fases polissacarídicas são os grupos polares ligados ao carbamato (YASHIMA, 2001).

Ellington et al. (2001) testaram várias colunas de polissacarídeos para a separação de praguicidas organofosforados. Os autores obtiveram boas resoluções na separação de crotoxifós, dialifor, fonofós, malation, protiofós e tricloronato utilizando a coluna Chiralcel OJ[®] [tris-(4-metil benzoato) de celulose]. Para a separação do fenamifós foi utilizada a coluna Chiralpak AS[®] [(tris-(S)-1-feniletil carbamato) de amilose] e a Chiralpak AD[®] [tris-(3,5-dimetil-fenil carbamato) de amilose]. Ainda, um número de publicações tem descrito a separação em escala analítica bem sucedida do metamidofós em fases derivadas de polissacarídeos baseadas no modo de eluição normal (MIYAZAKI et al., 1988; ELLINGTON et al., 2001; LIN et al., 2006; WANG et al., 2006). Já Tian et al. (2007) testaram a

separação quiral do metamidofós pelo modo reverso de eluição e não obtiveram boa resolução entre os enantiômeros. No entanto, não existem estudos que lidam com a separação quiral em escala semipreparativa do metamidofós.

4. JUSTIFICATIVA

Tem sido relatado um grande número de casos de intoxicações em seres humanos, acidentais ou suicidas, por praguicidas e muitos destes são OPs neuropáticos. Entretanto, para alguns compostos é difícil de analisar a neurotoxicidade retardada no modelo animal mais adequado, pois as galinhas apresentam forte crise colinérgica aguda que impossibilita a visualização dos efeitos retardados. Uma possível explicação para tal diferença de efeito entre a espécie humana e a galinha é o fato de que estes compostos OPs neuropáticos apresentam em sua estrutura química um centro quiral, e desta forma o composto existe na forma de dois enantiômeros. Quando a mistura racêmica atinge a circulação sanguínea, os enantiômeros apresentam diferenças de afinidade entre a AChE e a ESNp. Logo, casos da NRIOP podem estar ocorrendo em seres humanos, mas não estão sendo vistos no modelo animal preconizado para este tipo de avaliação de neurotoxicidade. Desta forma, torna-se necessária a separação quiral dos enantiômeros de OPs para a avaliação da toxicidade aguda e retardada de cada isômero. Assim, a execução deste trabalho pode contribuir de maneira significativa para maior conhecimento da neurotoxicidade dos praguicidas OPs, visando não só a diferenciação da neurotoxicidade entre os enantiômeros e a mistura racêmica, bem como a redução do número de sua ocorrência.

5. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar, em galinhas e seres humanos, a neurotoxicidade de formas enantioméricas puras de compostos organofosforados utilizados como praguicidas, tendo o metamidofós como protótipo, utilizando a AChE, BChE, calpaínas e a ESNp como biomarcadores.

Para alcançar tal objetivo, propôs-se a seguinte estratégia:

- a) Desenvolver um método de separação quiral analítico e semipreparativo para a mistura racêmica do metamidofós utilizando a técnica de CLAE.
- b) Avaliar *in vitro* a inibição enzimática das colinesterases e da ESNp utilizando tecidos humano e de galinha.
- c) Calcular as concentrações inibitórias a 50% (IC_{50}) da BChE, AChE e da ESNp e determinar o índice $IC_{50} \text{ ESNp} / IC_{50} \text{ AChE}$ em humanos e galinhas e comparar com resultados obtidos de um estabelecido (mipafox) indutor da NRIOP*.
- d) Avaliar, *in vivo*, os efeitos bioquímicos, clínicos e histopatológicos dos enantiômeros do metamidofós após a administração via oral em galinhas e comparar com resultados obtidos de um estabelecido (TOCP) indutor *in vivo* da NRIOP*.

* O mipafox não requer biotransformação para exercer o seu efeito neuropático e por isso é mais utilizado em testes *in vitro* da indução da NRIOP. Por outro lado, o TOCP requer biotransformação em PSP para induzir a NRIOP e por isso é mais utilizado nos testes *in vivo*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Equipamentos

CLAE: A separação em escala analítica foi feita em um cromatógrafo líquido SHIMADZU composto de bomba modelo LC-10AD acoplada a detector de ultravioleta, de comprimento de onda variável, SPD-10AV, autoinjeter SIL-10AF. O equipamento apresenta-se ligado à interface CBM-10A e os cromatogramas foram registrados pelo software CLASS-LC10A. A separação semipreparativa foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU, composto de bomba modelo LC-6AD acoplada a detector de ultravioleta, de comprimento de onda variável, SPD-10AV, injetor manual RHEODYNE 7725i com loop de 50 µL. O equipamento apresenta-se ligado à interface CBM SCL-10A e os cromatogramas foram registrados pelo software CLASS-VP. A técnica de CLAE foi executada no laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) sob a supervisão da Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira (coorientadora). Além do cromatógrafo líquido foram necessários os seguintes equipamentos:

- Balança analítica, peagômetro, banho termostatizado, centrífuga refrigerada Sorvall Thermo Scientific, rotaevaporador, sonicador, polarímetro Perkin-Elmer 241, espectrofotômetro UV/Visível modelo HP 8453 com controlador de temperatura e agitação modelo HP 89090A, *SpeedVac Concentrator* modelo Termo Scientific SPD131DDA, microscópio óptico com câmera integrada e citômetro de fluxo modelo BD Facsaria número 1.

6.2 Reagentes

Dodecil sulfato de sódio (SDS), metamidofós padrão analítico, tris hidroximetil amino metano (Tris), soro albumina bovina (BSA), dietil 4-nitrofenil fosfato (paraoxon 90%), coomassie brilhante blue G-250%, 2-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), nimodipino, cloreto de cálcio, caseína de leite bovino, histopaque[®] 1077 (Ficoll), ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), heptano, ácido fosfórico 85% d = 1,685, Sigma[®]. 4-aminoantipirina, ferricianeto de potássio, citrato de sódio, sulfato de sódio anidro, bicarbonato de sódio, dimetilformamida, azida sódica, dimetilsulfóxido (DMSO), Merck[®]. N,N-di-isopropilfosforamidofluridato (mipafox), fenilvalerato, Oriza[®]. Triton X-100, etanol 95%, Vetec[®]. Heparina sódica 25000UI/5mL Roche[®]. Cloreto de sódio, ácido clorídrico, fosfato bibásico de sódio, hidróxido de sódio, Synth[®]. Etileno diamino tetra acetato de sódio (EDTA), Reagen[®]. Acetona, Qhemis[®]. Etanol HPLC, 2-propanol HPLC, J. T. Baker. Hexano HPLC, Fischer Scientific[®]. Metamidofós técnico, Bayer Cropscience[®]. Todos os reagentes foram de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados no sistema cromatográfico, os quais foram de grau para CLAE.

6.3 Separação cromatográfica

Para as separações cromatográficas foram avaliadas as seguintes fases estacionárias quirais (FEQs) de polissacarídeos: *tris*[(S)-1-feniletil carbamato] de amilose (FEQ 1), *tris*(3,5-dimetil-fenil carbamato) de amilose (FEQ 2) revestidas com sílica APS-NUCLEOSIL[®] (500 Å, 7µm, 20%, p/p) e *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose (FEQ 3) revestida com sílica APS-HYPERSIL[®] (120 Å, 5µm, 15%, p/p). Também foi testada a fase comercial Chiralcel OD[®] [*tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose] (FEQ 4). Estas 4 fases analíticas foram empacotadas em suporte

metálico com dimensões de 15 cm de comprimento por 0,46 cm de diâmetro interno. Para a separação semipreparativa (FEQ 5) foi utilizada a fase comercial Chiralcel OD[®] [*tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose] empacotada em suporte metálico com dimensões de 20 cm de comprimento por 0,70 cm de diâmetro interno. Todas estas fases foram empacotadas no laboratório de Síntese Orgânica e CLAE da UFSCar e as FEQs 1-3 foram preparadas como descrito anteriormente em outros trabalhos do mesmo grupo (MATLIN et al., 1994; MATLIN et al., 1996; TIRITAN et al., 1998). O detector utilizado foi por radiação ultravioleta e o comprimento de onda escolhido foi de 230 nm baseado em trabalhos prévios (LIN et al., 2006). Antes de proceder a separação no equipamento preparativo foi feita a otimização das condições cromatográficas em um equipamento analítico. As frações coletadas no sistema preparativo foram levadas ao rotaevaporador por 30 minutos (90 rpm; 30°C) para evaporação dos solventes. Em seguida, levou-se as frações para a SpeedVAc (40 min, 45°C por 20 min), para evaporar o volume restante de solventes presentes na amostra. Para calcular a rotação específica de cada fração coletada foi utilizado o polarímetro. O valor de rotação específica foi aplicado na equação 1 para se obter o $[\alpha]_D$.

$$[\alpha]_D \text{ etanol} = \frac{\alpha}{c \cdot L} \quad (1)$$

Sendo que:

α = rotação específica;

c = concentração da solução em g/L;

L = comprimento da cuba do polarímetro em decímetro.

Para a determinação do fator de retenção (k), fator de separação (α) e resolução (Rs) foram utilizadas as equações 2, 3 e 4 respectivamente:

$$k_1 = \frac{T_1 - T_0}{T_0} \quad (2)$$

Sendo que:

T_1 = Tempo de retenção do 1° enantiômero;

T_0 = Tempo de retenção de um soluto não retido.

(3)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Sendo que:

k_1 = fator de retenção do 1° enantiômero

k_2 = fator de retenção do 2° enantiômero

(4)

$$Rs = 2. \frac{T_2 - T_1}{(w_1 + w_2)}$$

Sendo que:

T_1 = Tempo de retenção do 1° enantiômero;

T_2 = Tempo de retenção do 2° enantiômero;

w_1 = largura da base da primeira banda;

w_2 = largura da base da segunda banda;

A pureza enantiomérica foi calculada como a razão entre a área do (+ ou -)-enantiômero dividido pela soma das áreas dos dois enantiômeros e multiplicada por

100 (GAWLEY, 2006). O tempo de eluição de um soluto não retido (T_0) foi estimado usando o 1,3,5-tri-tert-butilbenzeno.

6.4 Animais

Foram utilizadas 12 galinhas para os estudos *in vitro* e 39 galinhas para os estudos *in vivo* todas em fase adulta da espécie *Gallus gallus domesticus*, linhagem “leghorn isabrown”, com idade superior a 18 meses. Estas aves foram adquiridas na cooperativa de Guatapar na granja Hayashi. A gua disponível para as aves no biotério do Laboratório de Toxicologia foi filtrada e a ração fornecida foi a Purina® recomendada para aves de postura. Ambas foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos com estes animais receberam parecer favorável do Comitê de tica em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, UNESP, e que atende pelo protocolo CEP/FCF/CAr. n 12/2009 – Animais em Pesquisa, com Parecer n 24/2009 de 27 de junho de 2009 (ANEXO A). Antes de iniciar qualquer experimento, as aves receberam tratamento para eliminação de ectoparasitos e endoparasitos:

A) Eliminação de ectoparasitos

- A gua e a ração dos animais foram retiradas;
- Foi retirada a maravalha junto com as bandejas;
- As galinhas e a gaiola foram pulverizadas com uma solução de 6 mL de k-othrin® (deltametrina) dissolvidos em 10 litros de gua;
- A gua e a comida foram retornadas para as gaiolas após uma hora (com o ambiente já seco).

B) Eliminação de endoparasitos

- Foi utilizado o anti-helmíntico Proverme® (citrato de piperazina tetraidratado, equivalente a 36% de piperazina base);
- 14g de Proverme® foram dissolvidos em 10 litros de água. Esse volume foi distribuído igualmente entre as quatro gaiolas contendo aproximadamente 10 galinhas cada. Essa solução substituiu a água de bebida das aves por 48 horas.

Após os tratamentos, as galinhas foram alojadas (3 animais/gaiola; Figura 7) no biotério do laboratório de toxicologia e mantidas a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade $55\% \pm 10\%$, e ciclo claro-escuro de 12 horas iniciando às 07h30min por uma semana para aclimação. Após uma semana de adaptação as galinhas foram escolhidas ao acaso para os experimentos (Figura 7).



Figura 7: Gaiolas do Biotério do Laboratório de Toxicologia.

6.5 Voluntários humanos

Foi coletado sangue de 80 voluntários do Hemonúcleo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Os doadores foram convidados a participar desta pesquisa após passarem pela triagem que todo doador de sangue brasileiro deve passar para ser aceito para doação e após prévia explicação da finalidade do presente trabalho. Após declararem que aceitavam ser voluntários,

foram assinados o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Doação de Material Biológico (ANEXO B E C) que são exigências da Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Também foi elaborado um questionário para que pudesse tomar conhecimento de alguns hábitos dos doadores (APÊNDICE B). No momento da doação o funcionário do hemonúcleo coletou cerca de 5 mL de sangue em tubos heparinizados para coleta à vácuo. Estes procedimentos receberam parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP e que atende pelo protocolo CEP/FCF/CAR 09/2009 parecer número 31/2009 (ANEXO D).

6.6 Cultura de células

Toda a parte de cultura celular foi realizada no *Laboratory for Neurotoxicity Studies* (Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, VA, USA) sob a supervisão da prof^a. Dra. Marion Ehrich (APÊNDICE A – cronograma de atividades). Passagens de 10 a 22 das células da linhagem SH-SY5Y neuroblastoma humano foram obtidas do "*American Type Culture Collection*" (ATCC, Manassas, VA, USA). Estas células cresceram em 15-20 mL de meio de cultura F12 (F12 HAM: Sigma cell culture, St. Louis, MO, USA) contendo 15% de soro fetal bovino (FBS; Summit Biotechnology, FL Collins, CO, USA) e 1% de uma solução antimicótica/antibiótica (10.000 UI/mL penicilina, 10.000 µg/mL streptomina, 25 µg/mL anfotericina B, Mediatech Inc., Manassas, VA, USA) a 37°C e 5% de CO₂. Os frascos plásticos utilizados para o crescimento destas células foram de 225 cm². Estudos prévios demonstraram que estas condições de crescimento citadas anteriormente maximizam as atividades das esterases neste tipo de cultura de células (EHRICH et al., 1995) . Para indução de diferenciação, estas células foram

tratadas com 2 mL de ácido retinóico (10 μ M) quando atingiam 60-80% de confluência. SH-SY5Y neuroblastoma humano permaneceram por 4 dias no ácido retinóico antes de serem coletadas para os experimentos. Para coleta das células removia-se o meio de cultura e incubavam as células com 3 mL de tripsina (0,5% diluída em meio de cultura) por 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Então, as células se desprendiam da parede do frasco para que fossem removidas cuidadosamente com pipetas. Em seguida, estas células foram contadas e a viabilidade celular foi determinada utilizando o tripan azul (0,5% em tampão PBS). O critério de exclusão para uso destas células nos experimentos foi viabilidade superior a 80%. Após a centrifugação (500 x g, 10 min), as células foram ressuspensas em tampão PBS para se padronizar concentração final de 1×10^7 células/mL. Assim, foram utilizadas estas células como amostra para realização dos ensaios para determinação da IC₅₀.

6.7 Preparo de soluções

Para iniciar as dosagens de proteínas nos linfócitos, cérebro e no plasma; determinação da atividade da ESNp, determinação da atividade da BChE plasmática, calpaínas e da AChE foi necessário o preparo das seguintes soluções:

1) Tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a 25°C:

8,77 g de cloreto de sódio

21,3 g de fosfato bibásico de sódio

HCl (6 N) qsp.....pH 7,2 a 25°C

Água qsp.....1000,0 mL

2) Tampão Tris 50 mM – EDTA 0,2 mM HCl pH 8,0 a 25°C:

6,06 g Tris

0,075 g EDT/A

HCl (6 N) qsp.....pH 8,0 a 25°C

Água qsp.....1000,0 mL

3) Tampão citrato-Tris 50mM pH 6,0 a 25°C:

1,47 g Citrato de sódio

0,61 g Tris

HCl (6 N) qsp.....pH 6,0 a 25°C

Água qsp.....100,0 mL

4) Paraoxon:

Antes de preparar a solução de paraoxon foi necessário realizar uma lavagem.

A) A lavagem do paraoxon foi feita da seguinte maneira:

- 1,0 mL de paraoxon 90% foi solubilizado em 3,0 mL de tricloroetileno.
- Foram acrescentados 3,0 mL da solução de bicarbonato de sódio 2,0%, preparada no momento da separação. Após misturar as duas fases, descartou-se a fase aquosa e repetiu-se a operação com o mesmo volume de bicarbonato de sódio.
- Separaram-se as fases e evaporou-se a fase orgânica usando o rotaevaporador.

B) Solução estoque (0,08 M): 0,18 mL de paraoxon lavado foram diluídos em 10,0 mL de acetona*.

* Secagem da acetona: A acetona foi passada por um funil de vidro com lã de vidro contendo pequena quantidade de sulfato de sódio anidro.

C) Solução de trabalho (1,6 mM): foi obtida com a diluição 1:50, em tampão Tris-EDTA (pH 8,0), no momento de uso.

5) Mipaflox:

A) Solução estoque (0,1 M): 180,0 mg de mipaflox foi diluído em 10,0 mL de tampão citrato (pH 6,0).

B) Solução de trabalho (2,0 mM): foi obtida com a diluição 1:50 em tampão Tris-EDTA (pH 8,0), no momento de uso.

Obs: As soluções estoques de mipaflox e paraoxon, se conservadas em geladeira (4 a 8°C), duram no mínimo 6 meses.

6) Fenilvalerato Dispersante:

A) Fenilvalerato (d=1,04 g/mL; PM=178,22; PE=101°C).

150,0 mg (0,144 mL) de fenilvalerato foi diluído com 10,0 mL de dimetilformamida (DMF).

B) Triton X-100:

0,3 mL de triton X-100 foi diluído com água até o volume de 1000 mL.

Misturou-se A e B na proporção de 1:30 no momento de uso.

7) 4-aminoantipirina (4-AAP) 0,02% e Dodecilsulfato de sódio (SDS) 5%:

0,02 g de 4-AAP

5,0 g de SDS

Tampão Tris-EDTA pH 8,0 qsp.....100,0 mL

8) Ferricianeto de Potássio $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,40%:

0,40 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi dissolvido em 100 mL de água destilada.

9) Solução de Azul Brilhante para determinação de proteínas:

100,0 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 foram dissolvidos em 50,0 mL de álcool etílico 95%. Foram acrescentados 100,0 mL de ácido fosfórico 85% e então diluiu-se para 1000,0 mL com água destilada.

10) Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (500 $\mu\text{g/mL}$):

5,0 mg de BSA foi dissolvido em 10,0 mL de água destilada já contendo 0,05 mg de azida sódica.

11) Solução salina 0,9%:

4,5 g de NaCl foi dissolvido em 500 mL de água.

12) Tampão fosfato (0,1 M de fosfato de sódio, pH 8,0 e pH 7,0):

1ª) Preparou-se 100 mL de uma solução 12,0 g/L de fosfato monobásico de sódio (0,1M) em H_2O .

-1,2 g fosfato monobásico de sódio;

H_2O qsp100 mL

2ª) Preparou-se 1000 mL de uma solução 14,2 g/L de fosfato dibásico de sódio em H_2O .

Pesou-se 14,2 g de fosfato dibásico de sódio;

H_2O qsp1000 mL

Misturou-se estas soluções na proporção de 55 partes da 1ª com 945 partes da 2ª para obter o tampão de pH 8,0; e na proporção de 39 partes da 1ª com 61 partes da 2ª para obter o tampão de pH 7,0.

pH 8,0: preparar 900 mL.

pH 7,0: preparar 100 mL.

Solução	900 mL Tampão pH 8,0	100 mL Tampão pH 7,0
Fosfato monobásico 12 g/L	49,5 mL	39 mL
Fosfato dibásico 14,2 g/L	850,5 mL	61 mL

13) Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB 10,3 mM):

- Pesar 0,082 g DTNB
- Tampão fosfato pH 7,0 qsp.....20 mL.

14) Acetilcolina (ATCh 10,7 mM):

- Pesar 0,031 g de ATCh
- Tampão fosfato pH 8,0 qsp.....10 mL.
- Preparou-se no momento da análise.

15) Metamidofós (20 mM):

Pesar 0,028 g de metamidofós

H₂O qsp10,0 mL.

16) Tampão PCD (calpaína) (20 mM tris; 5 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol):

2,42 g de tris

1,46 g de EDTA

0,70 mL de 2-mercaptoetanol (d = 1,115 g/mL)

HCl (6 N) qsp pH 7,5

H₂O qsp1000 mL.

17) Tampão caseína (0,5 mg/mL de caseína; 20 mM DTT; 50 mM tris; 4 mM CaCl₂):

0,05 g de caseína

0,309 g de ditionitrosol (DTT)

0,606 de tris

0,044 g de CaCl₂

HCl (6 N) qsp pH 7,5

H₂O qsp100 mL.

19) Gradientes de NaCl em tampão PCD:

a) 0,150 M:

Pesou-se 0,44 g de NaCl

Misturou-se com 50 mL de tampão PCD

b) 0,200 M:

Pesou-se 0,58 g de NaCl

Misturou-se com 50 mL de tampão PCD

OBSERVAÇÕES: Toda água utilizada no preparo das soluções foi obtida no equipamento mili-q e todas as soluções, exceto a de Triton X-100 e a de 4-AAP-SDS (temperatura ambiente), foram acondicionadas entre 4 e 8°C.

6.8 Coleta e preparo de amostras biológicas

Foi coletado 0,5 mL de sangue da veia axilar das aves em seringas de 1 mL contendo 0,1 mL de heparina (25.000 UI/5 mL) diluída 1/5 com solução salina 0,9%. Em seguida foi feita a separação do plasma utilizando centrífuga a 500 x g por 10 min. Para a dosagem da BChE foi necessária a diluição do plasma em água deionizada (70 µL de plasma em 9,930 mL de água). Para a dosagem da atividade da ESNp em linfócitos de galinhas foram coletados 2,5 mL de sangue da veia axilar das aves em seringas de 3 mL já contendo 0,1 mL de heparina (25.000 UI/5 mL) diluída 1/5 com solução salina 0,9%. Para a dosagem da atividade da AChE e da ESNp em cérebro de galinhas foi necessário sacrificar as aves por torção cervical seguida por decapitação. Em seguida retirou-se uma pequena quantidade (cerca de 0,4 g) de tecido da região frontal cerebral. Homogeneizou-se este tecido em tampão fosfato pH 8,0 para a AChE e em tampão tris-EDTA para a ESNp na proporção de 1 g de tecido para 20 mL de tampão. Para a dosagem da atividade da AChE nos eritrócitos humanos pegou-se 0,5 mL de sangue total e retirou-se o plasma (500 x g, 10 min). Em seguida, lavou-se duas vezes com 1,5 mL de solução salina utilizando o mesmo ciclo de centrifugação para a separação do plasma. Após, diluiu-se 1/600 em água o concentrado de eritrócitos para proceder as análises. Também foram necessários 2,5 mL de sangue para avaliar a atividade da ESNp nos linfócitos humanos como citado anteriormente para as galinhas. Para a dosagem das atividades enzimáticas em cultura de células SH-SY5Y neuroblastoma humano ressuspendeu-se as células em tampão PBS na concentração de 1×10^7 células/mL.

6.9 Experimentos

6.9.1 Experimentos *in vitro*

Para as determinações das atividades da BChE plasmática e da AChE no cérebro de galinhas, eritrócitos humanos e em cultura de células foi utilizado o método de Ellman et al. (1961). Adicionalmente, foram acrescidas, com mesmo volume de amostra, 6 diferentes concentrações de metamidofós e suas isoformas (de 0,5 mM a 16 mM em água) a fim de estimar a IC₅₀. Para determinação da atividade da ESNp nos linfócitos, cérebro de galinhas e em cultura de células foi utilizado o método de Correll e Ehrich (1991). Também, foram acrescidas, com mesmo volume de amostra, 6 diferentes concentrações de metamidofós e suas isoformas (de 0,1 mM a 15 mM em água) a fim de estimar a IC₅₀.

6.9.2 Experimentos *in vivo*

6.9.2.1 Delineamento experimental

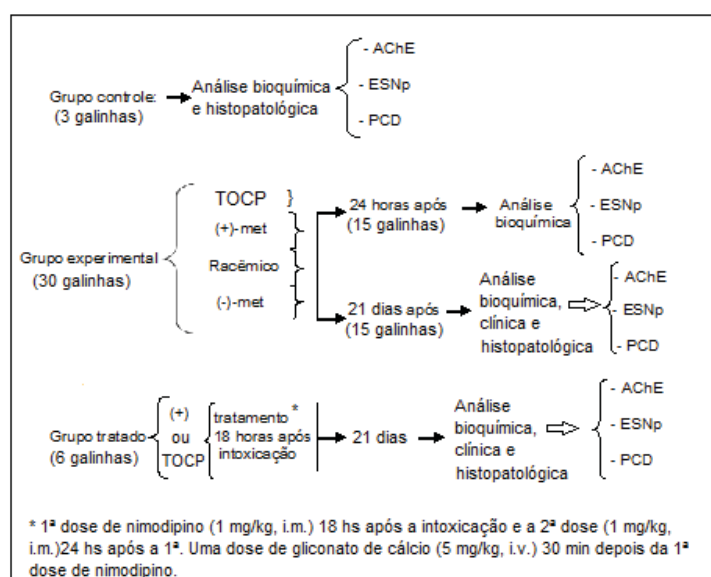
As aves foram divididas em diferentes grupos com “n” igual a 3. Estas receberam proteção contra os efeitos colinérgicos, (50 mg/kg i.m. de atropina) antes da administração do metamidofós e a mesma dose 4 e 8 horas após a intoxicação. Não foi necessário administrar atropina nas aves que receberam 500 mg/kg de TOCP.

Os grupos foram classificados da seguinte forma:

Grupo controle: Este grupo foi composto por três aves que não receberam o tóxico. Neste grupo foram padronizadas as atividades da AChE, da ESNp e da calpaína no cérebro das galinhas. A determinação desses parâmetros bioquímicos serviu para a comparação antes e após a administração dos OPs testados. Também foi realizada a análise histopatológica dos tecidos das aves para posterior comparação com os demais grupos.

Grupo experimental: Foram utilizadas 30 aves divididas em quatro grupos de seis. Vinte e quatro aves receberam 50 mg/kg de peso via oral de metamidofós nas seguintes formas: racêmica, (+)-metamidofós e (-)-metamidofós. As outras seis aves receberam 500 mg/kg de TOCP via oral que foi utilizado como controle positivo indutor de NRIOP. Vinte e quatro horas após a administração dos OPs, 15 aves foram sacrificadas para avaliação bioquímica. As outras 15 aves foram sacrificadas 21 dias após a intoxicação para a observação dos sinais clínicos, bioquímicos e histopatológicos.

Grupo tratado: Este grupo foi composto por três aves que receberam 50 mg/kg via oral da forma (+)-metamidofós, pois foi a que apresentou maior escore de neurotoxicidade. As outras três aves receberam 500 mg/kg via oral de TOCP. Além dos OPs, as galinhas receberam, 18 horas após a intoxicação, a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg, i.m.) foi dada 24 horas após a primeira. O delineamento experimental está resumido no esquema 1.



Esquema 1: Resumo do delineamento experimental.

6.9.3 Escala de neurotoxicidade (sinais clínicos)

Para observações dos sinais clínicos foi utilizada a escala de Oliveira, et al. (2002) para os escores de neurotoxicidade das galinhas em observações após a administração via oral dos OPs testados:

0 = galinha normal, desenvolve suas funções motoras normalmente.

1 = Apresenta leve fraqueza nas pernas. Leve flexão das pernas, mas ainda é capaz de manter-se de pé e andar.

2 = Fraqueza mais acentuada nas duas pernas. A ave apresenta dificuldade de se manter de pé e de se equilibrar para andar.

3 = Paralisia das pernas. As aves não conseguem se levantar e as pernas ficam esticadas, mas ela ainda consegue apoiar-se nas asas para ficar sentada. É necessário auxílio na alimentação das aves.

4 = A galinha permanece em decúbito lateral. A ave não consegue manter-se na posição ereta. Também é necessário auxílio na alimentação das aves. Na maioria das vezes quando a ave atinge este nível, ocorre o óbito.

6.9.4 Estudos histopatológicos

Para a realização da análise histopatológica, os seguintes tecidos foram cuidadosamente dissecados: medula espinhal nas porções cervical (entre C1 e C4) e lombar (próximo ao corpo de glicogênio), nervo ciático e por fim a porção inferior do cerebelo que atende pelo nome de amígdala caudal. Todas estas porções de tecidos estão ilustradas na Figura 8.

Imediatamente após serem dissecadas, estas peças foram transferidas para os cassetes individuais (Figura 9) contendo solução de formaldeído (fixador) a 10% em tampão PBS pH 7,2 por período de 3 dias. Após este período, o fixador foi

removido e adicionado álcool 70% por período de 24 horas, a seguir álcool a 90% por 2 horas e, finalmente, álcool absoluto por 24 horas para promover a desidratação das peças. Como clareador foi empregado solução xilol/álcool na proporção de (1/1) por 4 horas. Após inclusão em parafina, foram feitos os cortes em micrótomo rotativo com espessura de 6 µm. Os cortes recém produzidos foram transferidos para banho-maria a 40°C por período de 1 min para promover a dilatação da peça e facilitar a coloração. Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro devidamente rotuladas e posteriormente coradas por hematoxilina e eosina (H&E). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR-UNESP).



Figura 8: Cortes de tecidos de aves dissecados para avaliação de lesões histopatológicas causadas por OP neuropáticos. A) Porção cervical da medula espinhal (cabeça de seta) e amígdala caudal (seta). B) Porção lombar da medula espinhal na altura do corpo de glicogênio (cabeça de seta). C) Nervo ciático.



Figura 9: Peças dissecadas colocadas em cassetes individuais.

6.10 Dosagem de Proteínas

Foram feitas três curvas analíticas de proteínas em três tampões diferentes com a solução de BSA (a partir de uma solução estoque de 500 µg/mL), para posterior comparação com os resultados obtidos com as amostras. Para a preparação das curvas de dosagem de proteínas procedeu-se como descrito por Bradford (1976). A Tabela 1 mostra a composição dos reagentes de cada ponto da curva.

Tabela 1. Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína.

Ponto da curva	BSA (500 µg/mL)	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	100 µL	4,9 mL
1	10 µL (5 µg)	90 µL	4,9 mL
2	20 µL (10 µg)	80 µL	4,9 mL
3	50 µL (25 µg)	50 µL	4,9 mL
4	80 µL (40 µg)	20 µL	4,9 mL
5	100 µL (50 µg)	0	4,9 mL

A leitura foi feita em triplicata no espectrofotômetro UV/VIS a 595 nm após 5 min de reação. Para dosagem de proteínas nas amostras utilizou-se o esquema descrito pela Tabela 2.

Tabela 2. Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína.

	BSA (500 µg/mL)	Amostra	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	-----	100 µL	4,9 mL
Padrão	40 µL	-----	60 µL	4,9 mL
Amostra	-----	40 µL	60 µL	4,9 mL

Tampões utilizados: ESNp – Tampão tris-EDTA pH 8,0
 Colinesterases – Tampão fosfato pH 8,0
 PCD - Tampão PCD

A leitura foi feita em duplicata no espectrofotômetro a 595 nm após 5 min de reação.

6.11 Procedimento para determinação da atividade da AChE e BChE

As dosagens da BChE e da AChE foram feitas como descrito por Ellman et al. (1961) com algumas modificações. Foi necessário dosear a quantidade de proteína no plasma, cérebro, cultura de células e nos eritrócitos para que a atividade fosse dada por grama de proteína. A avaliação da atividade enzimática foi feita após o doseamento das proteínas como descrito na Tabela 3:

Tabela 3. Esquema para doseamento da atividade das ChE.

Reagente	Volume de Reagente		
	IC ₅₀	ChE	Branco
Tampão fosfato pH 8,0	1650 µL	1875 µL	1875 µL
DTNB	75 µL	75 µL	75 µL
Amostra	225 µL	225 µL	-----
H ₂ O	-----	-----	225 µL
Inibidor	225 µL	-----	-----
ATCh	225 µL	225 µL	225 µL
Volume Total	2400 µL	2400 µL	2400 µL

Obs: Para determinação da IC₅₀ foi adicionado 225 µL do inibidor (6 concentrações diferentes em água) que ficou 15 min em contato com a amostra a 37°C e agitação a 600 rpm antes de começar as leituras. Após a adição da ATCh iniciou-se o programa cinético do espectrofotômetro com 4 leituras a 450 nm iniciando-se em 5 s e com intervalos de 1 min entre cada leitura, temperatura 37°C e agitação constante de 600 rpm.

6.12 Cálculo da Atividade das colinesterases

As leituras das amostras foram feitas em triplicata e a média de cada amostra foi dada em Abs/min. Para converter a atividade das colinesterases para $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ foi feito como descrito pela equação 5:

$$\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mL} = \frac{A.V_{tr}.10^6.1}{\varepsilon.V_a.T} \quad (5)$$

Sendo que,

A = absorbância/min

ε = coeficiente de extinção molar

V_{TR} = volume total da reação (mL)

V_a = volume de amostra (mL)

T = Tempo de reação (minuto)

10^6 = fator de transformação de mol para μmol

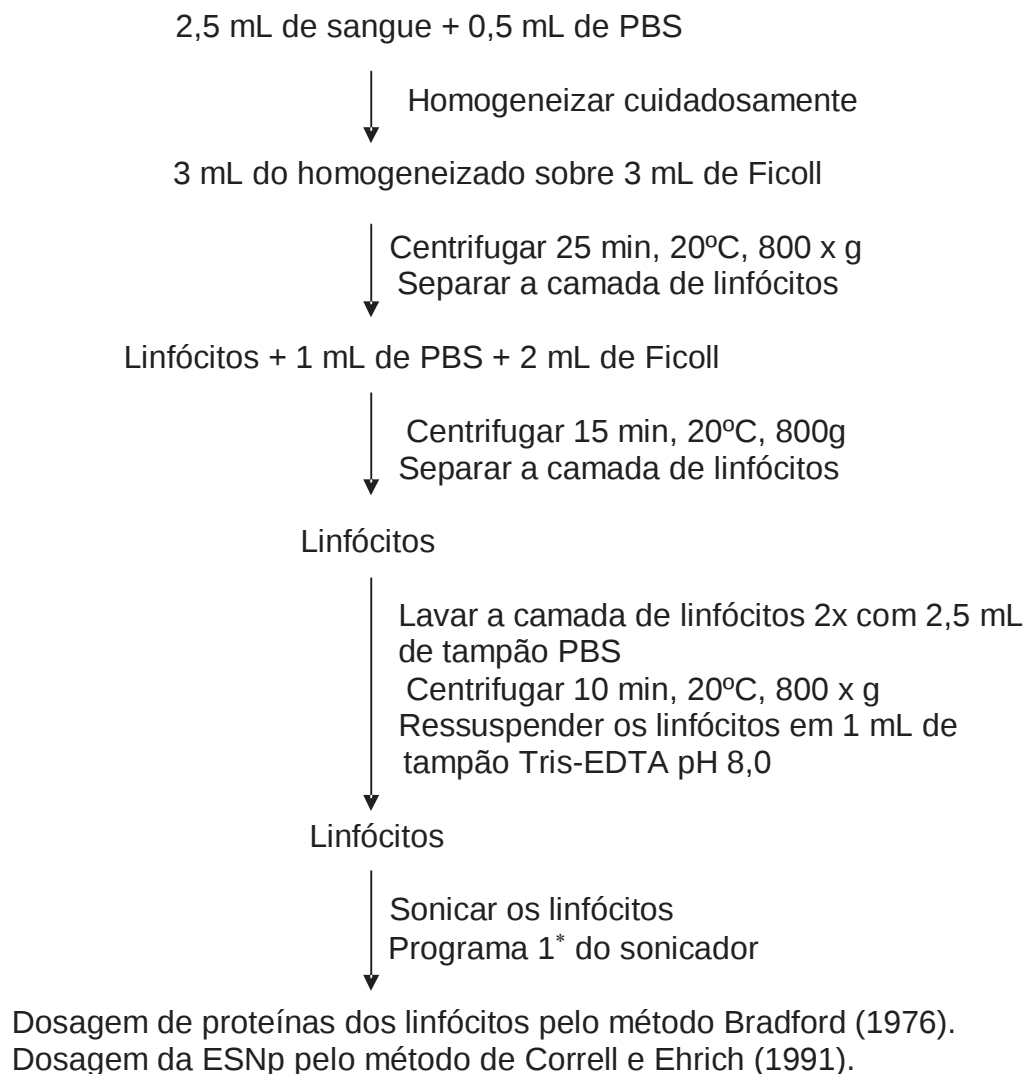
1 = 1 cm de passo óptico

Dividindo o resultado da equação 5 pela concentração de proteínas da amostra em g/mL, pode-se obter a atividade da enzima em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteínas.

6.13 Separação de Linfócitos

6.13.1 Sangue de galinhas

A separação dos linfócitos a partir do sangue total de galinhas foi feita como mostrado no esquema a seguir:



* Programa 1 do sonicador: Temp. 20°C, amplitude 20%, tempo 8 s., pulso 3,0 s. com pausas de 0,5 s.

6.13.2 Sangue humano

A separação dos linfócitos a partir do sangue total humano foi feita como mostrado no esquema a seguir:

2,5 mL de sangue + 0,5 mL de PBS



Homogeneizar cuidadosamente

3 mL do homogeneizado sobre 3 mL de Ficoll



Centrifugar 15 min, 20°C, 500 x g
Separar a camada de linfócitos

Linfócitos



Lavar a camada de linfócitos 2x com 2,5 mL
de tampão PBS
Centrifugar 20 min, 20°C, 3000 x g
Ressuspender os linfócitos em 1 mL de tampão
Tris-EDTA pH 8,0

Linfócitos



Sonicar os linfócitos
Programa 1* do sonicador

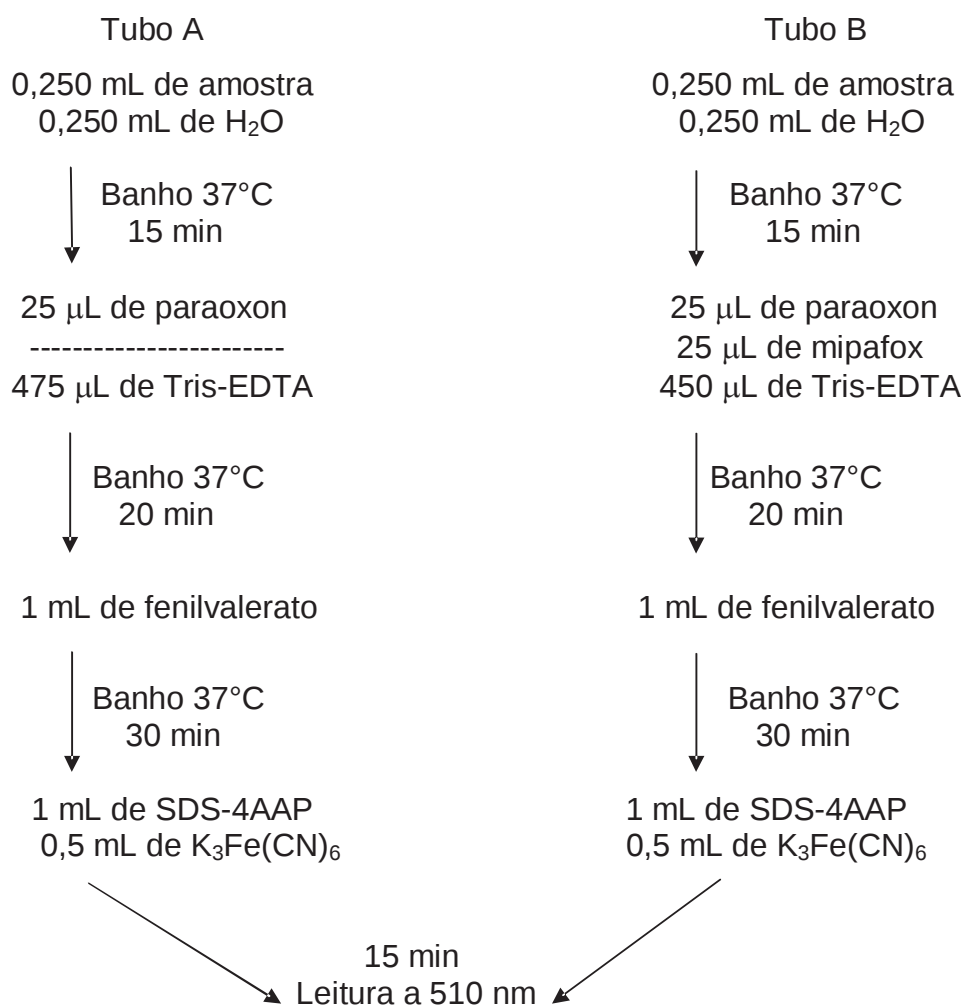
Dosagem de proteínas dos linfócitos pelo método Bradford (1976).

Dosagem da ESNp pelo método de Correll e Ehrich (1991).

Programa 1 do sonicador: Temp. 20°C, amplitude 20%, tempo 8 s., pulso 3,0 s. com pausas de 0,5 s.

6.14 Dosagem da atividade da ESNp

A partir dos resultados obtidos na dosagem de proteínas dos linfócitos ou de cérebro de galinhas foi feita diluição com tampão Tris-EDTA para a obtenção de solução com 500 µg/mL de proteínas. Desta solução foi tomado 0,250 mL e procedeu-se como mostrado a seguir:



Paraoxon : diluir na hora 1:50 (980 µL do tampão tris-EDTA + 20 µL de paraoxon estoque)

Mipafox : diluir na hora 1:50 (490 µL do tampão tris-EDTA + 10 µL de mipafox estoque)

Fenilvalerato: diluir na hora 1:30 (29 mL de triton X-100 + 1 mL de fenilvalerato)

Obs: Para determinação da IC₅₀ foi adicionado diferentes concentrações das soluções dos inibidores no lugar da água.

6.15 Cálculo da atividade da ESNp

Para o cálculo da atividade da ESNp o coeficiente de extinção molar da reação de fenol mais ferricianeto de potássio é $13.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este valor foi utilizado na fórmula geral de Kaplan e Pesce (1989) para o cálculo da atividade dessa enzima, obtendo assim a atividade média da ESNp em (UI/L) para cada ave, através da equação 6:

$$UI / L = \frac{A.V_{tr}.10^6.1}{\varepsilon.V_a.T} \quad (6)$$

Sendo que:

A = absorbância

ε = coeficiente de extinção molar

V_{TR} = volume total da reação (mL)

V_a = volume de amostra (mL)

T = Tempo de reação (minuto)

10^6 = fator de transformação de mol para μmol

1 = 1 cm de passo óptico

6.15.1 Exemplo de cálculo da atividade da ESNp:

Quantidade de proteína: 500 $\mu\text{g/mL}$

Medidas de Absorbância a 510 nm:

A1: 0,1964 $\Delta 1$: 0,0439 A2: 0,1907 $\Delta 2$: 0,0404 $\Delta\text{Média}=0,0423$

B1: 0,1525 B2: 0,1503

UI/L = 0,7075 $\mu\text{mol/min/litro}$ = 0,0007075 $\mu\text{mol/min/125 } \mu\text{g de proteína}$.

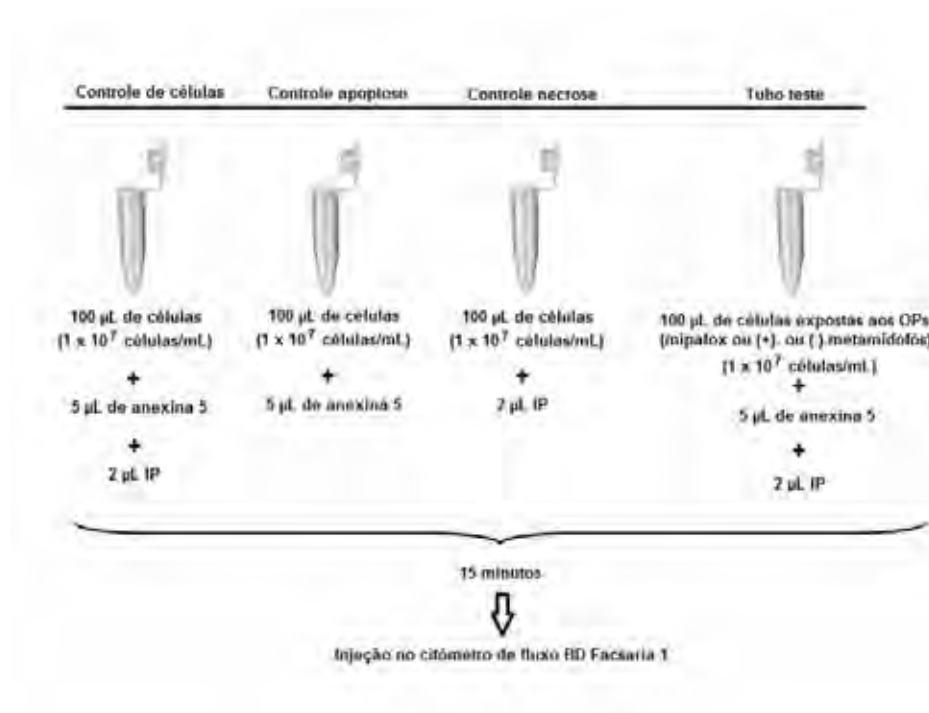
0,0007075 $\mu\text{mol/min}$ _____ 500 $\mu\text{g de proteína}$

X _____ $10^6 \mu\text{g de proteína (1g)}$.

X = 1,42 $\mu\text{mol/min/g de proteína}$ = atividade da ESNp em g de proteína.

6.15 Citometria de fluxo

Toda a parte de citometria de fluxo foi realizada no *Laboratory for Neurotoxicity Studies* (Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, VA, USA) sob a supervisão da profa. Marion Ehrich. A apoptose nas células da linhagem SH-SY5Y neuroblastoma humano foi avaliada utilizando o reagente protéico anexina V (*Pacific blue conjugate*, Invitrogen, Oregon, USA). As células foram expostas por 60 minutos ao mipafox (0,01 mM), (+)-metamidofós (10 mM) e (-)-metamidofós (100 mM) a 37°C e 5% de CO₂. Estas concentrações foram escolhidas baseada na atividade da ESNp, com medidas que causassem pelo menos 80% de inibição (requisito para causar a NRIOP). Iodeto de propídio (IP), diluído 1/50 em tampão PBS, foi usado para diferenciar células apoptóticas com membranas íntegras (anexina⁺/IP⁻) de células necróticas que perderam a integridade da membrana (anexina⁺/IP⁺). O ensaio seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante do equipamento como se segue:

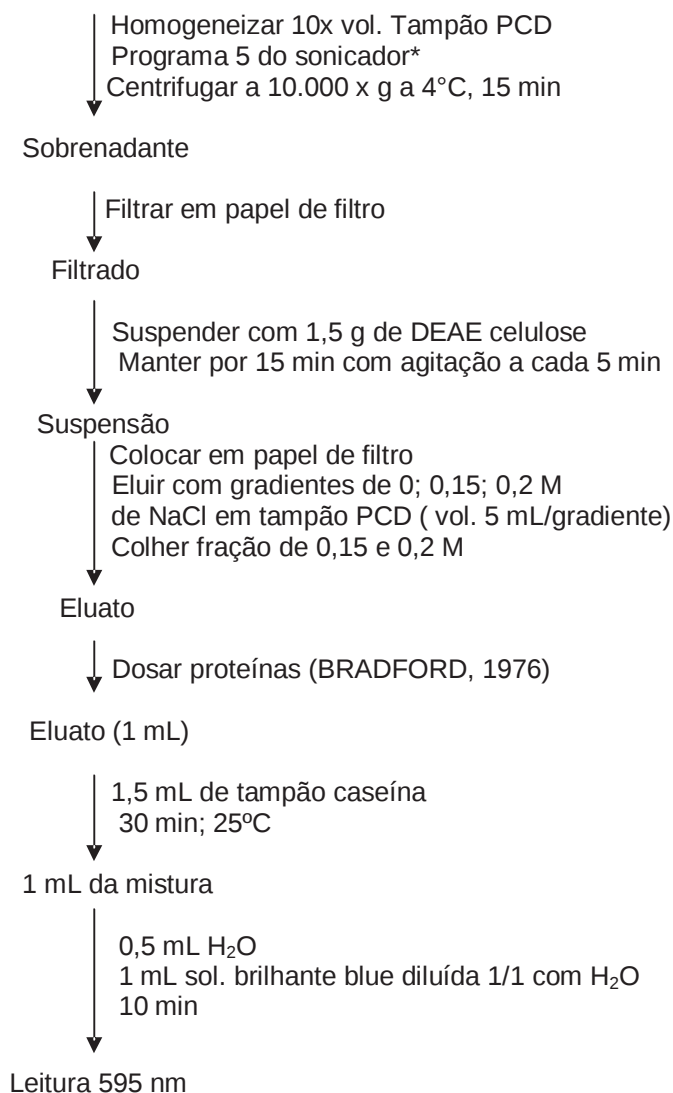


Esquema 2: Protocolo para realização da citometria de fluxo.

6.16 Dosagem da atividade da calpaína

A purificação da calpaína foi feita como descrito por Ballard et al. (1988) e a dosagem da atividade da calpaína foi feita como descrito por Buroker-Kilgore e Wang (1993):

1,0g de tecido (cérebro de galinhas) ou 1 mL de células (1×10^7 células/mL)**



A unidade adotada para expressar os valores desta enzima foi unidades de absorbância/minuto/g de proteína (EL-FAWALL et al., 1990).

* Programa 5: Amplitude 80%; Tempo 30s pulso 1,0s com pausas de 0,2s; Temperatura 4°C.

** Para avaliar in vitro a ativação da PCD promovida pelos OPs testados foi necessário pré-incubação por 60 min à 37°C dos tecidos homogeneizados com CaCl₂ + OP na seguinte proporção: 1 g de tecido ou 1 mL de células/1 mL de CaCl₂/1 mL do OP testado.

6.17 Análise estatística dos resultados

A IC₅₀ das enzimas foi calculada utilizando a equação da reta do log da % da atividade *versus* concentração de inibidor e o coeficiente de regressão destas retas foi calculado utilizando o método dos quadrados mínimos. Alterações nos parâmetros bioquímicos entre os diferentes grupos foram examinadas para significância estatística usando ANOVA (*Analysis Of Variance*) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Para a realização deste teste foi utilizado o programa *Microsoft Office® Excel 2007 for Windows*. Diferenças entre os grupos para avaliação clínica dos animais foram avaliadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para múltiplas comparações. Para a realização destes testes não paramétricos foi utilizado o programa Bioestat 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (ARANGO, 2001).

7. RESULTADOS

7.1 Desenvolvimento do método de separação cromatográfica

De acordo com os parâmetros cromatográficos mostrados na Tabela 4, a coluna composta pela fase estacionária *tris*-(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose apresentou melhor resolução para a separação dos enantiômeros do metamidofós, portanto, a separação semipreparativa enantiosseletiva foi padronizada utilizando esta fase estacionária. As primeiras análises das condições cromatográficas para a separação dos enantiômeros do metamidofós foram feitas utilizando coluna analítica (15 x 0,46 cm). Foi verificado também que seria melhor diluir a amostra em etanol e não em isopropanol, pois o metamidofós apresentou melhor solubilidade no primeiro solvente. As Figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram os cromatogramas obtidos na coluna analítica. A Figura 10 mostra que com fase móvel composta de hexano:isopropanol (90:10) a resolução obtida entre as bandas cromatográficas dos isômeros não foi a ideal pois não alcançou a linha de base.

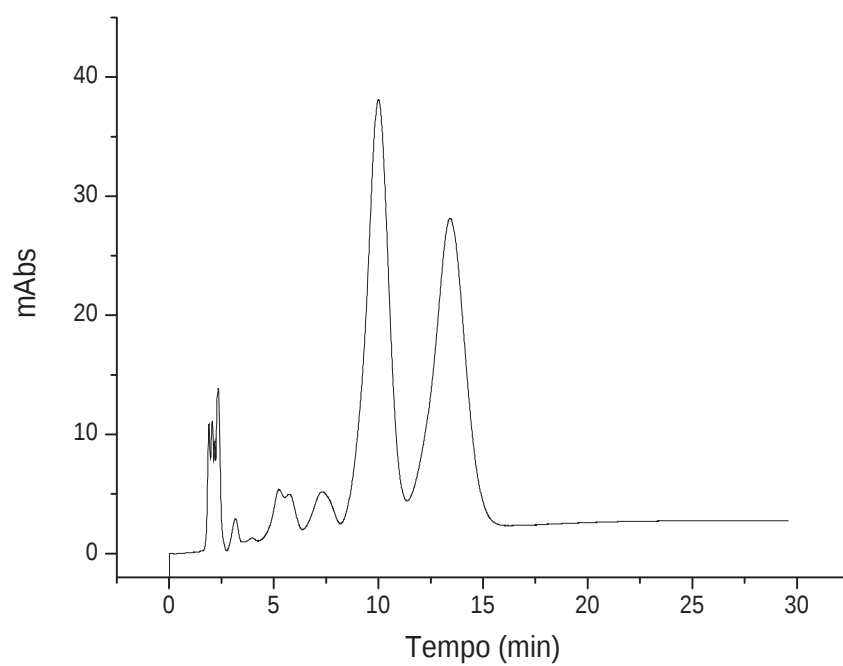


Figura 10: Cromatograma da análise do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna quiral Chiralcel OD[®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm, fase móvel: hexano/isopropanol (90/10, v/v), vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos avaliados na separação quiral analítica do metamidofós.

Fase Móvel	FEQ 1			FEQ 2			FEQ 3			FEQ 4		
	K ₁	α	Rs	K ₁	α	Rs	K ₁	α	Rs	K ₁	α	Rs
Heptano/Etanol (90:10)	-	-	-	-	-	-	2,55	1	0	-	-	-
Hexano/Etanol (80:20)	7,20	1,12	0,80	2,11	1	0	2,40	1	0	3,03	1,23	1,00
Hexano/Etanol (90:10)	2,30	1,21	0,80	3,29	1	0	5,43	1,09	0,80	7,60	1,24	1,00
Heptano/2-Propanol (90:10)	-	-	-	4,14	1,31	0,80	3,78	1,21	0,80	6,19	1,35	1,00
Hexano/2-Propanol (95:05)	-	-	-	21,79	1,00	1,00	30,00	1,16	1,51	retido em 60 min		
Hexano/2-Propanol (92:08)	-	-	-	8,89	1,00	1,00	10,59	1,15	1,25	6,40	1,38	1,56
Hexano/2-Propanol (90:10)	retido em 60 min			2,24	1	0,80	3,36	1,22	1,00	4,92	1,23	1,25
Hexano/2-Propanol (80:20)	6,80	1,20	0,80	-	-	-	1,25	1,23	0,80	-	-	-
Hexano/2-Propanol (70:30)	4,00	1,24	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexano/2-Propanol/Etanol (85:5:10)	4,10	1,16	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexano/2-Propanol/Ácido Acético (90:09:01)	-	-	-	-	-	-	3,86	1,33	1,13	3,94	1,27	1,25
Metanol	0	1	0	-	-	-	0	1	0	0	1	0
Etanol	2,81	1	0	-	-	-	2,11	1	0	3,01	1	0
2-Propanol	2,91	1	0	-	-	-	2,31	1	0	3,23	1	0
Metanol/água (50:50)	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol/água (30:70)	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Fases não testadas.

Condições cromatográficas destas análises: Dimensões das colunas 15 x 0,46 cm, UV 230 nm, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL, metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol.

FEQ = fase estacionária quiral (ver descrição das colunas na seção 6.3, pag. 47).

K₁= fator de retenção do primeiro enantiômero; α= fator de separação; Rs= resolução.

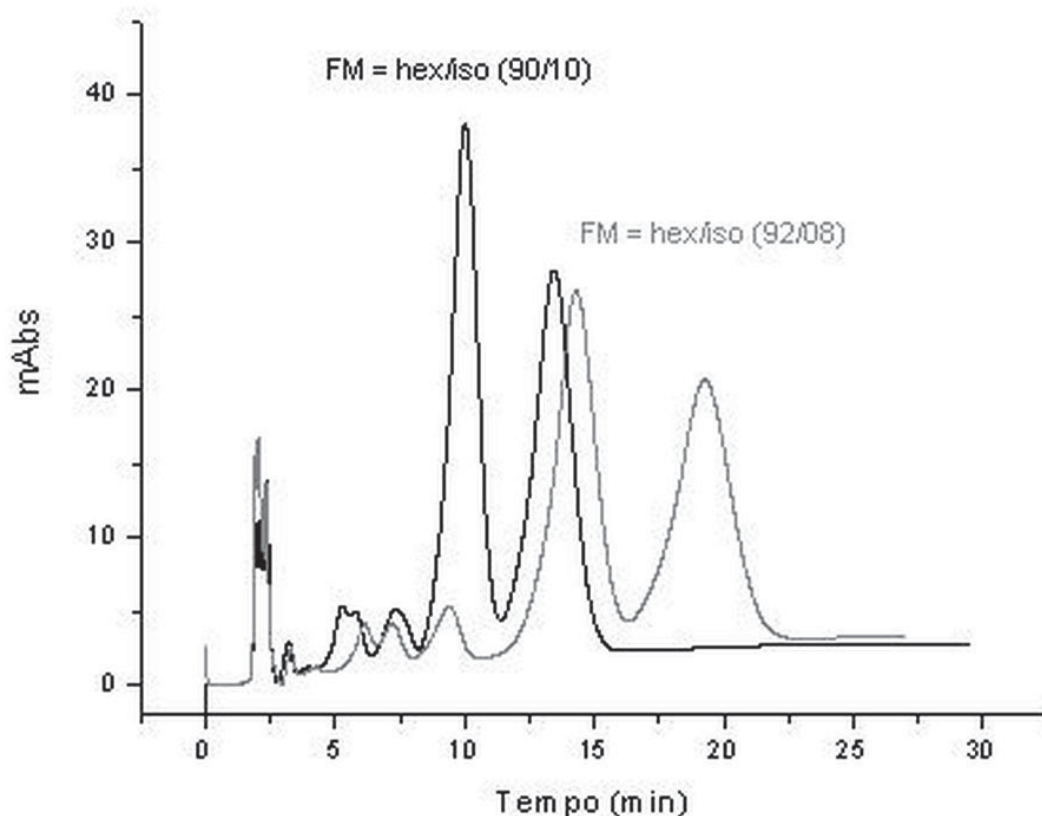


Figura 11: Cromatograma da análise do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna quiral Chiralcel OD[®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL. Fases móveis: hexano/isopropanol (90/10) em preto e hexano/isopropanol (92/08) em cinza.

Desta forma, nova composição de solvente foi avaliada e na Figura 11 pode-se evidenciar que houve melhora na resolução entre as bandas cromatográficas dos enantiômeros do metamidofós reduzindo-se a proporção de isopropanol para 8%, porém com aumento no tempo de retenção dos dois isômeros, sendo de 14,3 minutos para o primeiro e de 19,3 minutos para o segundo enantiômero. Foi testada também várias proporções de hexano:isopropanol em várias fases estacionárias

mostradas na Tabela 4. A Figura 12 ilustra estas tentativas e mostra quando se reduziu muito a quantidade de isopropanol aumentou muito o tempo de retenção.

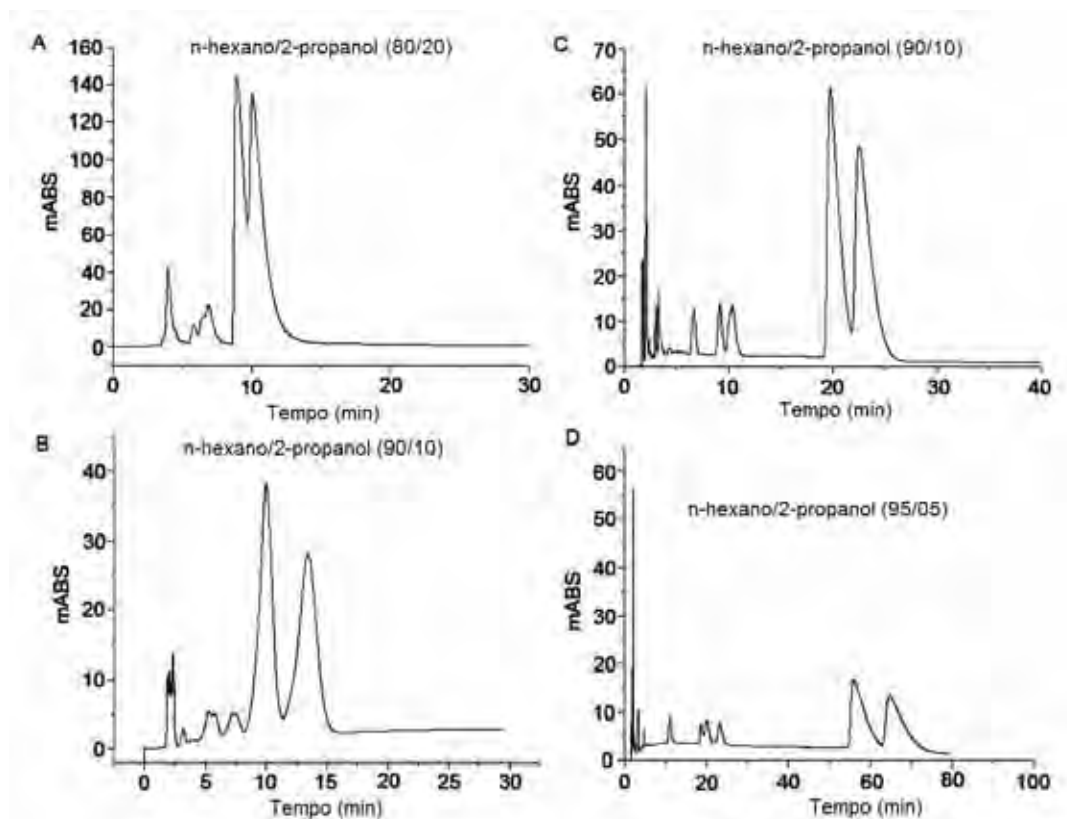


Figura 12: Efeito da proporção de isopropanol na resolução dos enantiômeros do metamidofós (metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna (15 x 0,46 cm) de tris(3,5-dimetilfenil carbamato de celulose) revestidas de sílica (APS)-Hypersil (120 Å, 5 µm, 15%, p/p) para A, C e D e coluna Chiralcel OD® (15 x 0,46 cm) (FEQ 4) para B, UV 230 nm, , vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL.

Assim, foi testada também a substituição do modificador orgânico, onde isopropanol foi substituído pelo etanol, com o objetivo de melhorar a resolução entre os dois isômeros sem que houvesse aumento no tempo de retenção. Porém, foi verificado (Figura 13) que o emprego de etanol, nas proporções de 5 e 10%, também não favoreceu a melhora da separação entre os dois isômeros. Da mesma forma,

também foram avaliados os efeitos do uso de heptano. Os dados obtidos estão ilustrados nas Figuras 13 e 14.

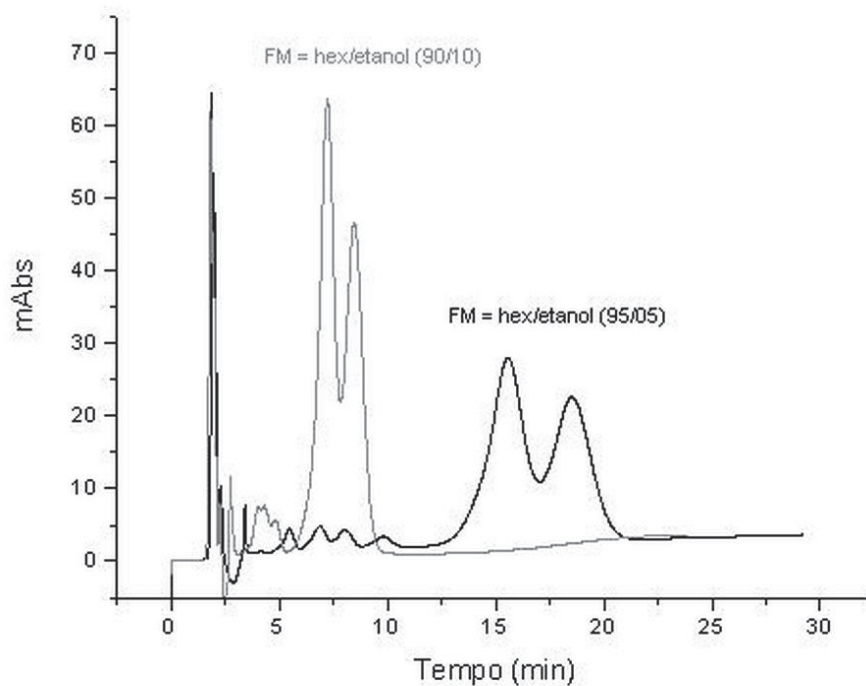


Figura 13: Efeito da proporção de etanol na resolução dos enantiômeros do metamidofós (6,67 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (15 x 0,46 cm) (FEQ 4), detector UV 230 nm. Fases móveis: hexano:etanol (90:10) em cinza e hexano:etanol (95:05) em preto, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 µL

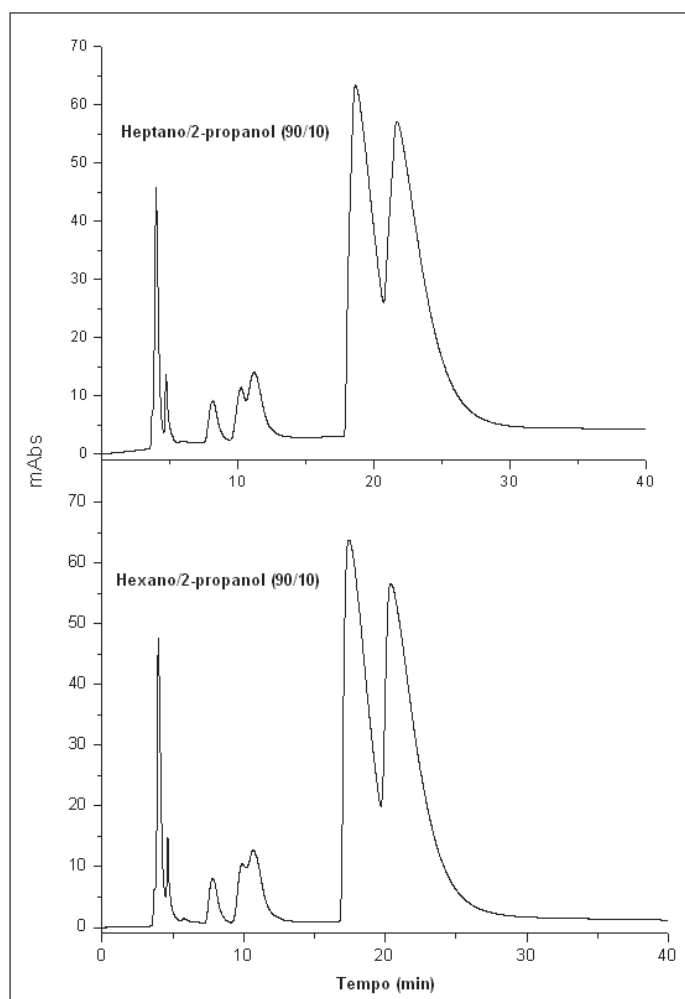


Figura 14: Efeito da substituição do hexano pelo heptano na separação do metamidofós. Condições cromatográficas: Coluna *tris*-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose em sílica APS-Nucleosil (15 x 0,46 cm, 20 μ m) (FEQ 2), UV 230 nm, vazão = 1 mL/min, volume de injeção = 20 μ L, metamidofós = 6,67 mg/mL em etanol.

As Figuras 10, 11, 12, 13 e 14 evidenciaram que a melhor fase móvel para a separação quiral do metamidofós foi composta por hexano e isopropanol. Foi feita também a substituição do isopropanol pelo etanol, mas não houve melhoria na separação (Figura 13). Observando as Figuras 10, 11 e 12 pode-se dizer que a melhor resolução obtida na FEQ 4 analítica foi com a fase móvel de hexano:isopropanol (95:05), porém como o tempo de retenção aumentou muito em

relação à fase móvel composta por hexano:isopropanol (92:08) (Figura 11), esta última foi escolhida para os testes iniciais com a coluna semipreparativa com a mesma fase estacionária, porém nas dimensões da coluna de 20 x 0,7 cm (FEQ 5).

As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 mostram as análises com a coluna semipreparativa. Inicialmente foi feito um escalonamento para estimar qual seria a vazão do sistema preparativo, uma vez que a vazão do sistema analítico foi de 1 mL/min. A vazão foi estimada segundo a equação 8 em 3 mL/min:

$$X = \frac{L_B \cdot (DI)_B^2}{L_A \cdot (DI)_A^2} \quad (8)$$

Sendo que:

X= vazão no sistema preparativo

L_B= Comprimento da coluna preparativa

(DI)_B= Diâmetro interno da coluna preparativa

L_A= Comprimento da coluna analítica

(DI)_A= Diâmetro interno da coluna analítica.

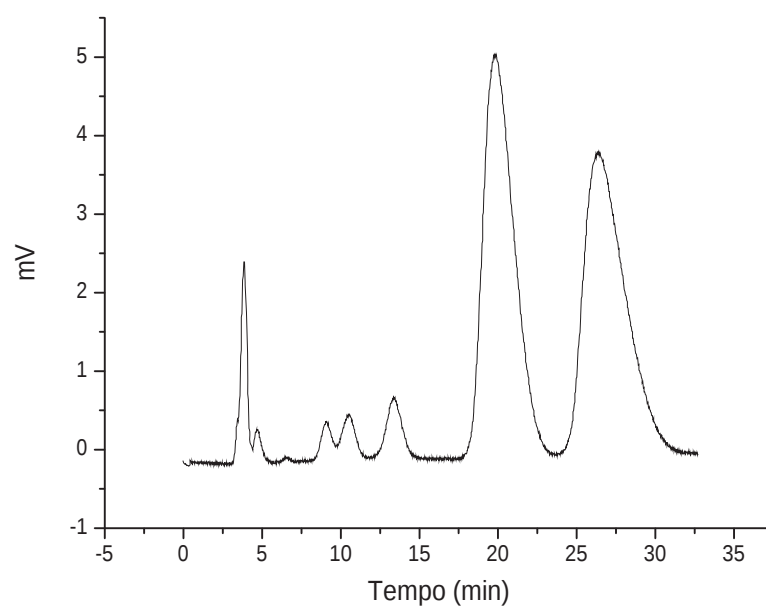


Figura 15: Cromatograma da separação do metamidofós (25 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: Coluna (FEQ 5) Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (20 μ m), UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (92:08 v/v), vazão = 3 mL/min, volume de injeção de 50 μ L.

A Figura 15 evidencia que a resolução obtida com estas condições cromatográficas foi melhor do que as condições cromatográficas obtidas com a coluna analítica. Entretanto, mesmo os enantiômeros estando com bons fatores de separação, havia ainda a necessidade de testar outras fases móveis com maior proporção de isopropanol para reduzir o tempo de retenção dos enantiômeros e consequentemente o tempo de análise. A Figura 16 ilustra estas injeções.

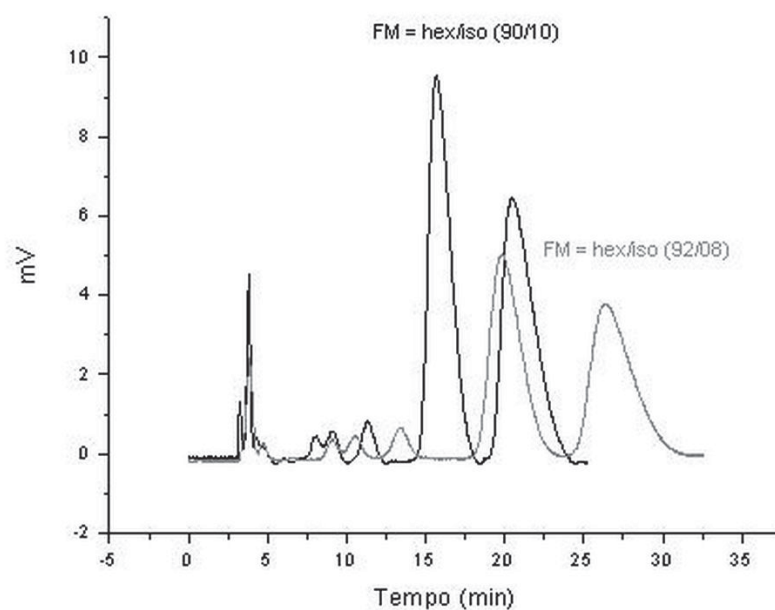


Figura 16: Cromatogramas do metamidofós (metamidofós = 25 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: Coluna (FEQ 5) Chiralcel OD (20 x 0,7 cm) (20 μ m), UV 230 nm, vazão = 3 mL/min. Fases móveis: hexano:isopropanol (90:10) em preto e hexano:isopropanol (92:08) em cinza. Volume de injeção = 50 μ L.

De acordo com a Figura 16 pode-se observar que com 10% de isopropanol foi obtida boa resolução entre as bandas cromatográficas dos enantiômeros do metamidofós e em menor tempo de análise. Desta forma, ficou estabelecido que as coletas fossem feitas com a fase móvel contendo hexano:isopropanol (90:10). Na sequência, foi necessário verificar quanto de massa de metamidofós a coluna seria capaz de separar em uma mesma injeção. Assim, foram feitas várias injeções a fim de observar o efeito da concentração do metamidofós em etanol na separação obtida para os enantiômeros.

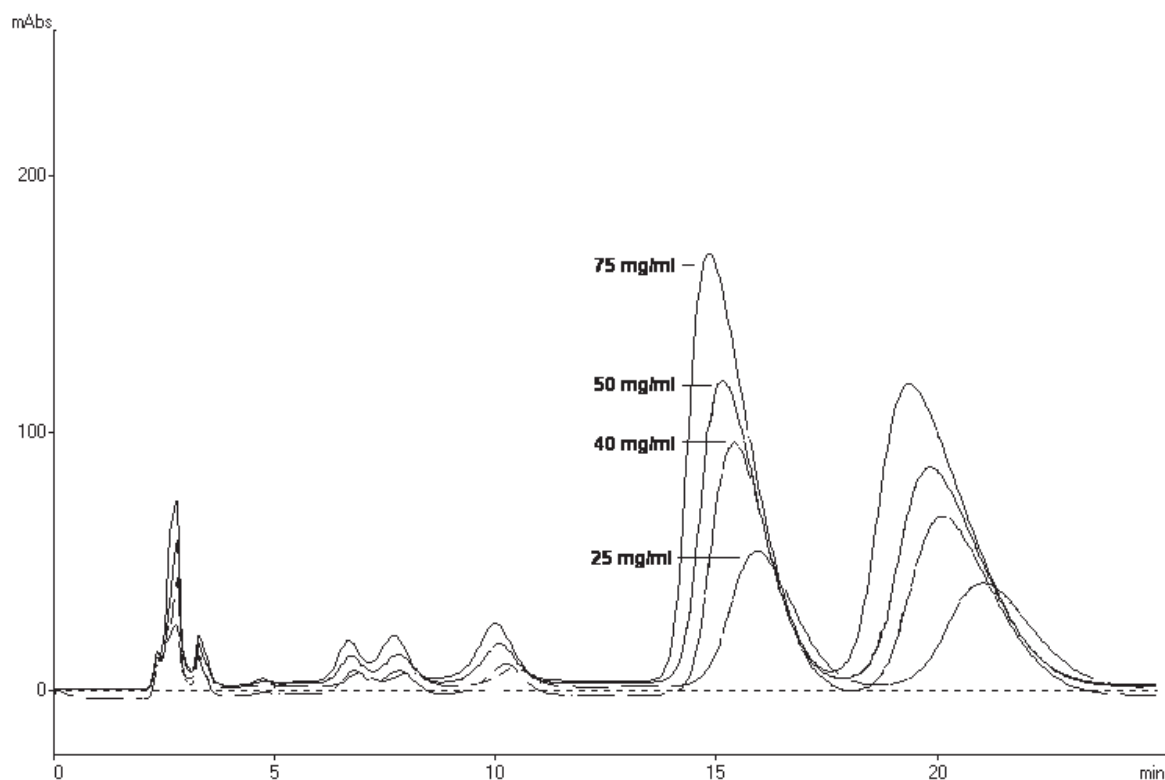


Figura 17: Cromatograma ilustrando o efeito da concentração de metamidofós na enantiosseparação obtida. Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (20 μ m), UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 μ L.

A Figura 16 mostra que a coluna testada conseguiu boa resolução nestas condições experimentais com concentração máxima de 75 mg/mL de metamidofós em etanol. Desta forma, se estabeleceu a concentração para ser utilizada nas coletas. Foi verificado também qual seria o volume máximo de injeção para que a coluna semipreparativa mantivesse a resolução obtida. Assim, poder-se-ia obter um rendimento alto na separação preparativa, já que o objetivo deste trabalho é avaliar a neurotoxicidade destes enantiômeros em galinhas, o que se torna necessário elevada quantidade destes isômeros isolados.

A Figura 18 mostra os cromatogramas em que foram feitas tentativas de separação com volume de injeção de 200 e 100 μL , respectivamente.

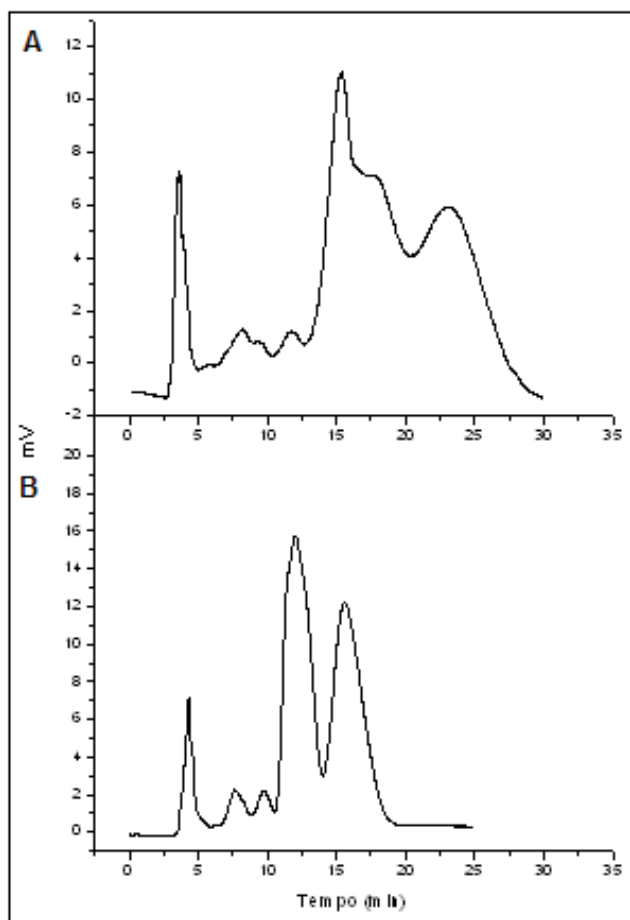


Figura 18: Efeito do volume de injeção na separação do metamidofós (75 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm), 20 μm , detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção de A = 200 μL e de B = 100 μL .

A Figura 18 evidencia que a coluna utilizada não conseguiu manter, com os volumes de injeção de 100 e 200 μL , a resolução previamente obtida com o volume de injeção de 50 μL .

Com todas as condições cromatográficas estabelecidas, iniciaram-se as coletas para que fosse verificada a estabilidade dos isômeros separados. Foram feitas algumas coletas e em seguida procedeu-se a injeção no cromatógrafo líquido. Também, foi feita a leitura de uma solução dos enantiômeros isolados em etanol no polarímetro para verificar a rotação específica do primeiro e segundo enantiômero coletados. A Tabela 5 mostra que o primeiro enantiômero eluído é aquele que desvia a luz do plano polarizado para a direita e o segundo para a esquerda.

A Figura 19 ilustra o cromatograma padronizado para realização das análises semipreparativas, com as respectivas marcas indicando os pontos em que foram feitas as coletas dos enantiômeros e as Figuras 20, 21 e 22 ilustram os cromatogramas obtidos no sistema analítico após a realização das coletas feitas no sistema semipreparativo.

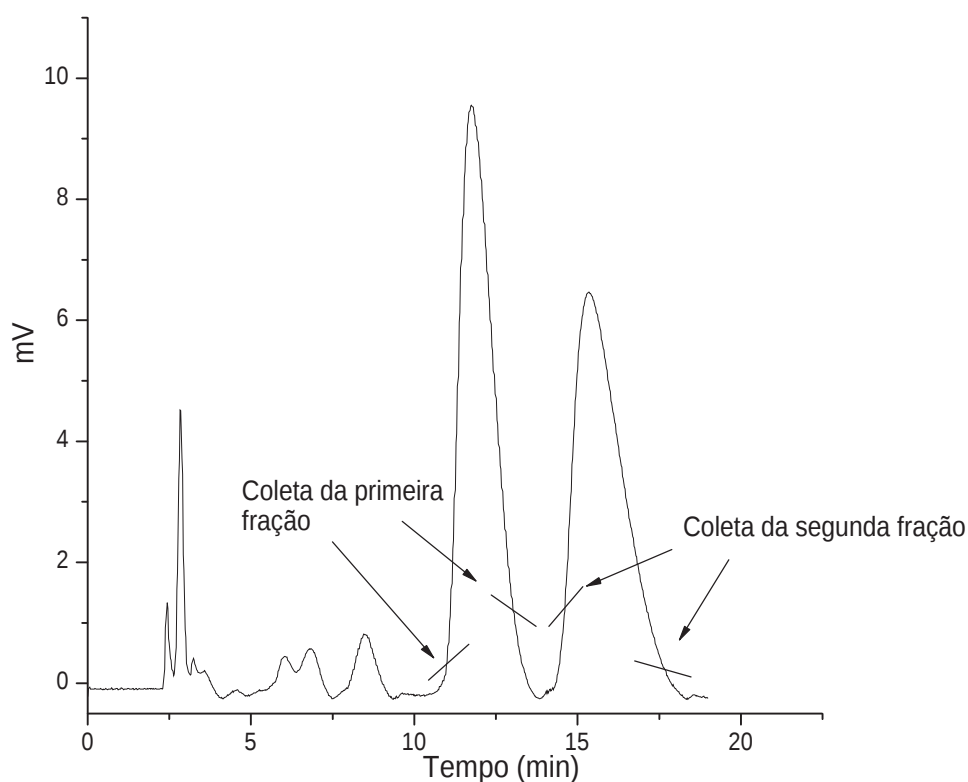


Figura 19: Cromatograma da separação enantiomérica do metamidofós (75 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm), 20 µm, detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.

Foram realizadas 560 coletas no sistema preparativo com recuperação aproximada de 89% para o (+)-metamidofós e de 92% para o (-)-metamidofós. Por outro lado, a forma positiva obteve maior grau de pureza quiral, como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Características das frações coletadas no sistema preparativo.

	(+)-metamidofós	(-)-metamidofós
Massa injetada	992,0	992,0
Massa obtida (mg)	884,0	916,0
Pureza enantiomérica (%)	99,5	98,3
Recuperação (%)	89,0	92,0
$[\alpha]_D$, etanol	+45,6	-47,8
Rendimento (mg/h)	7,3	5,6

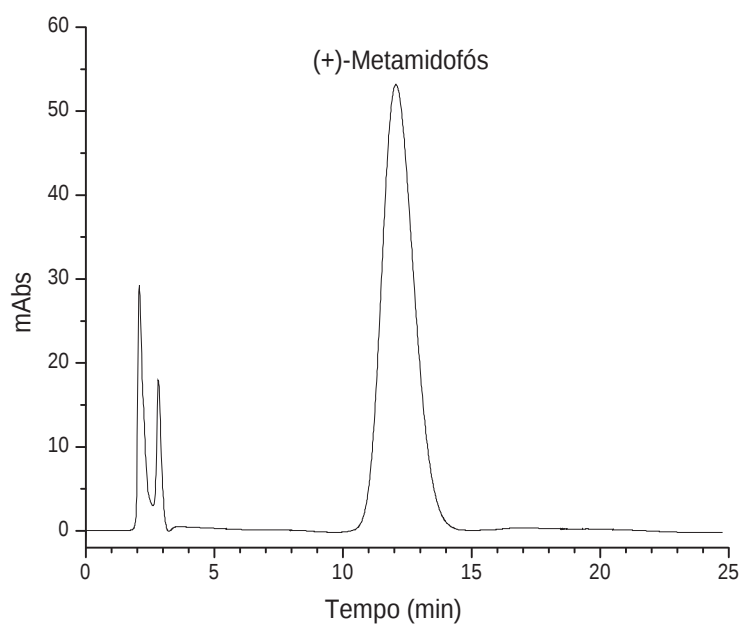


Figura 20: Cromatograma da primeira fração coletada da separação enantiomérica do metamidofós (10 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 μ m, detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 μ L.

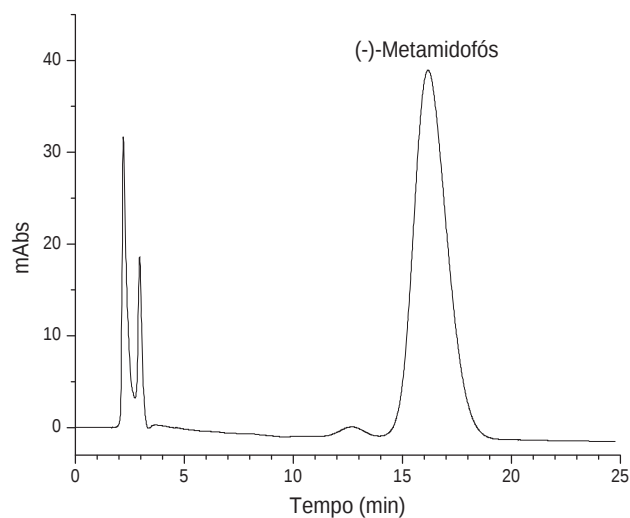


Figura 21: Cromatograma da segunda fração coletada da separação enantiomérica do metamidofós (10 mg/mL em etanol). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 µm, detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.

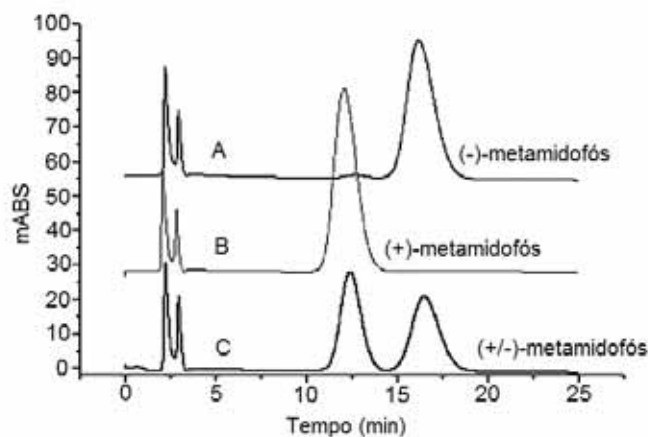


Figura 22: Cromatograma das frações coletadas dos enantiômeros do metamidofós (10 mg/mL em etanol). B = (+)-metamidofós (1^a fração). A = (-)-metamidofós (2^a fração). C = (+/-)-metamidofós (mistura da 1^a e 2^a frações 1:1 v/v). Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD[®] (20 x 0,7 cm) (FEQ 5), 20 µm, detector UV 230 nm, fase móvel: hexano:isopropanol (90:10 v/v), vazão = 3 mL/min, volume de injeção = 50 µL.

7.2 Proteínas e valores gerais

Foram feitas três curvas analíticas com a solução de albumina bovina (BSA), a partir de uma solução estoque (500 µg/mL), para posterior comparação com os resultados obtidos com as amostras. Os valores das leituras feitas para cada ponto da curva para a AChE, ESNp e PCD são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 e também são ilustrados pelas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente:

Tabela 6. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com o tampão fosfato.

Quantidade de Proteína (µg)	Média	Desvio Padrão
5	0,0441	0,0051
10	0,0805	0,0106
25	0,2103	0,0174
40	0,3092	0,0102
50	0,3832	0,0270

As leituras foram feitas em triplicata a 595 nm.

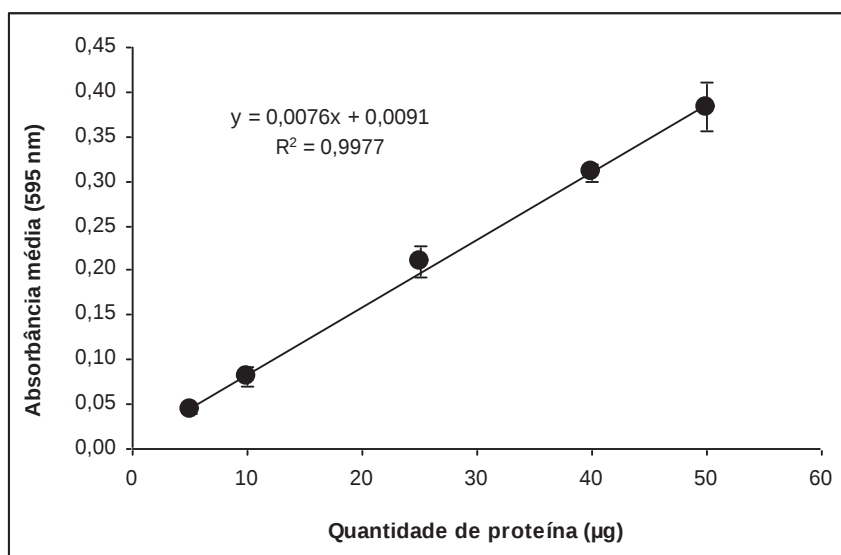


Figura 23: Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0.

Tabela 7. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com tampão tris-EDTA.

Quantidade de Proteína (µg)	Média	Desvio Padrão
5	0,0255	0,0125
10	0,0460	0,0073
25	0,1577	0,0033
40	0,2684	0,0058
50	0,3207	0,0096

As leituras foram feitas em triplicata a 595 nm.

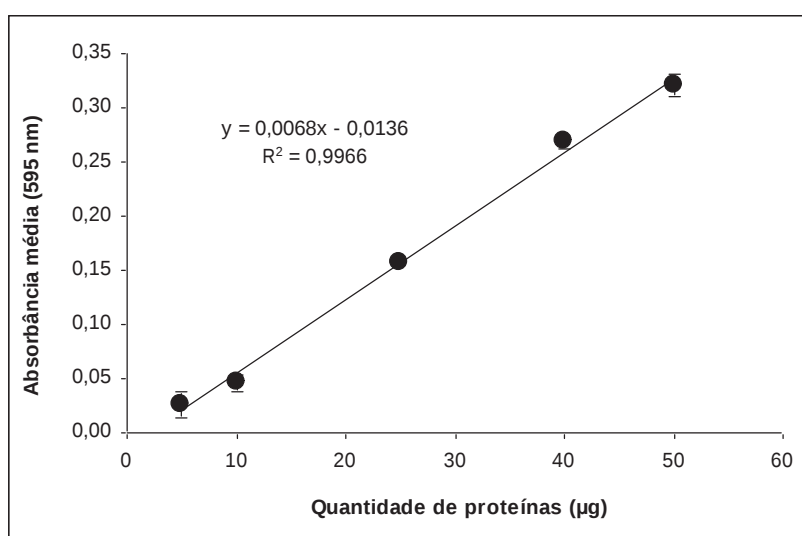


Figura 24: Curva analítica de proteína feita com tampão tris-EDTA pH 8,0.

Tabela 8. Dados para construção da curva analítica de proteínas feita com tampão PCD.

Quantidade de Proteína (µg)	Média	Desvio Padrão
5	0,0166	0,0066
10	0,0424	0,0045
25	0,1608	0,0008
40	0,2631	0,0092
50	0,3184	0,0067

As leituras foram feitas em triplicata a 595 nm.

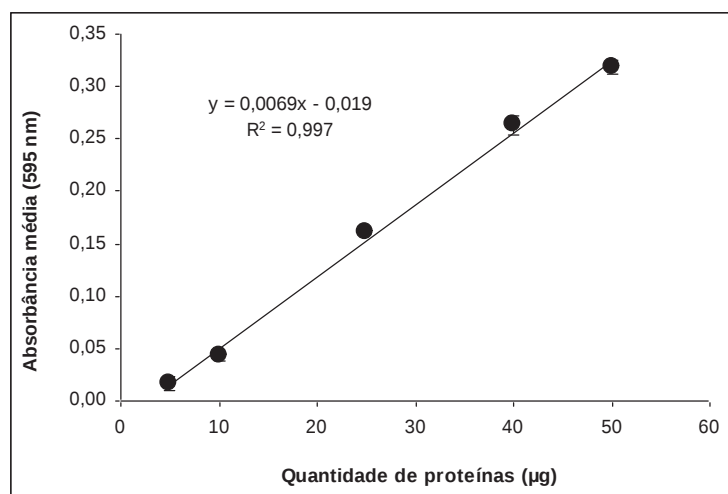


Figura 25: Curva analítica de proteína feita com tampão para a PCD.

Após a construção das curvas analíticas de proteínas iniciou-se a dosagem de proteínas nas amostras para que fosse possível o cálculo das atividades das enzimas nas galinhas e em humanos. Os valores normais para a atividade das esterases nos diversos tecidos analisados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores gerais encontrados para as esterases em amostras de humanos e de galinhas.

Enzima avaliada	Média (µmol/min/g de proteína)	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
ESNp em linfócitos humanos	7,0	1,2	17,1
ESNp em linfócitos de galinhas	9,4	1,8	19,1
ESNp em cérebro de galinhas	29,3	4,4	15,1
ESNp em células SH-SY5Y	19,9	3,7	18,6
BChE em plasma de galinhas	49,9	9,9	19,8
AChE em eritrócitos humanos	6,9	1,3	18,8
AChE em cérebro de galinhas	978,2	101,4	10,4
AChE em células SH-SY5Y	82,9	12,8	15,4

Humanos n = 80; Células SH-SY5Y n = 12; Número de aves n = 12.

Todas as amostras foram feitas em triplicata.

7.3 IC₅₀ da BChE e da AChE em galinhas:

Após a separação enantiomérica e a construção das curvas padrões de proteínas iniciaram-se as determinações das concentrações inibitórias e das constantes de inibição para (+/-)-metamidofós, (+)-metamidofós e (-)-metamidofós. Os resultados para a BChE de galinhas são mostrados nas Tabelas 10, 11 e 12 e ilustrados pelas Figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31.

Tabela 10. Valores de inibição da atividade da BChE para (+/-)-metamidofós.

(+/-)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
14,0	80,0 ± 3,8	1,30
10,0	72,4 ± 5,6	1,44
7,0	63,8 ± 2,1	1,55
3,0	45,2 ± 2,8	1,74
1,0	28,3 ± 0,8	1,86
0,5	15,5 ± 2,3	1,93
4,5 ± 0,2	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

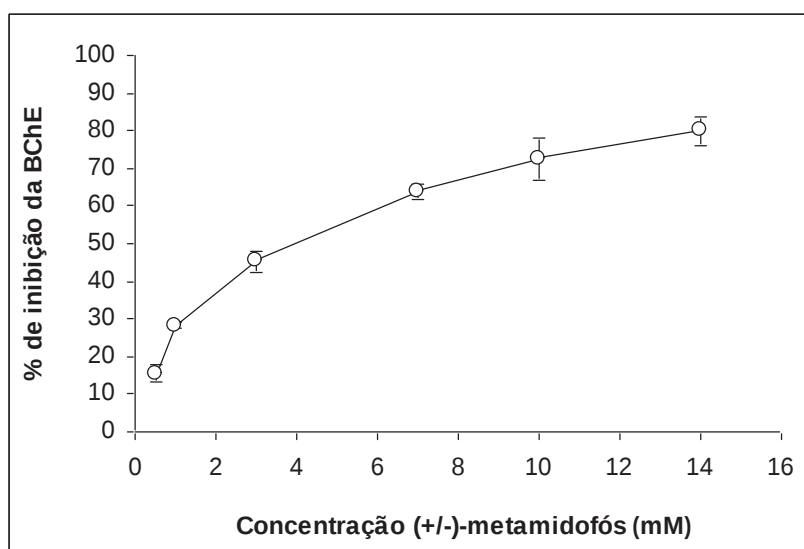


Figura 26: Curva de inibição da BChE para (+/-)-metamidofós. N=3, valores estão representados como média ± desvio padrão.

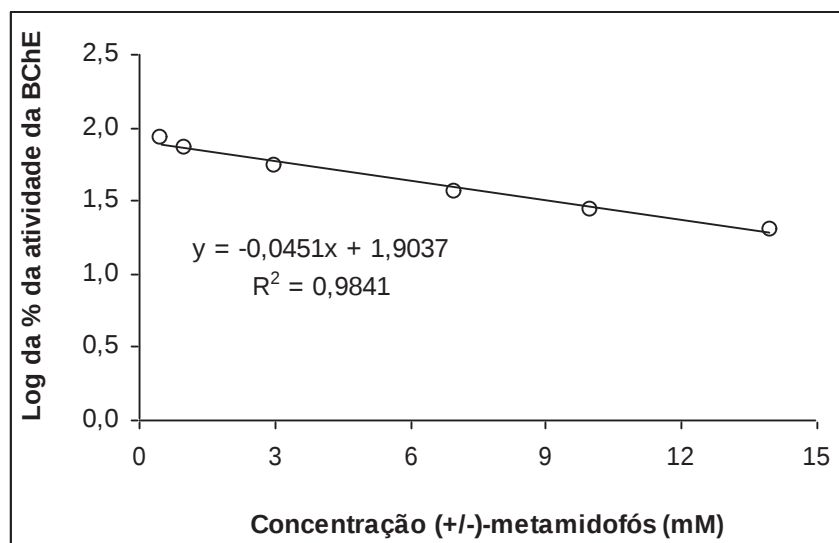


Figura 27: Log da % da atividade da BChE em função da concentração de (+/-)-metamidofós.

A Tabela 10 evidencia que a mistura racêmica do metamidofós apresentou IC_{50} de $4,5 \pm 0,2$ mM para a BChE de galinhas. Como a curva de inibição enzimática é função logarítmica (Figura 26) foi calculado o log da porcentagem da atividade para que pudesse ser calculado a IC_{50} pela equação da reta mostrada na Figura 27 (BERTOLAZZI et al., 1991). Esta reta apresentou bom coeficiente de regressão com valor de r^2 igual a 0,9841.

Tabela 11. Valores de inibição da atividade da BChE para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
7,0	$85 \pm 2,0$	1,18
3,5	$65,8 \pm 4,9$	1,53
2,5	$57,1 \pm 5,0$	1,63
1,5	$40,7 \pm 0,9$	1,77
1,0	$33,3 \pm 0,2$	1,82
0,5	$13,7 \pm 0,7$	1,94
$2,2 \pm 0,4$	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

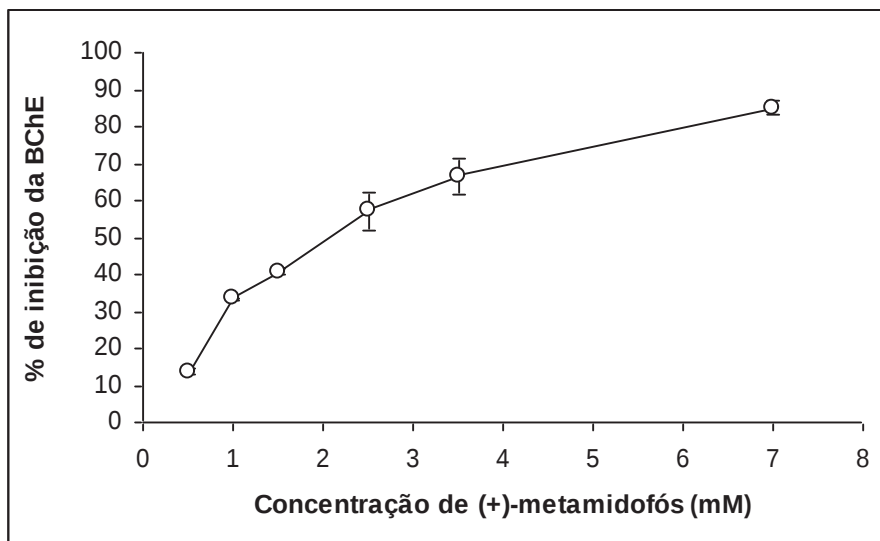


Figura 28: Curva de inibição da BChE para (+)-metamidofós. N=3, valores estão como representados média $\pm$ desvio padrão.

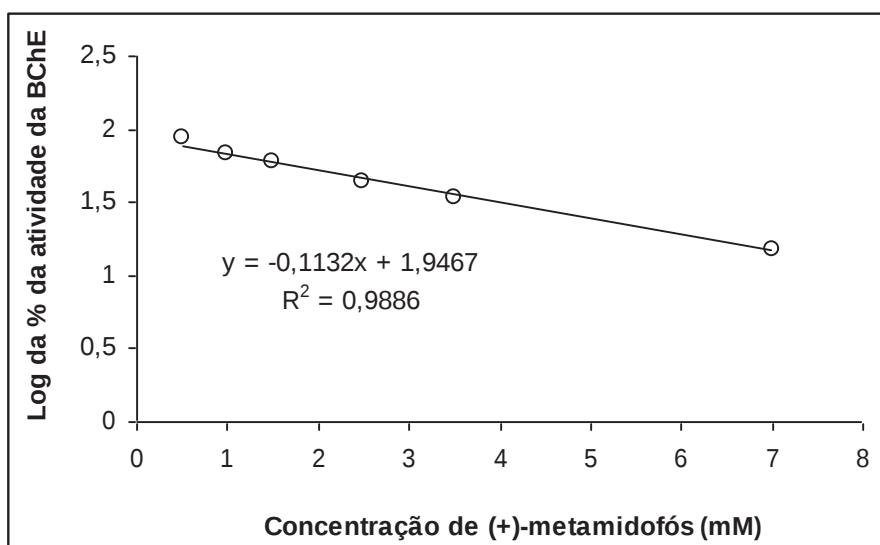


Figura 29: Log da % da atividade da BChE para (+)-metamidofós.

A Tabela 11 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC_{50} de $2,2 \pm 0,4$ mM para a BChE de galinhas. A reta mostrada na Figura 29 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9886.

Tabela 12. Valores de inibição da atividade da BChE para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
16	86,0 $\pm$ 6,1	1,15
10	65,1 $\pm$ 7,3	1,54
7,0	54,8 $\pm$ 6,9	1,66
5,0	40,7 $\pm$ 2,2	1,77
3,5	28,3 $\pm$ 4,2	1,86
2,0	13,2 $\pm$ 3,6	1,94
6,4 $\pm$ 0,3	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

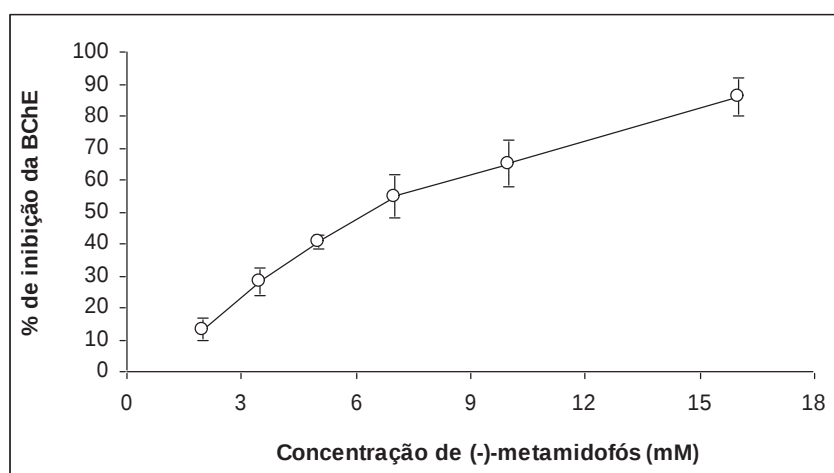


Figura 30: Curva de inibição da BChE para (-)-metamidofós. N=3, valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão.

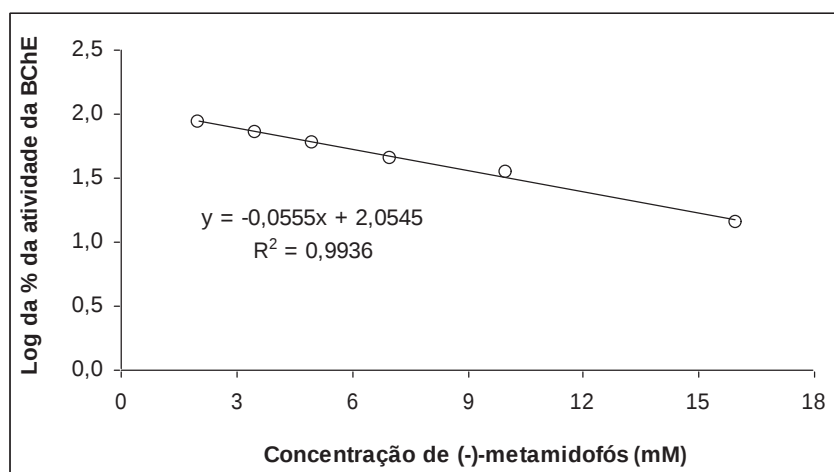


Figura 31: Log da % da atividade da BChE para (-)-metamidofós.

A Tabela 12 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 6,4 ± 0,3 mM para a BChE de galinhas. A reta ilustrada pela Figura 31 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9936.

Outros trabalhos já demonstraram que não foi detectada atividade da AChE em eritrócitos de aves (WILSON; HENDERSON, 1992). Assim, foi necessário fazer o doseamento desta esterase no sistema nervoso central (cérebro) para que pudesse ser feita a relação ESNp/AChE. As curvas de inibição da AChE em cérebro de galinhas estão mostradas nas Tabelas 13, 14 e 15 e nas Figuras 32, 33, 34 e 54.

Tabela 13. Valores de inibição da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.

(+/-)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
2,50	87,2 ± 3,0	1,11
1,50	77,0 ± 2,8	1,36
1,00	68,5 ± 3,0	1,50
0,70	48,6 ± 3,3	1,71
0,50	36,9 ± 7,0	1,80
0,25	16,9 ± 2,9	1,91
0,7 ± 0,1	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

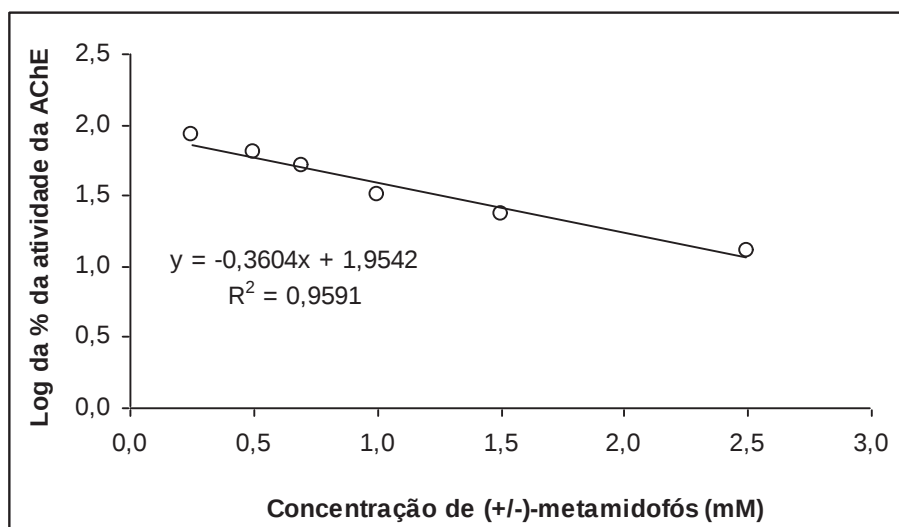


Figura 32: Log da % da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.

A Tabela 13 evidencia que o (+/-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de $0,7 \pm 0,1$ mM para a AChE em cérebro de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 32 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9591.

Tabela 14. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
5,00	$93,0 \pm 1,4$	0,85
3,50	$90,6 \pm 0,5$	0,98
1,00	$75,0 \pm 1,4$	1,40
0,50	$64,0 \pm 1,4$	1,56
0,05	$37,4 \pm 3,7$	1,80
0,02	$26,1 \pm 2,7$	1,87
$0,2 \pm 0,04$	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

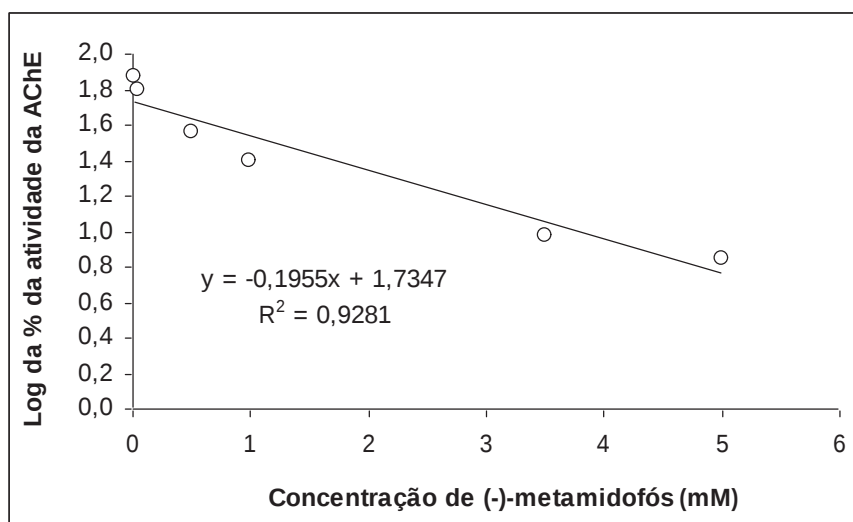


Figura 33: Log da % da atividade da AChE para (-)-metamidofós.

A Tabela 14 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de $0,2 \pm 0,04$ mM para a AChE em cérebro de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade

ilustrada pela Figura 33 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9281.

Tabela 15. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
10,00	88,3 $\pm$ 1,1	1,07
5,00	75,5 $\pm$ 2,5	1,39
2,50	54,2 $\pm$ 2,6	1,66
1,00	37,0 $\pm$ 0,2	1,80
0,50	29,5 $\pm$ 3,0	1,85
0,25	10,6 $\pm$ 0,8	1,95
2,3 $\pm$ 0,1	50,0	1,70

N= 3; Dp = desvio padrão.

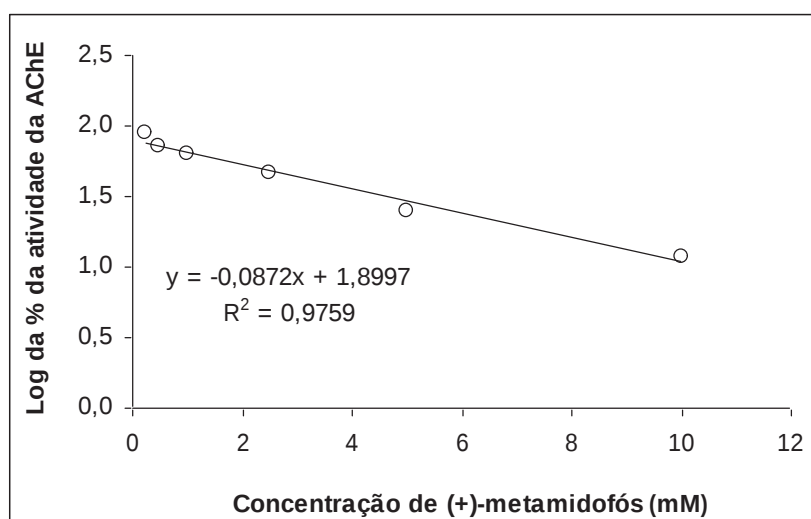


Figura 34: Log da % da atividade da AChE para (+)-metamidofós.

A Tabela 15 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC_{50} de $2,3 \pm 0,1$ mM para a AChE em cérebro de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 34 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9759. Sendo assim, as três isoformas do metamidofós apresentaram diferenças significativas entre as IC_{50} , com menor valor para a forma negativa e valor intermediário para a mistura racêmica.

7.4 IC₅₀ da ESNp em galinhas

7.4.1 ESNp linfocitária

Foram feitas também as curvas de inibição da mistura racêmica e dos dois estereoisômeros do metamidofós para a ESNp linfocitária de galinhas. Estes resultados são mostrados nas Tabelas 16, 17 e 18 e ilustrados pelas Figuras 35, 36, 37 e 54.

Tabela 16. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.

(+/-)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
7,0	75,0 ± 0,4	1,40
5,0	69,5 ± 6,0	1,48
3,5	65,5 ± 3,8	1,54
2,5	63,5 ± 5,2	1,56
0,5	45,9 ± 5,3	1,73
0,1	30,0 ± 4,4	1,85
1,3 ± 0,3	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão

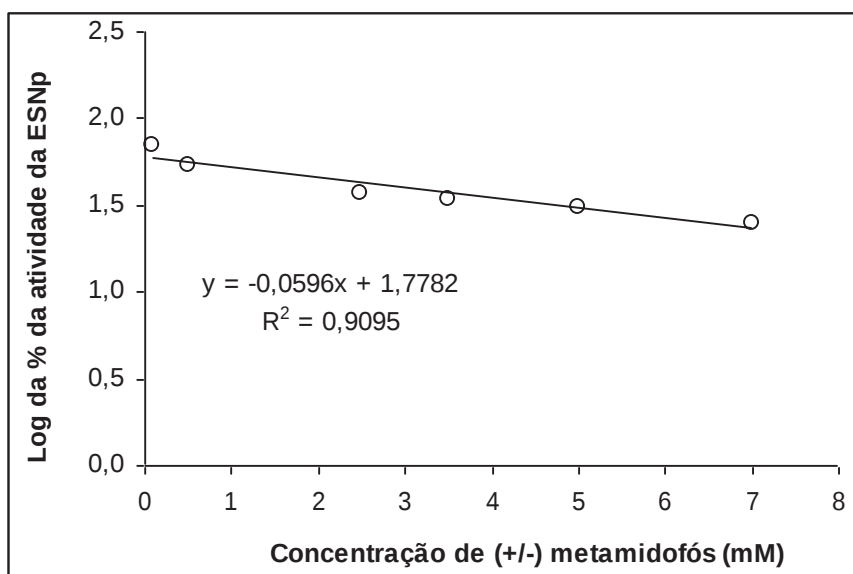


Figura 35: Log da % da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.

A Tabela 16 evidencia que a mistura racêmica do metamidofós apresentou IC_{50} de $1,3 \pm 0,3$ mM para a ESNp linfocitária de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 35 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9095.

Tabela 17. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
4,0	$78,1 \pm 2,0$	1,34
2,0	$63,2 \pm 4,0$	1,57
0,8	$46,3 \pm 4,0$	1,73
0,5	$37,8 \pm 6,2$	1,79
0,3	$29,2 \pm 4,5$	1,85
0,1	$8,0 \pm 2,8$	1,96
$1,3 \pm 0,6$	50,0	1,70

N=3

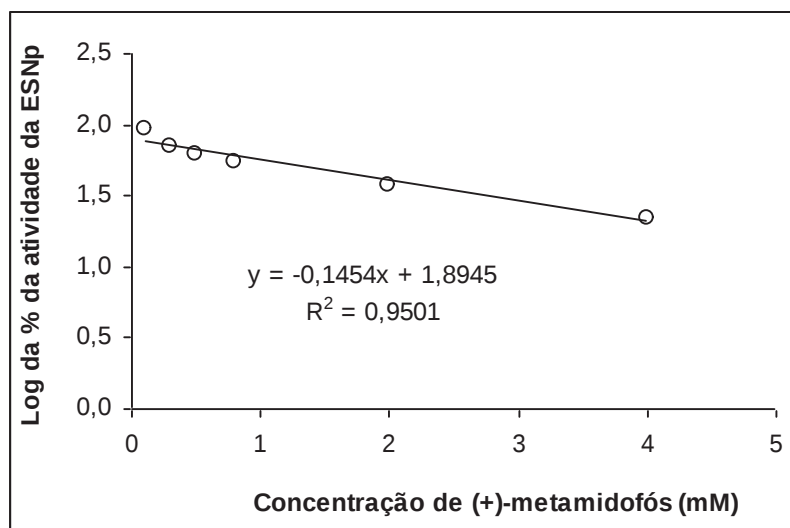


Figura 36: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

A Tabela 17 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC_{50} de $1,3 \pm 0,6$ mM para a ESNp linfocitária de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade

ilustrada pela Figura 36 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9501.

Tabela 18. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
15,0	70,2 $\pm$ 3,4	1,47
10,0	60,0 $\pm$ 4,6	1,60
5,0	45,2 $\pm$ 2,0	1,74
2,5	30,8 $\pm$ 8,0	1,84
2,0	25,0 $\pm$ 4,9	1,88
1,0	17,8 $\pm$ 3,3	1,92
7,2 $\pm$ 1,9	50,0	1,7

N=3; Dp = desvio padrão.

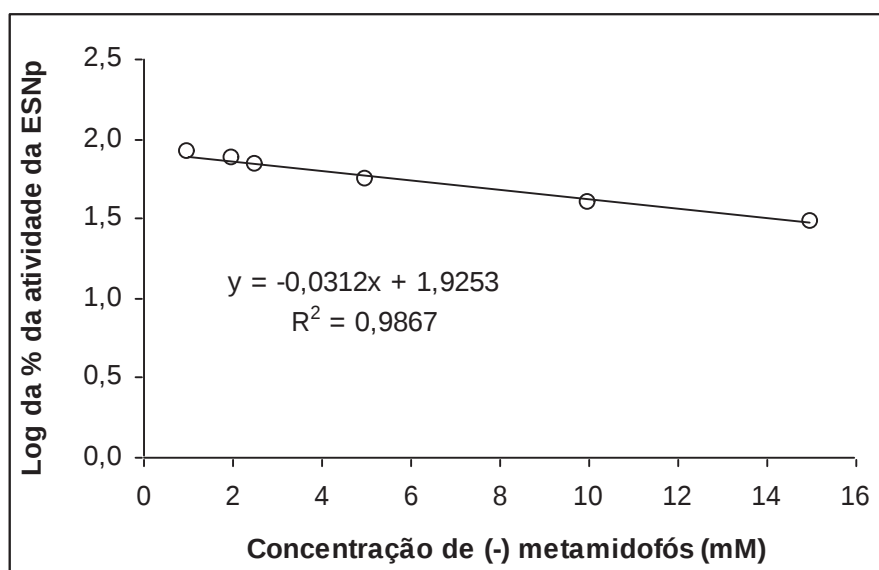


Figura 37: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

A Tabela 18 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 7,2 $\pm$ 1,9 mM para a ESNp linfocitária de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 37 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9867.

7.4.2 ESNp em cérebro

Foram feitas também as curvas de inibição dos dois enantiômeros do metamidofós para a ESNp em cérebro de galinhas. Estes resultados são mostrados nas Tabelas 19, 20 e 21 e ilustrados pelas Figuras 38, 39 e 54.

Tabela 19. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
100	99,8 ± 5,6	-0,71
60	97,4 ± 6,0	0,42
10	83,8 ± 4,8	1,21
1	61,2 ± 5,9	1,59
0,5	50,1 ± 7,2	1,70
0,1	21,2 ± 4,1	1,90
0,6 ± 0,2	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão.

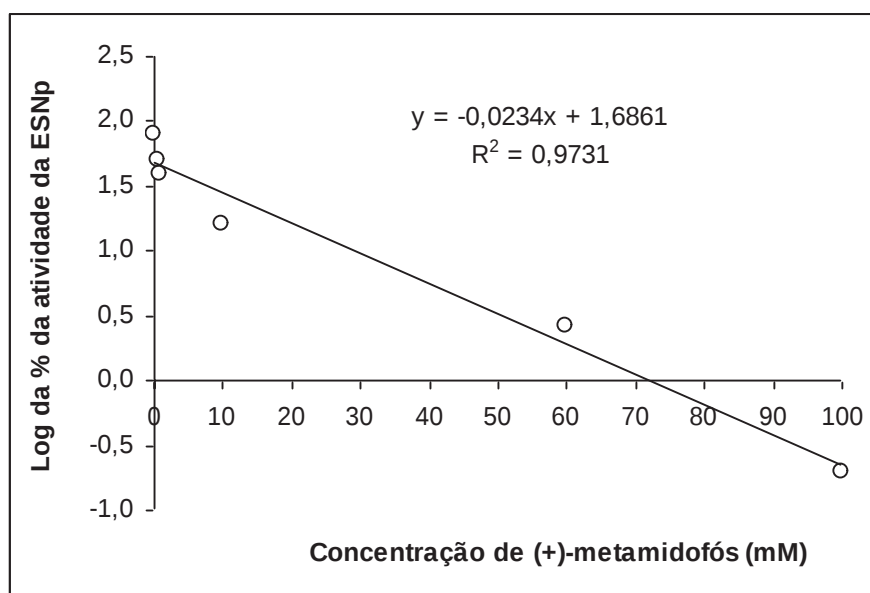


Figura 38: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

A Tabela 19 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,6 ± 0,2 mM para a ESNp em cérebro de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade

ilustrada pela Figura 38 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9731.

Tabela 20. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
100	90,0 $\pm$ 6,3	1,00
60	80,1 $\pm$ 5,1	1,30
20	56,4 $\pm$ 4,2	1,64
10	37,1 $\pm$ 3,9	1,80
1	9,7 $\pm$ 2,3	1,96
0,1	5,0 $\pm$ 1,2	1,98
22,7 $\pm$ 3,2	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

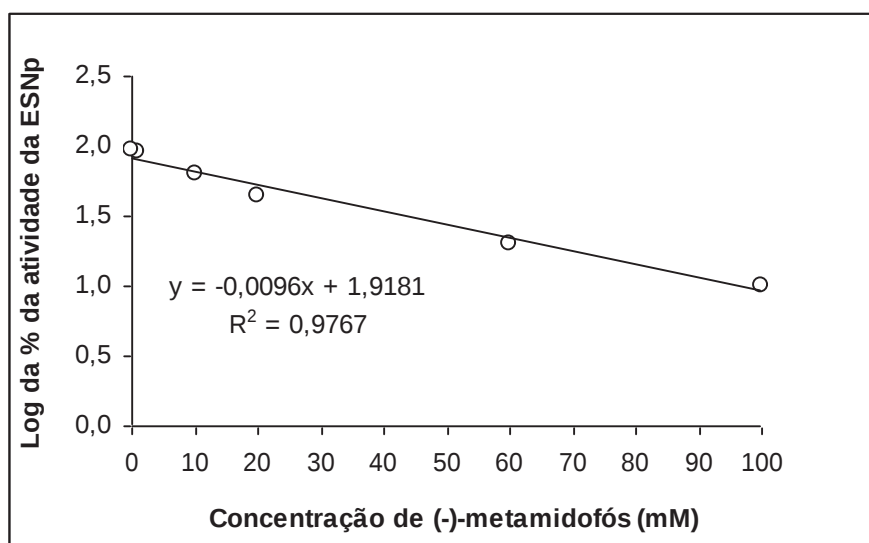


Figura 39: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

A Tabela 17 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 22,7 $\pm$ 3,2 mM para a ESNp em cérebro de galinhas. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 39 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9767.

7.5 IC₅₀ em material humano

7.5.1 ESNp em células SH-SY5Y

Foram feitas também duas curvas de inibição dos dois enantiômeros do metamidofós para a ESNp nas células da linhagem SH-SY5Y humana. Estes resultados são mostrados nas Tabelas 21 e 22 e ilustrados pelas Figuras 40, 41 e 54.

Tabela 21. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,7	94,3 ± 6,2	0,76
0,4	87,8 ± 4,2	1,09
0,07	61,4 ± 2,6	1,59
0,03	41,4 ± 4,1	1,77
0,007	21,6 ± 2,4	1,89
0,0007	1,42 ± 0,5	1,99
0,09 ± 0,02	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão.

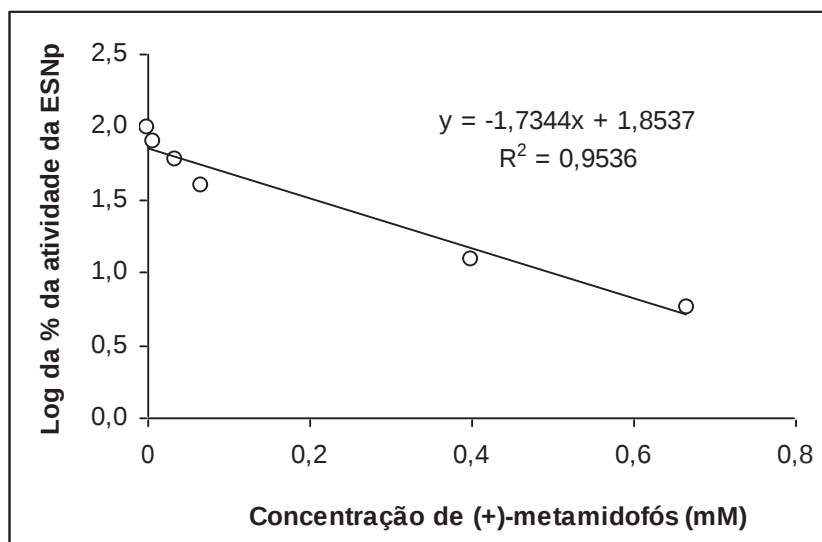


Figura 40: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

A Tabela 20 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,09 ± 0,02 mM para a ESNp em células SH-SY5Y humana. A reta do log da porcentagem da

atividade ilustrada pela Figura 40 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9536.

Tabela 22. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
40,0	74,1 $\pm$ 5,2	1,41
20,0	60,7 $\pm$ 3,2	1,60
10,0	56,5 $\pm$ 2,6	1,64
2,5	34,3 $\pm$ 4,5	1,82
0,5	20,2 $\pm$ 1,8	1,90
0,05	0,2 $\pm$ 1,2	2,00
14,2 $\pm$ 2,3	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

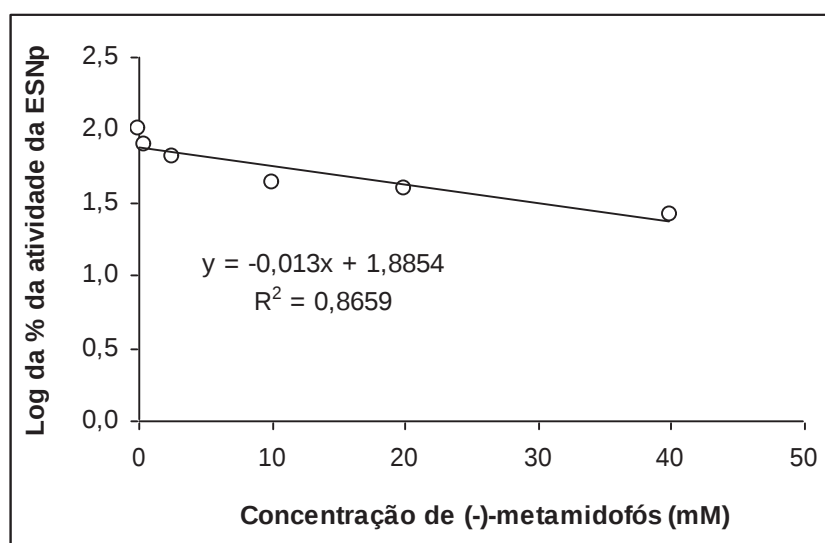


Figura 41: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

A Tabela 22 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 14,2 $\pm$ 2,3 mM para a ESNp em células SH-SY5Y humanas. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 41 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,8659.

7.5.2 AChE eritrocitária

Após as coletas no hemonúcleo de Araraquara-SP e a padronização dos valores de referência iniciaram as determinações das concentrações inibitórias para o (+/-)-metamidofós, (+)-metamidofós e (-)-metamidofós para a AChE eritrocitária humana. Os resultados para a AChE são mostrados nas Tabelas 23, 24 e 25 e ilustrados pelas Figuras 42, 43, 44 e 54.

Tabela 23. Valores de inibição da atividade da AChE para (+/-)-metamidofós.

(+/-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
3,50	87,6 $\pm$ 2,8	1,09
1,50	79,5 $\pm$ 2,1	1,31
0,50	63,0 $\pm$ 4,2	1,57
0,10	41,4 $\pm$ 2,0	1,77
0,05	30,0 $\pm$ 4,0	1,85
0,01	15,9 $\pm$ 1,3	1,92
0,4 $\pm$ 0,1	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

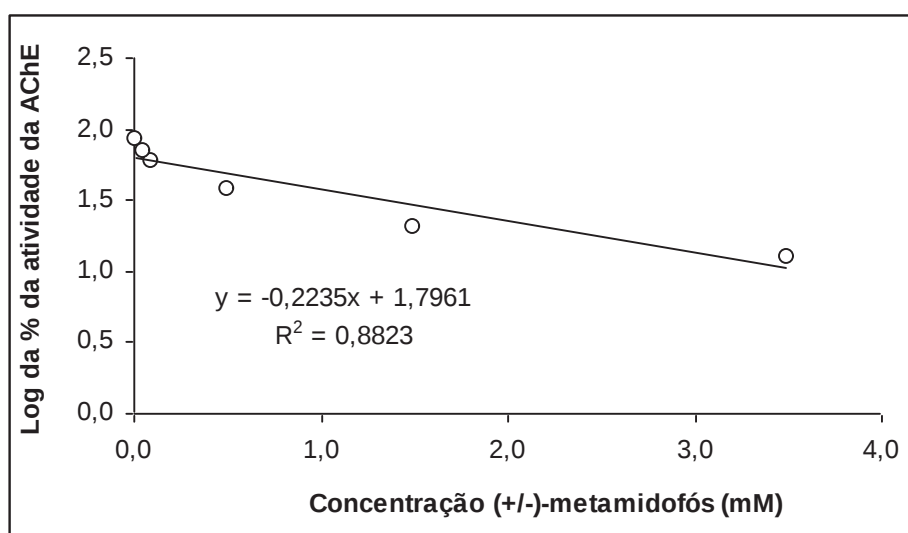


Figura 42: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (+/-)-metamidofós.

A Tabela 23 evidencia que o (+/-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,4 ± 0,1 mM para a AChE eritrocitária humana. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 44 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,8823.

Tabela 24. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
3,50	93,8 ± 1,7	0,79
1,50	84,5 ± 0,7	1,19
1,00	78,9 ± 1,3	1,32
0,20	52,5 ± 3,5	1,68
0,05	36,3 ± 2,3	1,80
0,01	17,6 ± 3,6	1,92
0,2 ± 0,01	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

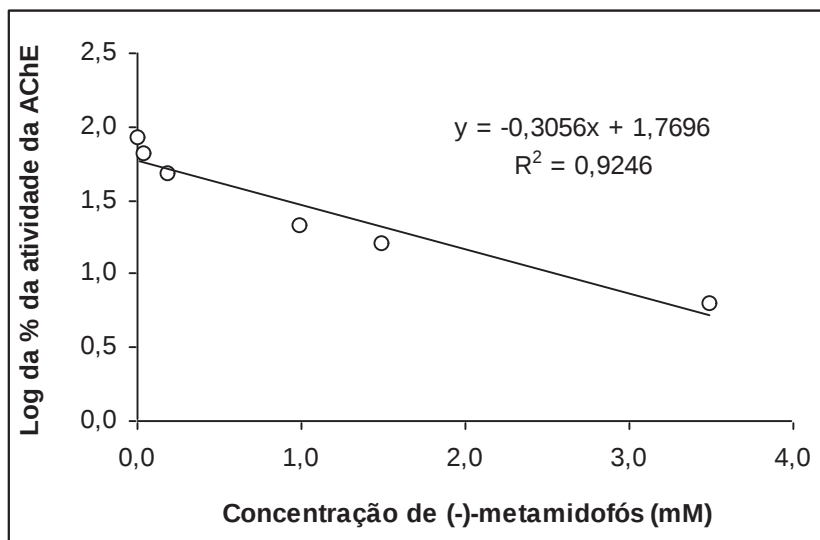


Figura 43: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (-)-metamidofós.

A Tabela 24 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,2 ± 0,01 mM para a AChE eritrocitária humana. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 43 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9246.

Tabela 25. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.

(+)-Metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
7,00	88,3 $\pm$ 1,2	1,07
3,50	74,1 $\pm$ 4,5	1,41
1,00	50,4 $\pm$ 3,3	1,70
0,50	37,3 $\pm$ 3,4	1,80
0,20	17,1 $\pm$ 1,3	1,92
0,08	9,5 $\pm$ 0,9	1,96
1,6 $\pm$ 0,06	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

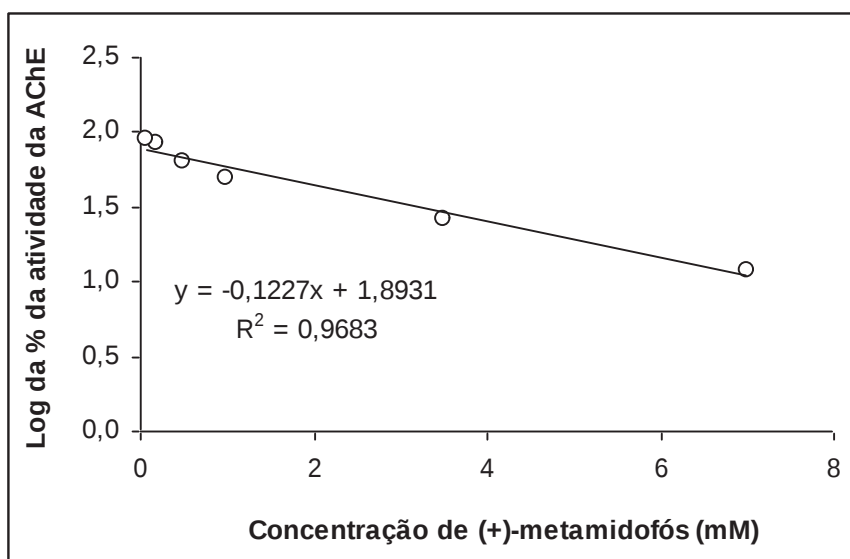


Figura 44: Log da % da atividade da AChE eritrocitária para (+)-metamidofós.

A Tabela 25 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 1,6 $\pm$ 0,06 mM para a AChE eritrocitária humana. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 44 apresentou um bom coeficiente de correlação inversa com r^2 igual a 0,9683.

7.5.3 ESNp linfocitária

Após as coletas no hemonúcleo de Araraquara-SP e a padronização dos valores de referência também foram feitas as determinações das concentrações inibitórias para o (+/-)-metamidofós, (+)-metamidofós e (-)-metamidofós para a ESNp linfocitária. Os resultados para a ESNp são mostrados nas Tabelas 26, 27 e 28 ilustrados pelas Figuras 45, 46, 47 e 54.

Tabela 26. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+/-)-metamidofós.

(+/-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
10,00	86,1 $\pm$ 3,2	1,14
5,00	79,0 $\pm$ 5,9	1,32
1,00	51,7 $\pm$ 5,4	1,68
0,60	42,3 $\pm$ 3,5	1,76
0,10	26,3 $\pm$ 2,4	1,87
0,05	20,5 $\pm$ 4,2	1,90
1,6 $\pm$ 0,3	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

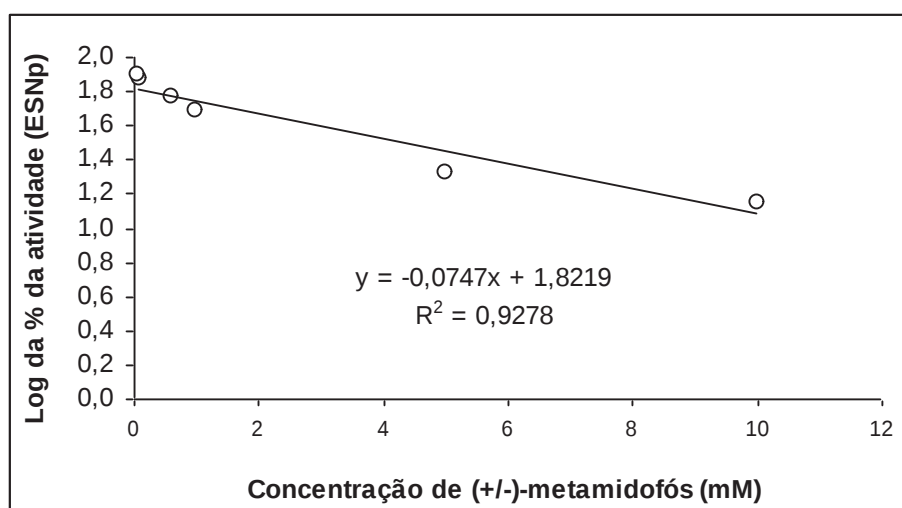


Figura 45: Log da % da atividade da ESNp linfocitária para (+/-)-metamidofós.

A Tabela 26 evidencia que o (+/-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 1,6 ± 0,3 mM para a ESNp linfocitária humana. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 45 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9278.

Tabela 27. Valores de inibição da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
5,00	91,75 ± 3,9	0,92
2,00	67,7 ± 7,9	1,51
1,00	59,55 ± 3,9	1,61
0,25	45,75 ± 2,2	1,73
0,10	31,2 ± 1,6	1,84
0,05	22,3 ± 3,3	1,89
0,9 ± 0,07	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

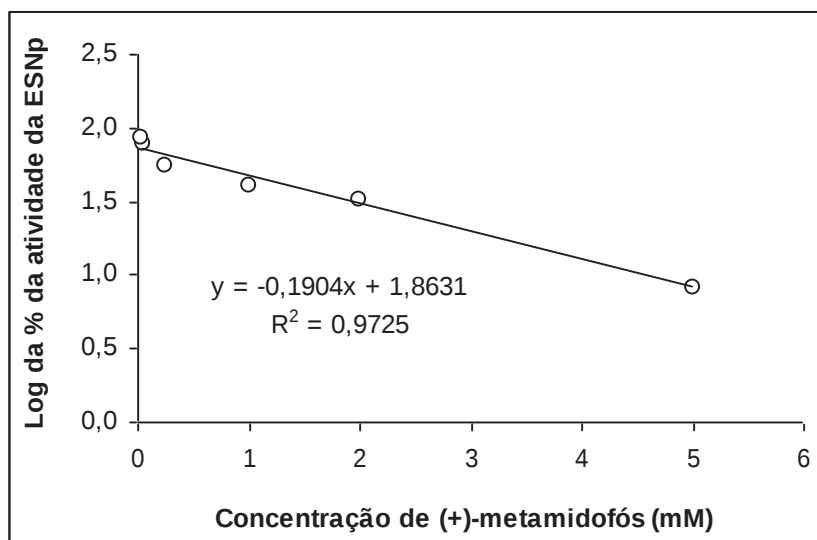


Figura 46: Log da % da atividade da ESNp linfocitária para (+)-metamidofós.

A Tabela 27 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,9 ± 0,07 mM para a ESNp linfocitária humana. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 46 apresentou coeficiente de regressão inversa com r^2 igual a 0,9725.

Tabela 28. Valores de inibição da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
7,00	68,0 $\pm$ 3,1	1,51
5,00	62,0 $\pm$ 2,6	1,58
2,50	49,4 $\pm$ 3,2	1,70
1,00	38,8 $\pm$ 7,1	1,79
0,50	32,4 $\pm$ 1,8	1,83
0,05	12,1 $\pm$ 2,1	1,94
3,4 $\pm$ 0,3	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

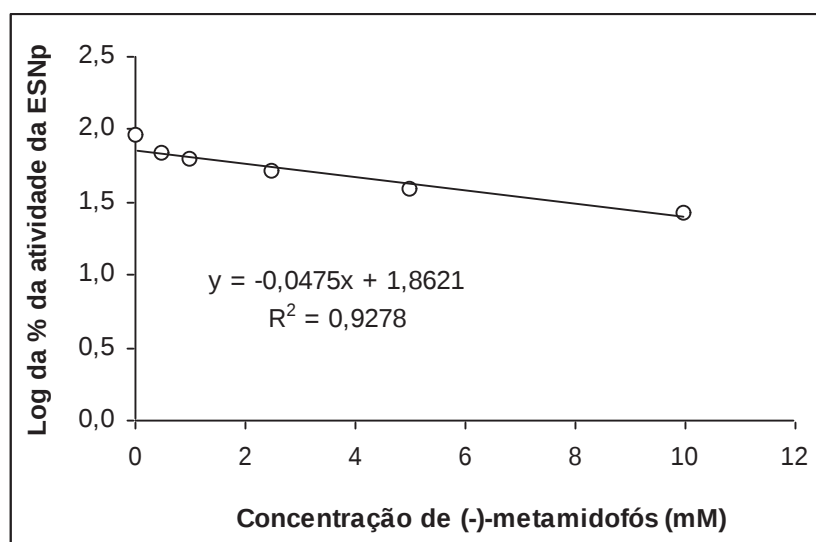


Figura 47: Log da % da atividade da ESNp linfocitária para (-)-metamidofós.

A Tabela 28 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 3,4 $\pm$ 0,3 mM para a ESNp linfocitária humana. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 47 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9278.

7.5.4 AChE nas células SH-SY5Y

Foram feitas também duas curvas de inibição dos dois enantiômeros do metamidofós para a AChE nas células da linhagem SH-SY5Y humana. Estes resultados são mostrados nas Tabelas 29 e 30 e ilustrados pelas Figuras 48, 49 e 54.

Tabela 29. Valores de inibição da atividade da AChE para (+)-metamidofós.

(+)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,1	87,2 $\pm$ 6,4	1,11
0,04	71,4 $\pm$ 4,9	1,46
0,02	53,7 $\pm$ 3,6	1,67
0,01	37,0 $\pm$ 4,0	1,80
0,001	22,6 $\pm$ 2,9	1,89
0,0001	5,4 $\pm$ 0,9	1,97
0,02 $\pm$ 0,003	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão.

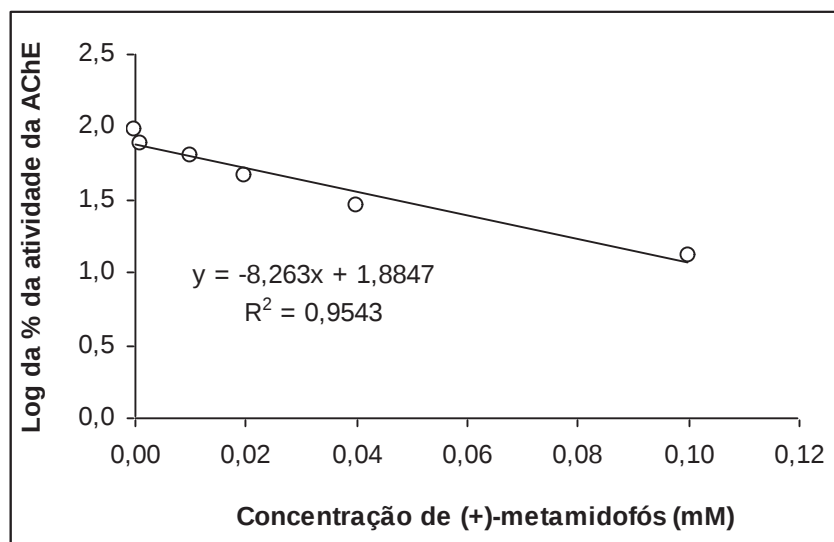


Figura 48: Log da % da atividade da ESNp para (+)-metamidofós.

A Tabela 29 evidencia que o (+)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,02 $\pm$ 0,003 mM para a AChE em células SH-SY5Y. A reta do log da porcentagem da atividade

ilustrada pela Figura 48 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9543.

Tabela 30. Valores de inibição da atividade da AChE para (-)-metamidofós.

(-)-metamidofós (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,04	94,3 $\pm$ 5,9	0,76
0,01	74,7 $\pm$ 6,2	1,40
0,004	60,4 $\pm$ 5,6	1,60
0,002	44,4 $\pm$ 3,5	1,75
0,001	27,9 $\pm$ 3,8	1,86
0,0001	7,5 $\pm$ 2,0	1,97
0,004 $\pm$ 0,001	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

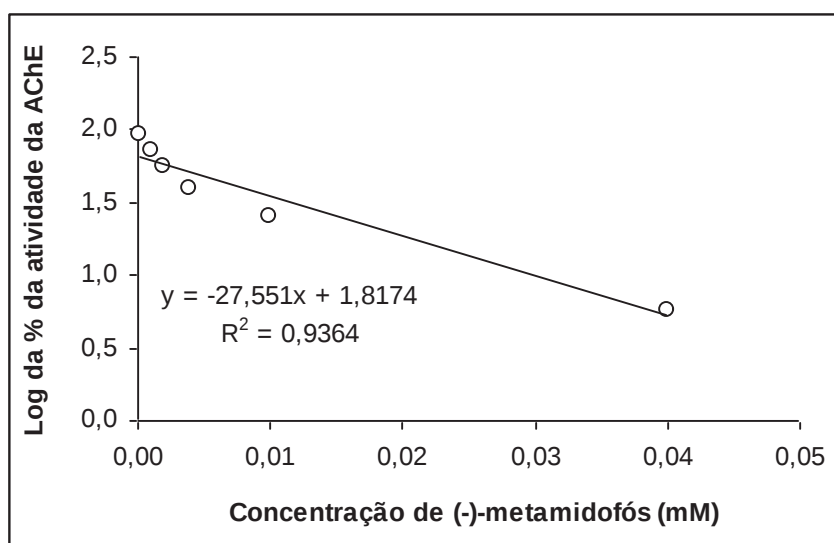


Figura 49: Log da % da atividade da ESNp para (-)-metamidofós.

A Tabela 30 evidencia que o (-)-metamidofós apresentou IC₅₀ de 0,004 $\pm$ 0,001 mM para a AChE em células SH-SY5Y. A reta do Log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 49 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9364.

7.6 IC₅₀ do mipafox

Utilizado em vários testes *in vitro* como conhecido indutor da NRIOP (EHRICH et al., 1997), o mipafox foi testado neste trabalho com o objetivo de comparar suas relações IC₅₀ ESNp/IC₅₀ AChE com as relações das formas enantioméricas do metamidofós. As curvas de inibição das ESNp e AChE realizadas em cérebro de galinhas e nas células SH-SY5Y estão mostradas nas Tabelas 31, 32, 33 e 34 e nas Figuras 50, 51, 52, 53 e 54.

Tabela 31. Valores de inibição da atividade da AChE em cérebro de galinhas para mipafox.

mipafox (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,1	91,8 ± 6,1	0,92
0,06	84,9 ± 5,9	1,18
0,04	69,7 ± 4,6	1,48
0,02	55,5 ± 5,1	1,65
0,01	31,0 ± 4,9	1,84
0,001	5,3 ± 1,9	1,97
0,02 ± 0,003	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão.

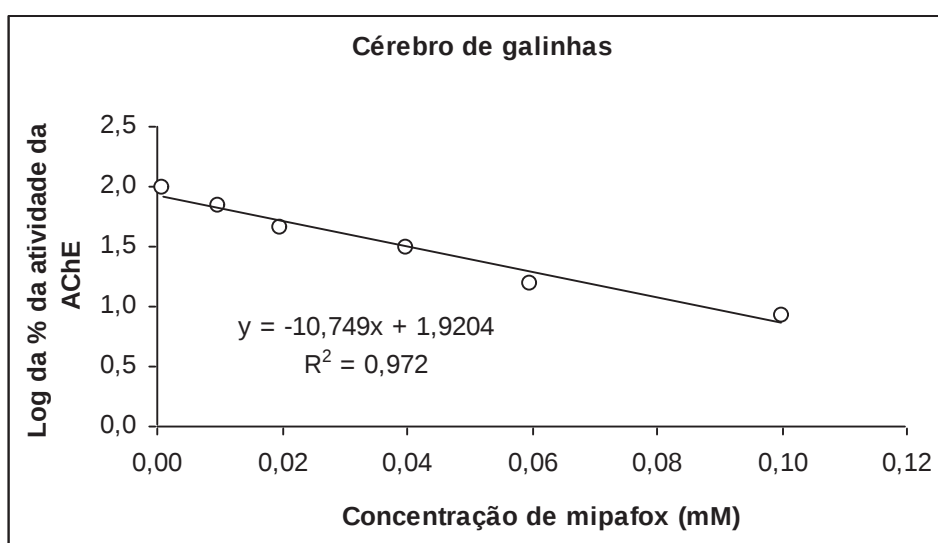


Figura 50: Log da % da atividade da AChE para mipafox.

A Tabela 31 evidencia que o mipafox apresentou IC₅₀ de 0,02 ± 0,003 mM. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 50 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9720.

Tabela 32. Valores de inibição da atividade da AChE nas células SH-SY5Y para mipafox.

mipafox (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,1	95,4 ± 6,9	0,66
0,08	90,1 ± 4,2	1,00
0,04	76,9 ± 5,1	1,36
0,02	58,8 ± 4,7	1,61
0,01	41,2 ± 5,1	1,77
0,001	21,8 ± 3,1	1,89
0,02 ± 0,001	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

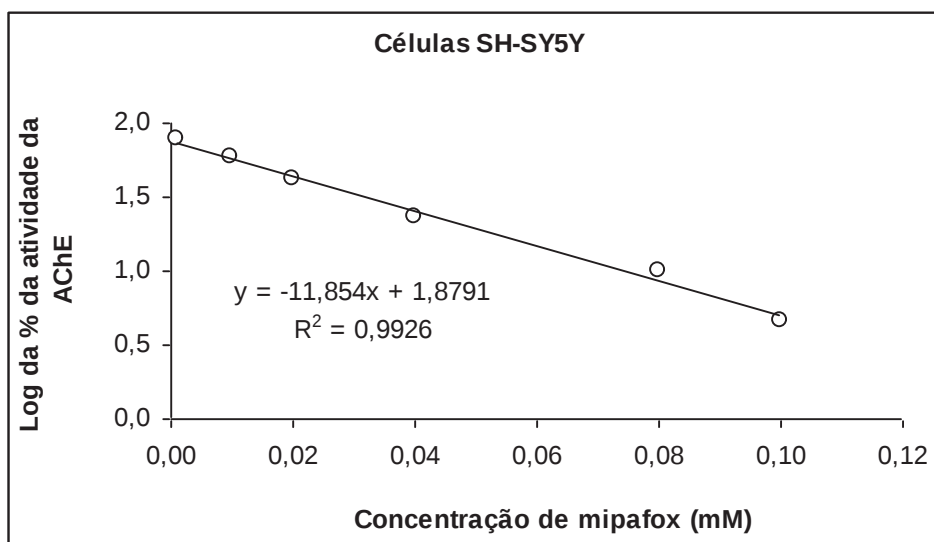


Figura 51: Log da % da atividade da AChE para mipafox.

A Tabela 32 evidencia que o mipafox apresentou IC₅₀ de 0,02 ± 0,001 mM. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 51 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9926.

Tabela 33. Valores de inibição da atividade da ESNp em cérebro de galinhas para mipafox.

mipafox (mM)	média ± Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,01	92,8 ± 6,8	0,86
0,004	57,4 ± 4,9	1,63
0,002	37,2 ± 3,9	1,80
0,001	24,0 ± 4,1	1,88
0,0001	12,0 ± 3,1	1,94
0,00001	3,5 ± 1,8	1,98
0,003 ± 0,0008	50,0	1,70

N = 3; Dp = desvio padrão.

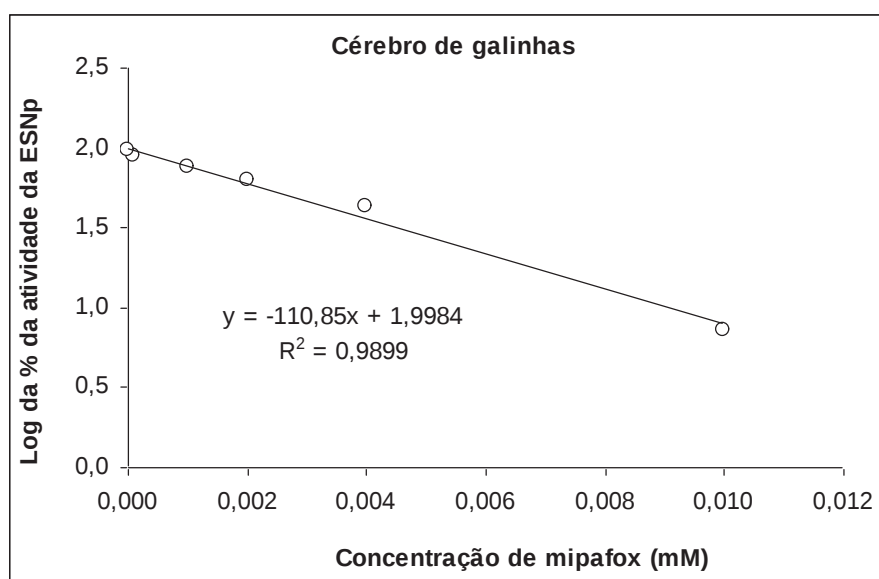


Figura 52: Log da % da atividade da ESNp para mipafox.

A Tabela 33 evidencia que o mipafox apresentou IC₅₀ de 0,003 ± 0,0008 mM para a ESNp no cérebro de galinhas. A reta do log da porcentagem da atividade

ilustrada pela Figura 52 apresentou bom coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9899.

Tabela 34. Valores de inibição da atividade da ESNp nas células SH-SY5Y para mipafox.

mipafox (mM)	média $\pm$ Dp (% de inibição)	Log da % da atividade
0,1	92,4 $\pm$ 6,2	0,88
0,06	85,1 $\pm$ 6,1	1,17
0,04	78,6 $\pm$ 5,3	1,33
0,02	54,1 $\pm$ 4,9	1,66
0,01	25,2 $\pm$ 4,1	1,88
0,0001	4,0 $\pm$ 1,8	1,98
0,02 $\pm$ 0,002	50,0	1,70

N=3; Dp = desvio padrão.

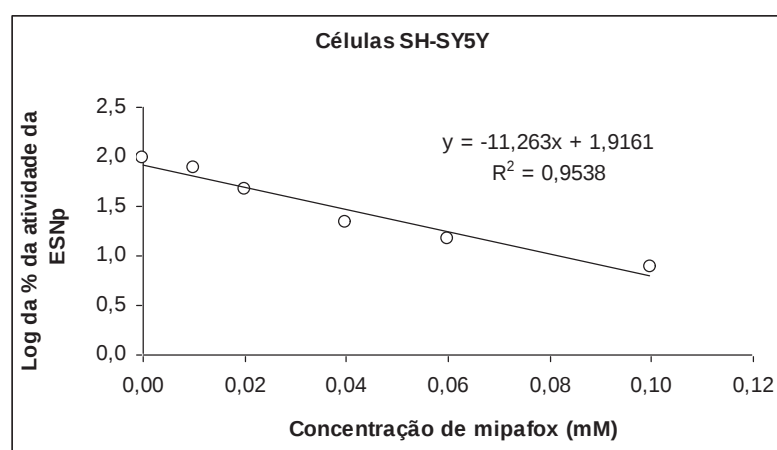


Figura 53: Log da % da atividade da ESNp para mipafox.

A Tabela 34 evidencia que o mipafox apresentou IC_{50} de $0,02 \pm 0,002$ mM para a ESNp nas células SH-SY5Y. A reta do log da porcentagem da atividade ilustrada pela Figura 53 apresentou coeficiente de regressão com r^2 igual a 0,9538.

7.7 Resumo das curvas de inibição

Assim, pode-se fazer uma Figura e uma Tabela comparando todas as curvas de inibições nos diversos tecidos analisados e as IC_{50} encontradas para cada enzima avaliada (Figura 54 e Tabela 32).

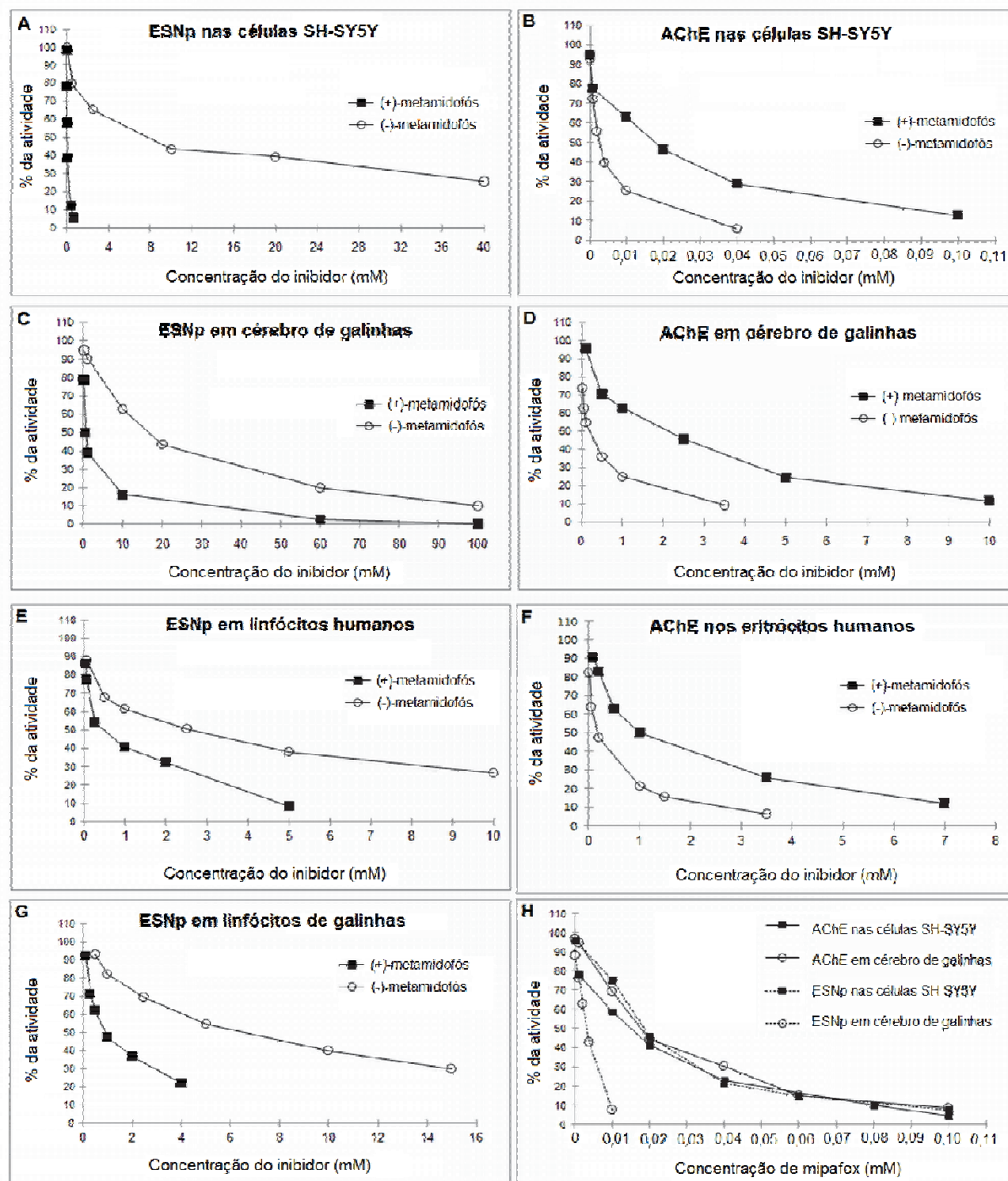


Figura 54: Comparação das curvas de % da atividade *versus* concentração de (+)-metamidofós, (-)-metamidofós e mipafox para as enzimas ESNp e AChE de galinhas e de humanos Os resultados para os enantiômeros do metamidofós estão de A-G e para o mipafox estão em H. Cada ponto foi obtido pela média de três amostras

analisadas em triplicata. Os valores de IC₅₀ com os respectivos desvios padrão são mostrados na Tabela 35.

O resumo das curvas de inibição enzimática está representado na Tabela 35.

Tabela 35. Resumo das IC₅₀ dos enantiômeros do metamidofós e do mipafox em relação às enzimas AChE e ESNp.

Enzima avaliada	Inibidor	IC ₅₀ (mM)	r ²	Razão IC ₅₀ NTE/ IC ₅₀ AChE
ESNp nos linfócitos humanos	(+)-metamidofós	0,9 ± 0,07*	0,9725	0,5
	(-)- metamidofós	3,4 ± 0,3	0,9278	17,0
ESNp nos linfócitos de galinhas	(+)- metamidofós	1,3 ± 0,2*	0,9501	
	(-)- metamidofós	7,2 ± 0,3	0,9867	
ESNp no cérebro de galinhas	mipafox	0,003 ± 0,0008	0,9899	0,15
	(+)- metamidofós	0,6 ± 0,1*	0,9731	0,26
	(-)- metamidofós	22,7 ± 3,2	0,9767	114
ESNp nas células SH-SY5Y	mipafox	0,02 ± 0,002	0,9538	1,0
	(+)- metamidofós	0,09 ± 0,02*	0,9536	4,5
	(-)- metamidofós	14,2 ± 2,3	0,8659	3550
AChE no cérebro de galinhas	mipafox	0,02 ± 0,003	0,9720	
	(+)- metamidofós	2,3 ± 0,01*	0,9759	
	(-)- metamidofós	0,2 ± 0,04	0,9281	
AChE nas células SH-SY5Y	mipafox	0,02 ± 0,002	0,9926	
	(+)- metamidofós	0,02 ± 0,003*	0,9543	
	(-)- metamidofós	0,004 ± 0,001	0,9364	
AChE em eritrócitos humanos	(+)- metamidofós	1,6 ± 0,06*	0,9683	
	(-)- metamidofós	0,2 ± 0,01	0,9246	

Os valores de IC₅₀ encontrados foram obtidos pela média de três amostras. Cada amostra foi analisada em triplicata. * diferença estatística significativa em relação ao outro enantiômero. Em negrito estão as razões maiores do que 5.

7.8 Apoptose e ativação da calpaína *in vitro*

Para dar suporte aos resultados obtidos com a inibição da ESNp e da AChE foi feito também avaliação da apoptose em cultura de células e ativação da calpaína *in vitro* em cérebro de galinhas e em cultura celular. Estes resultados são mostrados nas Figuras 55 e 56.

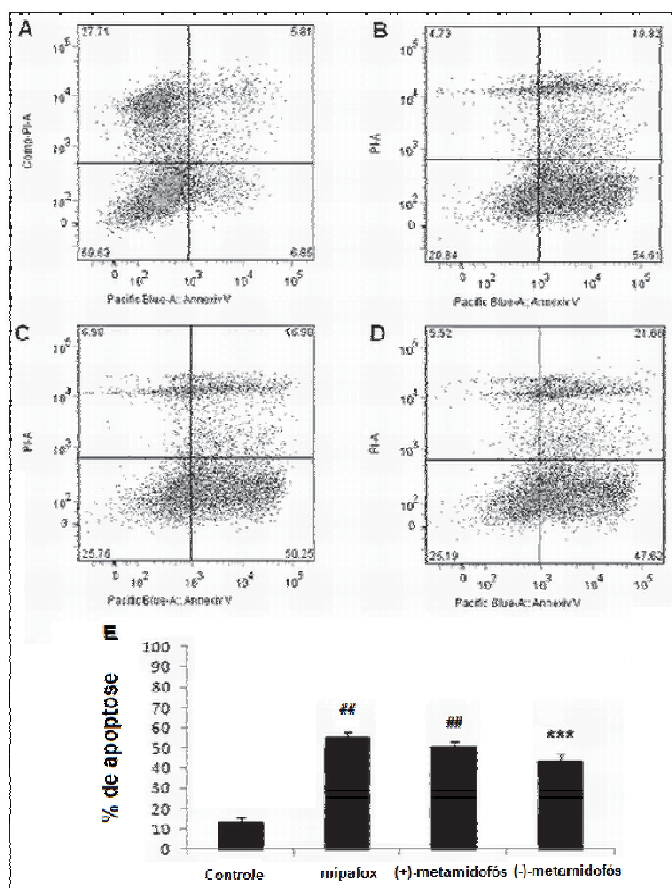


Figura 55: Apoptose nas células humanas SH-SY5Y do grupo controle (A), mipafox (B), (+)-metamidofós (C) e (-)-metamidofós (D) depois de 1 hora de incubação à 37°C. A Figura de A-D é uma de três experimentos independentes. O quadrante de cada figura mostra as células viáveis que aparecem como anexina e iodeto de propídio (IP) negativos (anexina -/IP-, inferior esquerdo), estágio inicial de apoptose (anexina+/IP-, inferior direito), estágio tardio apoptótico e necrose (anexina+/IP+, superior direito) e células sem necrose (anexina-/IP+, superior esquerdo). A Figura 4E representa a média $\pm$ desvio padrão das células em estágio inicial apoptótico

(n=3). *** significa diferença estatística do controle, mipafox e (+)-metamidofós (p<0,05). ## significa diferença estatística do controle e (-)-metamidofós (p<0,05). As concentrações usadas para o mipafox (+)-metamidofós e (-)-metamidofós foram, respectivamente, 0,01 mM, 10 mM e 100 mM. Para o grupo controle foi utilizado etanol no mesmo volume dos OPs. Estas concentrações dos OPs foram suficientes para causar pelo menos 80% de inibição da ESNp.

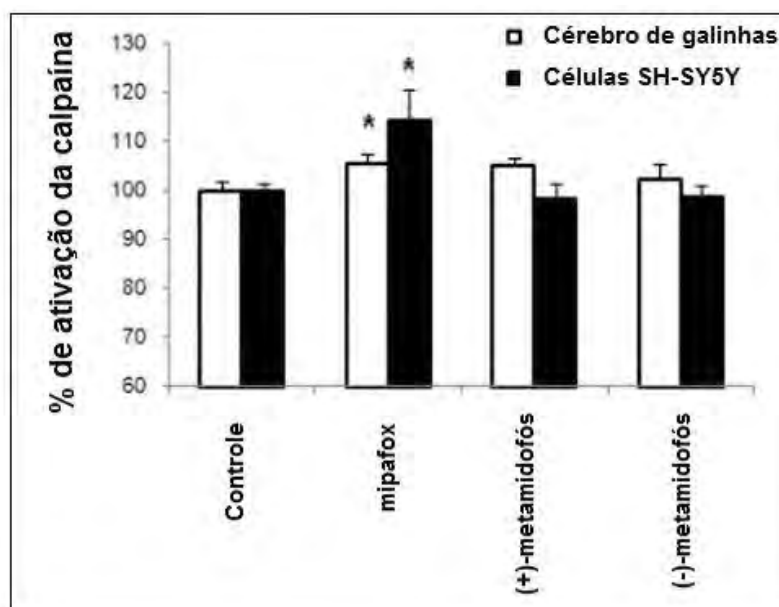


Figura 56: Ativação da calpaína causada pelo mipafox (0,01 mM), (+)-metamidofós (10 mM) e (-)-metamidofós (100 mM) em cérebro de galinhas e em cultura celular depois de 1 hora de incubação à 37°C. Estas concentrações dos OPs foram suficientes para causar pelo menos 80% de inibição da ESNp. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão. * representa diferença estatística em relação ao grupo controle (p<0,05).

Os resultados apresentados na Figura 55 evidenciam que a forma (-)-metamidofós induziu menor proporção de células apoptóticas do que o mipafox e o (+)-metamidofós. Já a Figura 56 mostra que apenas o mipafox foi causador da

ativação da calpaína com diferença significativa em relação ao grupo controle. A Figura 56 também mostra que a ativação da calpaína foi mais acentuada na cultura celular do que no cérebro de galinhas.

7.9 Experimentos *in vivo*

7.9.1 Parâmetros bioquímicos

Neste grupo, foram feitas as dosagens das atividades da AChE, ESNp e calpaína antes da administração de qualquer substância (grupo controle). Após um jejum de doze horas as aves foram sacrificadas e coletadas as amostras. Para a análise de cada parâmetro foram coletadas três amostras e os resultados estão apresentados na Tabelas 36, 37 e 38 e Figuras 57, 58 e 59.

Tabela 36. Valores de % de atividade da ESNp em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.

Grupos	% de atividade 24 horas após o toxicante (média ± desvio padrão)	% de atividade 21 dias após o toxicante (média ± desvio padrão)
controle	100 ± 20,2	100 ± 20,2
TOCP 500 mg/kg	12,7 ± 5,5*	94,4 ± 17,8
(+/-)-metamidofós 50 mg/kg	82,7 ± 19,4	81,9 ± 25,9
(+)-metamidofós 50 mg/kg	43,5 ± 15,4**	81,8 ± 15,0
(-)-metamidofós 50 mg/kg	85,7 ± 5,0	87,7 ± 9,3
TOCP 500 mg/kg + tratamento	-----	86,8 ± 13,0
(+)-metamidofós 50 mg/kg + tratamento	-----	83,2 ± 5,1

N = 3; * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle (p<0,05). ** representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg.

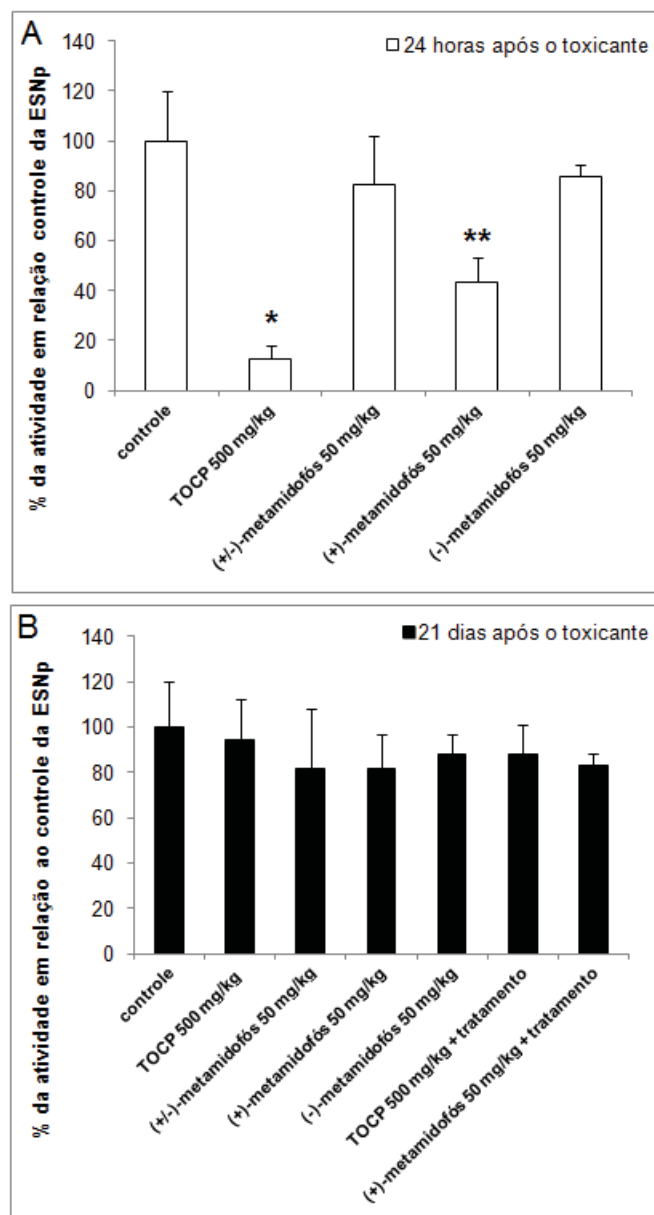


Figura 57: % da atividade da ESNp em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos. Tratamento = 18 horas após a intoxicação, as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino, 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira. N=3, * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ** representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg ($p < 0,05$).

A Tabela 36 e a Figura 57 mostram que apenas no grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg foi notado inibição da ESNp acima de 80% da atividade do grupo controle. Das isoformas do metamidofós, apenas o (+)-metamidofós (50 mg/kg) foi capaz de inibir a ESNp com diferença significativa do grupo controle e também do TOCP (500 mg/kg). Entretanto, 21 dias após a dose do toxicante não foi notada diferença com significância estatística em nenhum dos grupos avaliados.

Tabela 37. Valores de % de atividade da AChE em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.

Grupos	% de atividade 24 horas após o toxicante (média ± desvio padrão)	% de atividade 21 dias após o toxicante (média ± desvio padrão)
controle	100 ± 19,5	100 ± 19,5
TOCP 500 mg/kg	79,9 ± 2,0*	93,9 ± 5,8
(+/-)-metamidofós 50 mg/kg	16,3 ± 10,2**	88,2 ± 7,5
(+)-metamidofós 50 mg/kg	22,3 ± 4,2**	91,5 ± 4,8
(-)-metamidofós 50 mg/kg	13,1 ± 9,5**	85,9 ± 3,0
TOCP 500 mg/kg + tratamento	-----	86,8 ± 4,0
(+)-metamidofós 50 mg/kg + tratamento	-----	95,1 ± 6,6

N = 3; * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ** representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg.

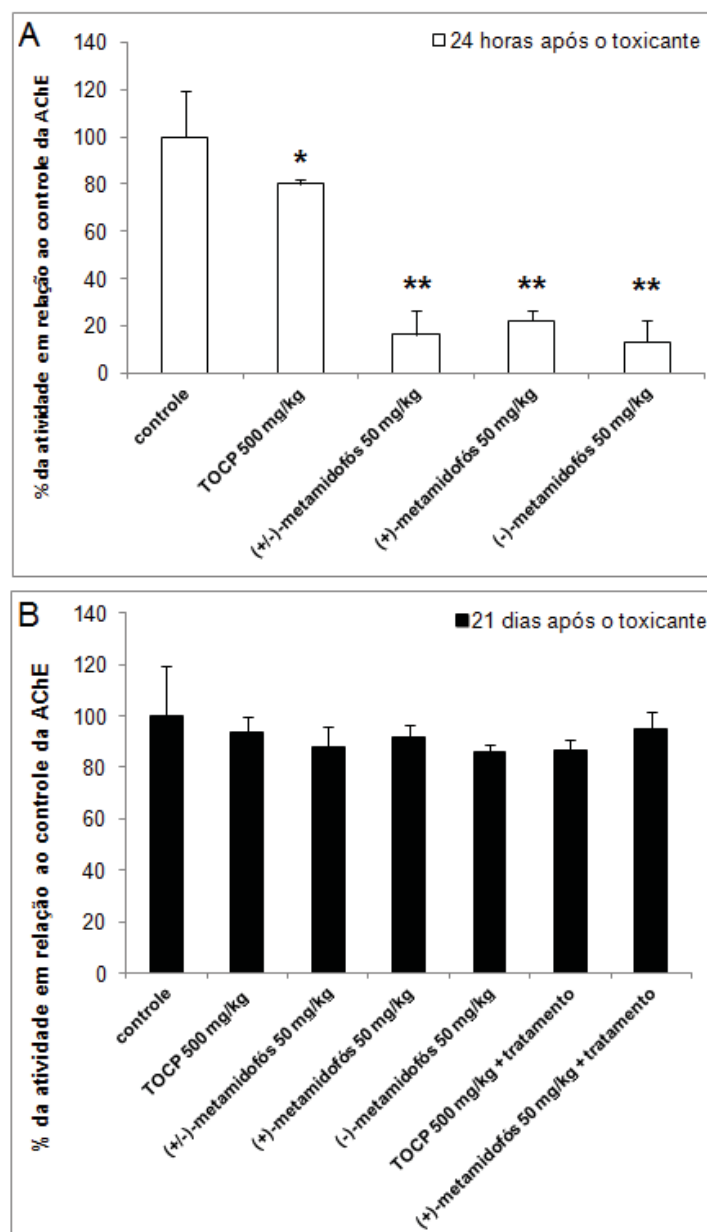


Figura 58: % da atividade da AChE em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos. Tratamento = 18 horas após a intoxicação, as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino, 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira. N=3, * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ** representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg ($p < 0,05$).

A Tabela 37 e a Figura 58 mostram que todas as isoformas do metamidofós na dose de 50 mg/kg provocaram inibição da AChE acima de 80% em relação ao grupo controle. Já o grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg foi notado inibição da AChE em torno de 20% em relação ao grupo controle. No entanto, 21 dias após a dose do toxicante não foi notada diferença com significância estatística em nenhum dos grupos avaliados.

Tabela 38. Valores de % de atividade da calpaína em cérebro de galinhas nos diferentes grupos.

Grupos	% de atividade 24 horas após o toxicante (média ± desvio padrão)	% de atividade 21 dias após o toxicante (média ± desvio padrão)
controle	100 ± 5,7	100 ± 5,7
TOCP 500 mg/kg	139,4 ± 11,1*	117,5 ± 5,7*
(+/-)-metamidofós 50 mg/kg	106,8 ± 4,4	80,6 ± 10,6
(+)-metamidofós 50 mg/kg	108,9 ± 6,4	111,3 ± 6,4*
(-)-metamidofós 50 mg/kg	100,9 ± 3,4	93,3 ± 4,0
TOCP 500 mg/kg + tratamento	-----	107,8 ± 7,8
(+)-metamidofós 50 mg/kg + tratamento	-----	99,6 ± 12,4

N = 3; * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle (p<0,05).

A Tabela 38 e a Figura 59 mostram que todas as isoformas do metamidofós na dose de 50 mg/kg não provocaram ativação da calpaína em cérebro de galinhas em relação ao grupo controle. Já o grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg foi notado ativação da calpaína em torno de 40% em relação ao grupo controle. No entanto, 21 dias após a dose do toxicante foi notada diferença com significância estatística na atividade da calpaína nos grupos que receberam TOCP 500 mg/kg e (+)-metamidofós 50 mg/kg.

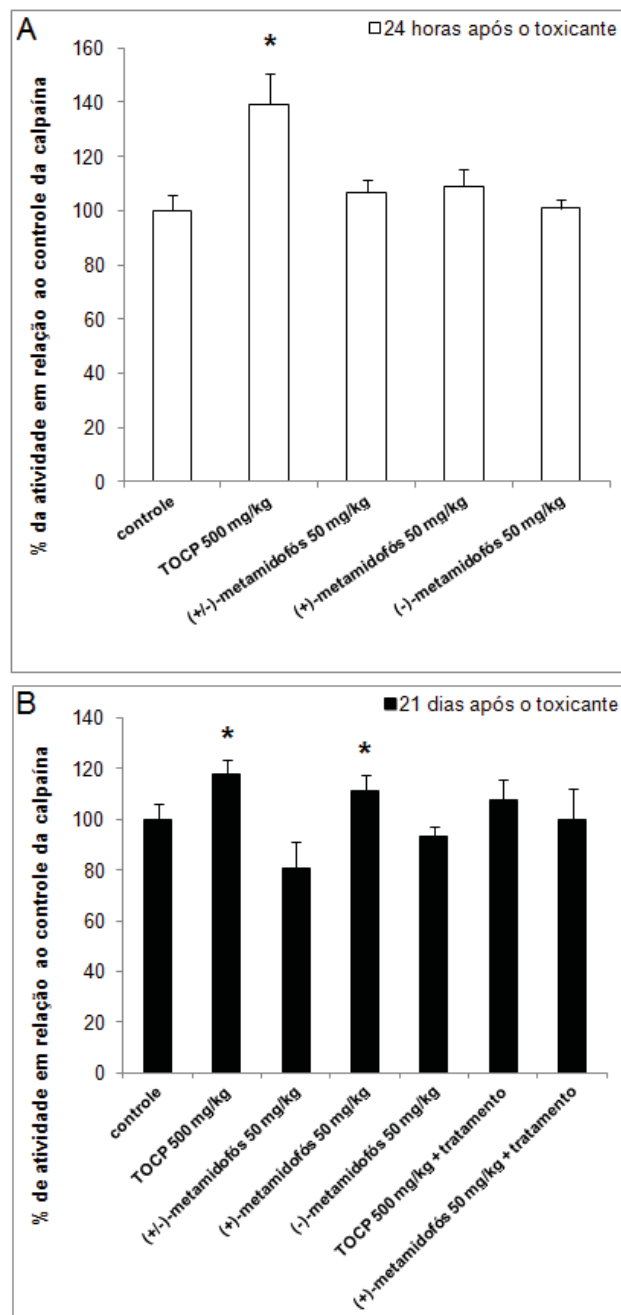


Figura 59: % da atividade da calpaína em cérebro de galinhas 24 horas (A) e 21 dias (B) após a administração dos OPs nos diferentes grupos. Tratamento = 18 horas após a intoxicação, as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira. N=3, * representa diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

7.9.2 Achados histopatológicos

As Figuras 60, 61, 62, 63 e 64 mostram cortes dos tecidos de aves pertencentes aos diferentes grupos avaliados neste trabalho. A Figura 60 ilustra os principais tratos afetados no sistema nervoso central (medula espinhal) de galinhas intoxicadas com OPs neuropáticos. As Figuras 61 e 62 mostram lesões típicas da degeneração axonal do tipo *Walleriana* causadas pelo TOCP, que incluem perda da bainha de mielina, inchaço axonal, coloração densa do axoplasma com material particulado e vacúolos. A Figura 63 mostra que o (+)-metamidofós na dose de 50 mg/kg não foi capaz de induzir as severas lesões que foram induzidas pelo TOCP. Apenas poucos axônios inchados foram notados. Por fim, a Figura 64 ilustra que o tratamento composto pelo nimodipino e gliconato de cálcio foi capaz de impedir o surgimento das lesões histopatológicas observadas quando somente o TOCP foi dado às aves. Não foi notada nenhuma diferença com as isoformas (+/-)- e (-)-metamidofós em relação às galinhas do grupo controle e por isso não estão ilustradas neste trabalho.

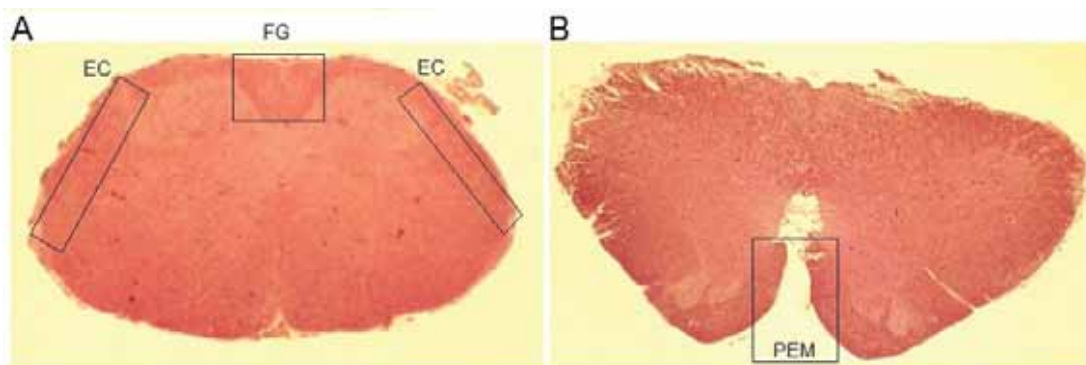


Figura 60: Corte histológico transversal (72x) de porções da medula espinhal de aves normais na porção da amígdala caudal (A) e lombar (B). Os espaços delineados mostram os tratos mais afetados em degenerações axonais do tipo *Walleriana*. EC = trato espino-cerebelar. FG = fascículo grácil. PEM = trato pontino-espinhal medial. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

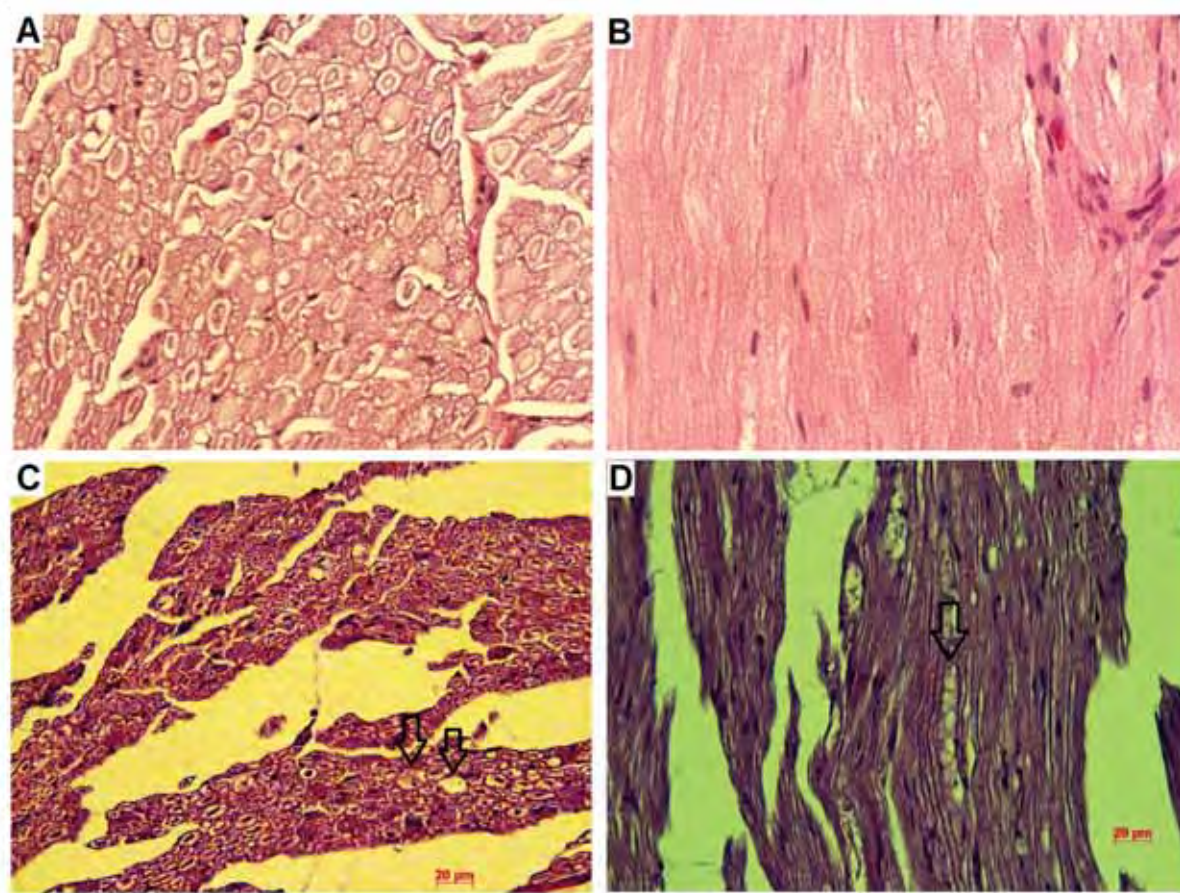


Figura 61: Corte histológico transversal (A e C) e longitudinal (B e D) do nervo ciático de galinhas normais (A e B) e 21 dias depois de receberem 500 mg/kg de TOCP (C e D). A e B mostram fibras íntegras com proporção correta de bainha de mielina em relação ao tamanho do axônio. C e D mostram fibras em colapso com reduzida proporção de bainha de mielina em relação ao tamanho do axônio (setas). Nota-se também inchaço dos axônios (setas). Cortes corados com H&E.

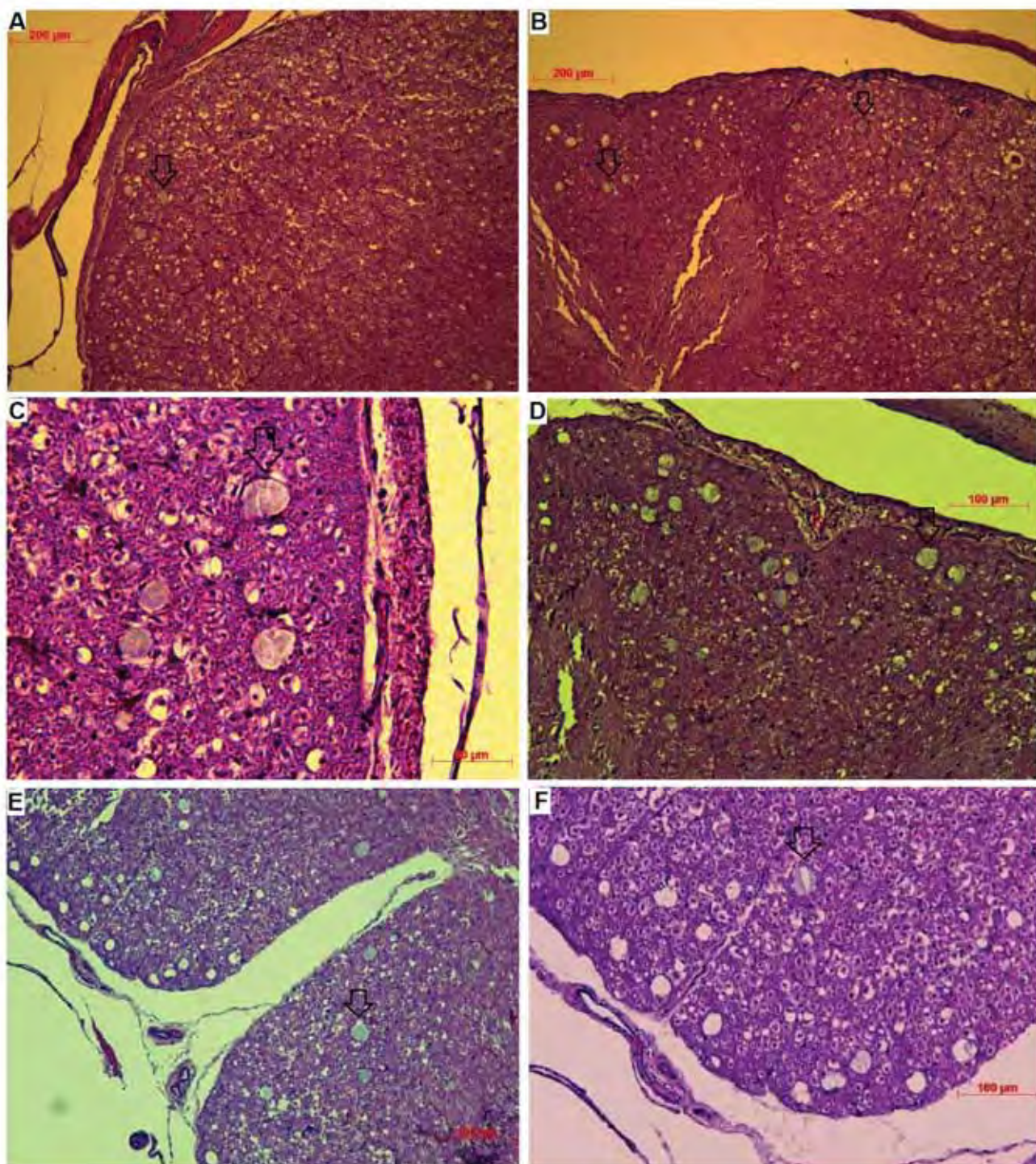


Figura 62: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 500 mg/kg de TOCP via oral. De A a D porção cervical e E e D porção lombar. A e C mostram amplas lesões do trato espino-cerebelar com colapso e inchaço anormal dos axônios (axoplasma corado em cinza) e redução da bainha de mielina (setas). B e D mostram o fascículo grácil com os mesmos tipos de lesões.

Em E e D é possível visualizar o trato pontino-espinhal medial também com amplas lesões (setas). Cortes corados com H&E.

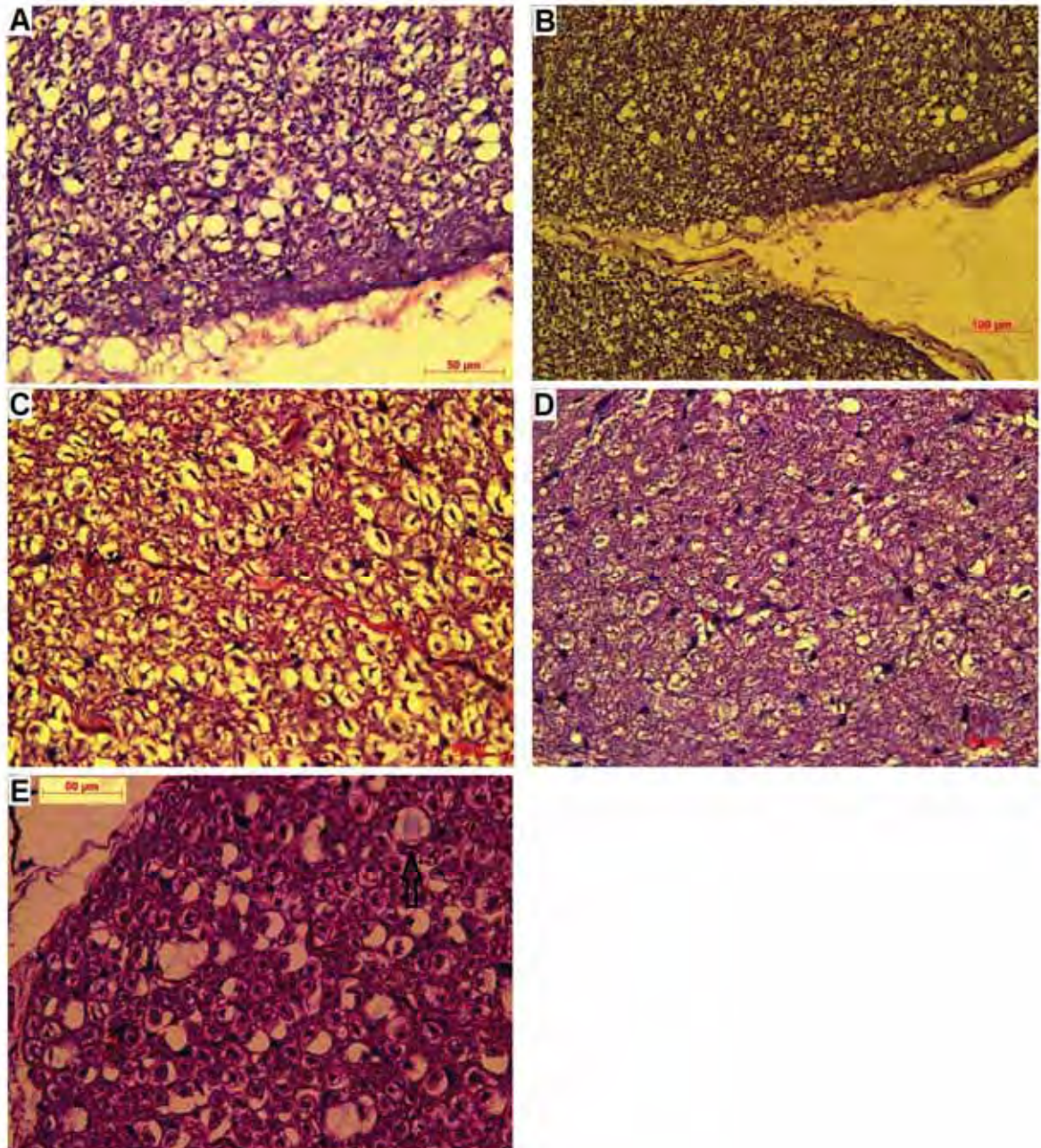


Figura 63: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 50 mg/kg de (+)-metamidofós via oral. (A) e (B) mostram fibras normais do trato pontino-espinhal medial. (C) e (D) mostram fibras normais do trato espino-cerebelar e fascículo grácil. (E) mostra apenas uma fibra do trato pontino-espinhal medial em colapso e desmielinização (seta). Cortes corados com H&E.

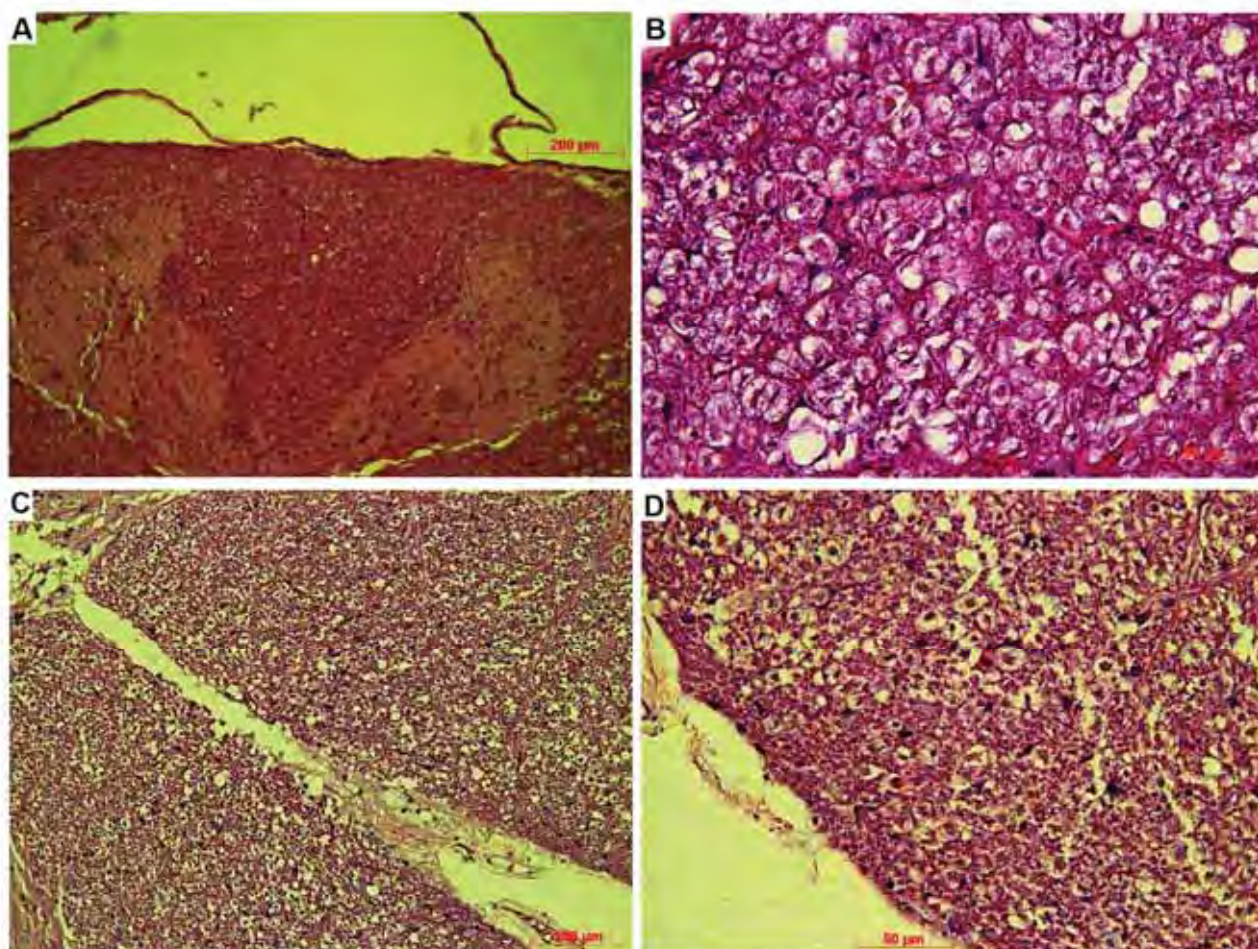


Figura 64: Corte histológico transversal da medula espinhal de aves 21 dias após receberem 500 mg/kg de TOCP via oral mais o tratamento (18 horas após o TOCP, as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino, 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira). (A) e (B) mostram fibras normais dos tratos fascículo grácil e espino-cerebelar, respectivamente. (C) e (D) mostram fibras normais do trato pontino-espinhal medial.

7.9.3 Sinais clínicos

As galinhas foram avaliadas em relação aos sinais de ataxia e a Tabela 39 reflete os escores 21 dias após a dose do toxicante. A Figura 65 ilustra as aves em cada escore.

Tabela 39. Escores de neurotoxicidade 21 dias após as aves receberem doses dos diferentes OPs avaliados neste trabalho.

Grupos	Número de aves avaliadas	número de aves por escore em 21 dias					Soma dos escores
		0	1	2	3	4	
Controle	3	+++	0	0	0	0	0
TOCP 500 mg/kg	3	0	0	++	0	+	8*
(+/-)-metamidofós 50 mg/kg	3	+++	0	0	0	0	0
(+)-metamidofós 50 mg/kg	3	+	++	0	0	0	2
(-)-metamidofós 50 mg/kg	3	+++	0	0	0	0	0
TOCP 500 mg/kg + tratamento	3	+	++	0	0	0	2
(+)-metamidofós 50 mg/kg + tratamento	3	+++	0	0	0	0	0

N = 3, * diferença com significância estatística em relação ao escore zero ($p < 0,05$).

Tratamento = 18 horas após a intoxicação, as aves receberam a primeira dose de 1 mg/kg de nimodipino intramuscular e 30 minutos depois do nimodipino, 5 mg/kg de gliconato de cálcio endovenoso. A segunda dose de nimodipino (1 mg/kg) foi dada 24 horas após a primeira.

A Tabela 39 evidencia que apenas o grupo que recebeu TOCP 500 mg/kg foi capaz de gerar escores de neurotoxicidade diferente estatisticamente do escore zero.

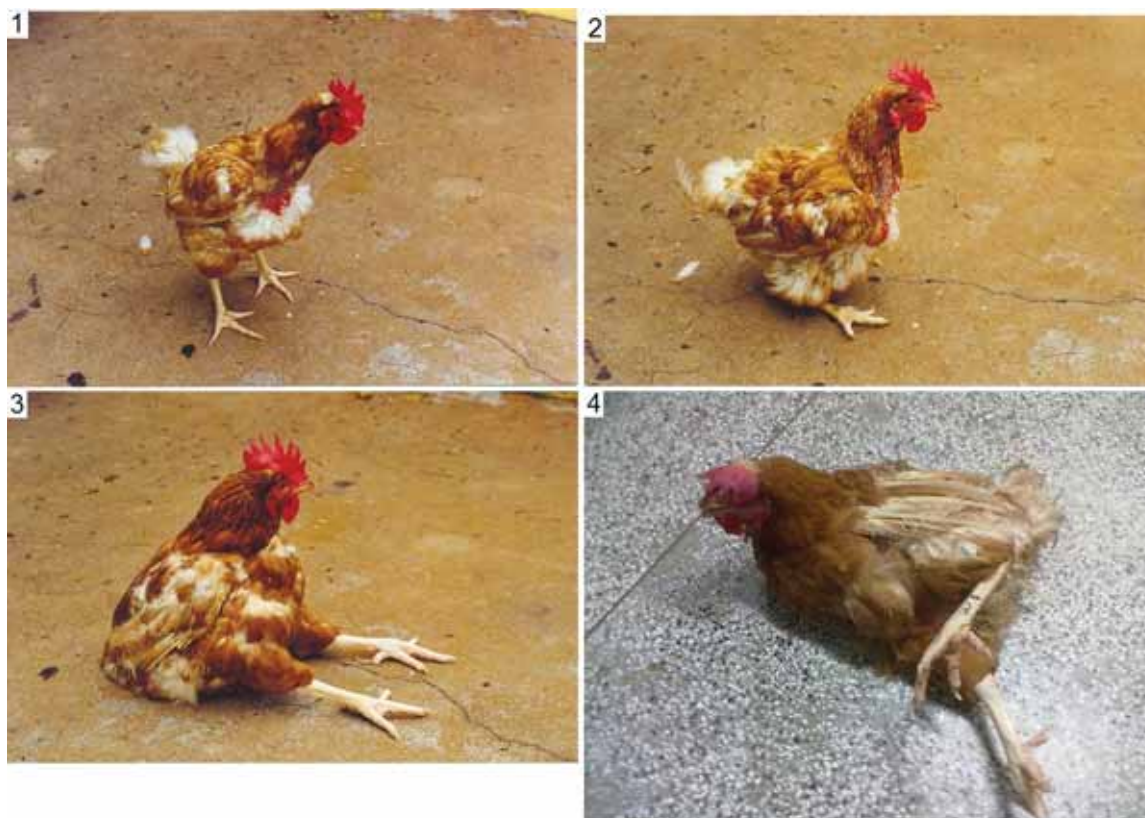


Figura 65: Fotos de galinhas nos diversos escores de neurotoxicidade. Escore 1 = Apresenta leve fraqueza nas pernas. Leve flexão das pernas, mas ainda é capaz de manter-se de pé e andar. Escore 2 = Fraqueza mais acentuada nas duas pernas. A ave apresenta dificuldade de se manter de pé e de se equilibrar para andar. Escore 3 = Paralisia das pernas. As aves não conseguem se levantar e as pernas ficam estendidas, mas ela ainda consegue apoiar-se nas asas para ficar sentada. É necessário auxílio na alimentação das aves. Escore 4 = A galinha permanece em decúbito lateral. A ave não consegue manter-se na posição ereta. Também é necessário auxílio na alimentação das aves. Na maioria das vezes quando a ave atinge este nível, ocorre o óbito.

8. DISCUSSÃO

Devido à interação enantiosseletiva com as enzimas, receptores celulares, ou outras moléculas biológicas que apresentam centros quirais, muitos enantiômeros de compostos da indústria química, farmacêutica e agroquímica podem exibir atividades muito diferentes em sistemas biológicos. Cerca de um quarto de todos os praguicidas utilizados comercialmente são quirais e representam 26% do valor total do mercado de praguicidas do mundo, sendo que a maioria destes praguicidas é vendida na forma de racematos. Normalmente, os enantiômeros de praguicidas têm diferentes bioatividade (TIAN et al., 2007).

Existem duas abordagens para a obtenção de enantiômeros puros: (1) síntese assimétrica e (2) resolução de misturas racêmicas. Uma síntese assimétrica é útil quando um dos dois enantiômeros é o desejo, mas o exaustivo tempo necessário para desenvolver e adequar a síntese e ainda para fornecer rendimentos elevados podem fazer essa abordagem impraticável (ZONGDE et al., 2005). Métodos de resolução através de eletroforese capilar (EC), cromatografia gasosa (GC) e CLAE são as mais eficientes ferramentas de análise para obter a separação quiral de enantiômeros de uma mistura racêmica. Dentre esses métodos, a CLAE é a metodologia mais frequentemente empregada para obter maiores quantidades de enantiômeros individuais, que podem ser recuperados após a separação e, posteriormente, utilizados em testes toxicológicos (NILLOS et al., 2010).

A CLAE é uma das técnicas mais populares utilizadas para a separação e quantificação de enantiômeros. No desenvolvimento de métodos por CLAE, é desejável utilizar FEQ devido à simplicidade e facilidade relacionadas com o emprego destas colunas. Segundo estatísticas da Sociedade Americana de Química (Journal of the American Chemical Society) mais de 90% das separações quirais por

CLAE entre os anos de 2005 e 2007 foram realizadas com FEQs de polissacarídeos (OKAMOTO e IKAI, 2008). Entre as fases quirais de polissacarídeos, aquelas derivadas de celulose e amilose têm mostrado excelente reconhecimento enantiomérico para boa parte dos compostos quirais. FEQs de polissacarídeos foram utilizadas principalmente com fases móveis apolares e se acredita que interações do tipo π - π , dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio sejam responsáveis pela discriminação quiral (TIAN et al., 2007).

O primeiro esforço deste trabalho foi resolver a mistura racêmica do metamidofós em diferentes condições de eluição, utilizando quatro diferentes fases quirais de polissacarídeos (FEQ 1-4). Para conseguir uma melhor separação para o OP selecionado diferentes fases móveis contendo percentuais variados de fase orgânica foram sistematicamente avaliadas (Tabela 4). Em estudos preliminares de solubilidade foi notado que o metamidofós se dissolvia melhor em etanol do que em isopropanol. Por isso, as amostras do metamidofós foram preparadas em etanol. Nas colunas analíticas testadas, não foi possível separar os enantiômeros de metamidofós usando o modo reverso e o modo polar orgânico. Uma explicação para este fato é que o analito tem uma elevada polaridade e fases móveis polares não permitiram interações suficientes para a discriminação quiral entre o OP e a FEQ. Por outro lado, no modo normal, a separação quiral foi possível porque foi proporcionado que o analito entrasse na "cavidade quiral" de modo que houve interações quirais resultando na discriminação entre os enantiômeros. Zongde et al., (2005) propuseram que a separação de racematos por FEQs à base de celulose de amilose foi devido à formação de complexos de soluto-FEQ através da inclusão dos enantiômeros nas cavidades quirais. Neste estudo a FEQ à base de celulose

apresentou uma melhor resolução dos enantiômeros do metamidofós e em um menor tempo de análise.

A primeira fase móvel avaliada foi composta por hexano/isopropanol (80/20) e os parâmetros cromatográficos k , α e R_s obtidos para a FEQ 1 e 3 mostraram baixa resolução ($R_s < 1,0$) e média seletividade ($\alpha = 1,20$ e $1,23$, respectivamente) para os enantiômeros do metamidofós. Diferentes proporções de isopropanol (30, 10, 08 e 5) foram também avaliados para as FEQs 1, 3 ou 4. Dentre estes testes, as melhores resoluções obtidas foram 1,51 e 1,56 com fases móveis compostas por hexano/isopropanol (95/05 e 98/02) com as fases estacionárias FEQ 3 e 4, respectivamente. As substituições do isopropanol pelo etanol e do heptano pelo hexano foram também avaliadas, mas nenhuma melhoria nas resoluções foi obtida.

A constituição da fase móvel na cromatografia quiral exerce importante papel no processo de interação. Isso, não afeta apenas o fator de retenção, mas também a seletividade e a resolução. Com os resultados da Tabela 4 pode-se notar que o fator de retenção da separação quiral do metamidofós aumentou quando se usou alcoóis com maior lipofilicidade como modificador da fase móvel.

Os experimentos no equipamento analítico foram direcionados para que pudessem ser facilmente aplicados no equipamento preparativo, ou seja, boa resolução no menor tempo possível. Como pode ser comprovado pela Figura 12, a melhor resolução obtida com colunas de dimensões de 15 cm de comprimento por 0,46 cm de diâmetro a melhor separação dos enantiômeros do metamidofós foi realizada utilizando fase móvel no modo normal (hexano:isopropanol 95:05 v/v) e fase estacionária do tipo quiral, *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose

Contudo, a fase móvel que obteve excelente resolução com reduzido tempo de retenção (11,5 minutos para o (+)-metamidofós e 15,5 minutos para o (-)-

metamidofós) no sistema preparativo foi aquela composta por hexano:isopropanol (90:10 v/v), como pode ser comprovado pela Figura 19. Isto pode ser explicado pelo fato da coluna semipreparativa apresentar maior diâmetro interno e maior comprimento (20 x 0,7 cm), contribuindo assim para o aumento do tempo de retenção dos compostos e da capacidade de separação em relação àquela observada quando se utilizou a coluna analítica.

Entretanto, esta coluna semipreparativa não foi capaz de separar os isômeros do metamidofós com excelente resolução quando foi injetado maior volume de amostra (Figura 18). Sendo assim, foi necessário realizar um maior número de injeções para se obter a quantidade desejada dos estereoisômeros puros. As Figuras 20 a 22 mostram que os isômeros separados apresentaram elevado grau de pureza quiral e boa estabilidade, uma vez que não foram notados sinais de degradação dos compostos após o isolamento dos enantiômeros. Outro fator positivo deste método de separação enantiomérica foi o bom rendimento das coletas efetuadas. A Tabela 5 comprova que a porcentagem de massa coletada em relação à massa de amostra injetada foi de aproximadamente 90% e a pureza enantiomérica para as duas frações coletadas foi superior a 98%. A Tabela 5 mostra também que, pelo resultado da rotação específica obtida no polarímetro, o primeiro enantiômero coletado apresenta a propriedade de desviar o plano de luz polarizada para direita e o segundo enantiômero desvia o plano de luz polarizada para a esquerda. Com os enantiômeros isolados, o próximo passo deste trabalho foi realizar os ensaios de neurotoxicidade em sangue e SNC de galinhas e em sangue humano e células de neuroblastoma humano.

A avaliação toxicológica de OPs baseia-se principalmente no controle da inibição da AChE, como a causa da síndrome colinérgica aguda, BChE como

marcador da exposição ou da inibição e “envelhecimento” da ESNp como indicador de NRIOP. Há também muitas outras serina hidrolases (esterases do tipo β), incluindo carboxilesterases, que recebem menor atenção em relação à sua possível contribuição para a toxicidade induzida pelos OPs. Serina hidrolases que atuam como fatores de coagulação do sangue e enzimas digestivas também são potencialmente sensíveis à inibição dos OPs, mas estes biomarcadores não se tornaram candidatos claramente definidos para avaliar a neurotoxicidade dos OPs (KEMAL e CASIDA, 1992; QUISTAD e CASIDA, 2000).

Diferenciar a toxicidade dos enantiômeros do metamidofós em relação à BChE pode ser útil para redução dos efeitos provocados pela superexposição destes OPs aos organismos não alvos. Bertolazzi et al. (1991) evidenciaram que o (-)-metamidofós apresentou constante inibitória para a AChE maior do que o (+)-metamidofós. Corroborando estes resultados, Lin et al. (2006) mostraram que o (-)-metamidofós foi mais potente inibidor da AChE bovina do que o (+)-metamidofós. Surpreendentemente, os resultados mostrados no presente trabalho (Figuras de 26 a 31) mostraram que o (+)-metamidofós apresentou menor IC_{50} para a BChE do que o (-)-metamidofós. Esta inversão de toxicidade entre duas α/β hidrolase com 54% de igualdade na sequência de aminoácidos (SHENOUDA et al., 2009) pode ser explicada pelo fato de que a cavidade do centro ativo da BChE é maior do que a da AChE (NICOLET et al., 2003). Com isso, é possível afirmar que os resultados de inibição obtidos com enantiômeros para esterases não podem ser facilmente extrapolados de uma hidrolase para outra, mesmo com a maioria da sequência dos aminoácidos idêntica.

A capacidade que um OP apresenta para induzir a NRIOP é dependente, além da inibição e envelhecimento da ESNp, das relações entre a cinética de

inibição da ESNp e da AChE. De fato, a inibição e envelhecimento de mais de 70% da ESNp (necessário para iniciar a NRIOP) deve ser necessariamente compatível com uma situação que permita que o indivíduo sobreviva a síndrome colinérgica aguda. Embora a sensibilidade da AChE e ESNp seja semelhante em galinhas e humanos, quando uma mistura racêmica é testada, o resultado entre os enantiômeros não é facilmente previsível ou extrapolado de uma espécie para outra. Várias possibilidades podem ocorrer e uma delas é o fato de que podem existir inúmeras diferenças metabólicas entre as espécies, o que tornaria possível a hipótese de que o enantiômero que apresenta maior afinidade pela AChE seja menos metabolizado em galinhas e o enantiômero que apresenta maior afinidade pela ESNp seja menos metabolizado em seres humanos. Esta hipótese levaria a uma conclusão errônea de que o composto não seria capaz de induzir a NRIOP em seres humanos se o teste fosse feito levando em consideração somente os resultados obtidos em galinhas. Portanto, a combinação de estudos *in vitro* em enzimas humanas e de galinhas aliada aos estudos de metabolismo em galinhas se tornariam necessários para predizer se um organofosforado é ou não é capaz de gerar a NRIOP nas duas espécies (BATTERSHILL et al., 2004).

Partindo-se deste princípio, foram feitas as avaliações das inibições da AChE e da ESNp em seres humanos e em galinhas. Primeiramente, as enzimas foram avaliadas sem adição de qualquer inibidor para que fossem dados os valores gerais apresentados na Tabela 9. Em seguida, iniciaram-se os testes de inibição enzimática. A forma (+)-metamidofós apresentou menor IC_{50} (Tabela 35), ou seja, maior toxicidade em relação à ESNp nos linfócitos humanos e de galinhas, em células da linhagem SH-SY5Y e em cérebro de galinhas. Consequentemente, a forma (-)-metamidofós apresentou maior IC_{50} , ou seja, menor toxicidade *in vitro* para

a ESNp em todos os tecidos avaliados. Por outro lado, a forma (-)-metamidofós apresentou menor IC_{50} que a forma positiva para a AChE nos eritrócitos e cultura de células humanas e no cérebro de galinhas. Este fato sugere que o (-)-metamidofós possa gerar uma síndrome colinérgica mais severa do que o (+)-metamidofós.

Foi mostrado também no presente trabalho que, independente da espécie e do tecido avaliado, um mesmo enantiômero do metamidofós apresenta o mesmo comportamento em relação à força de inibição pelas esterases. Ainda, é possível inferir que o modelo *in vitro* de células da linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano apresentou maior sensibilidade e diferença em relação à inibição da ESNp promovida pelos dois enantiômeros do metamidofós. Por outro lado, o cérebro de galinhas foi o tecido que proporcionou a maior diferença em relação à força de inibição dos enantiômeros do metamidofós para a AChE.

As Figuras 27, 29 e 31 a 53 ilustram que as curvas do log da % da atividade das esterases humanas e de galinhas pela concentração das três isoformas do metamidofós apresentaram bons coeficientes de regressão lineares. Com isso, foi possível estimar a IC_{50} das isoformas do metamidofós para as enzimas avaliadas utilizando as curvas semi-log.

Em um estudo prévio, Ehrich et al. (1997) mostraram que a capacidade de um OP ser neuropático ou não pode ser elucidada pela razão das IC_{50} em cultura de células humanas e de ratos. Mais tarde, esta questão foi reiterada por Sogorb et al. (2010) que propuseram uma metodologia alternativa para prever se um OP é capaz de gerar ou não a NRIOP. Ela se baseia na comparação da cinética de inibição *in vitro* de ambas as enzimas (AChE e ESNp) em células nervosas humanas. Os autores testaram 10 OPs (6 neuropáticos e 4 não-neuropáticos) e a única falha observada foi com os compostos da família dos fosforamidatos que geram a NRIOP

pelo envelhecimento da ESNp e também por um mecanismo adicional ainda desconhecido. Segundo estes mesmos autores se a taxa $IC_{50}ESNp/IC_{50}AChE$ for maior do que 5, os compostos não seriam capazes de induzir a neuropatia, pois as concentrações necessárias à inibição e envelhecimento acima de 70% da ESNp não seriam compatíveis com a sobrevivência das aves devido a forte crise colinérgica. Por outro lado, se a taxa $IC_{50}ESNp/IC_{50}AChE$ for menor do que 5 há uma possibilidade do composto ser neuropático desde que ele consiga promover o envelhecimento da ESNp inibida. Para melhor compreensão, a proposta dos autores é ilustrada pela Figura 66. Aplicando-se esta hipótese aos resultados do presente trabalho pode-se notar que a forma (-)-metamidofós não seria capaz de gerar a NRIOP em seres humanos e em galinhas (Tabela 35). Ainda, foi notado que apesar de o (+)-metamidofós apresentar maior possibilidade de causar a NRIOP, esta possibilidade de indução da neuropatia foi bem menor do que aquela apresentada pelo mipafox (Tabela 35 e Figura 54). Entretanto, não se deve concluir que um dos enantiômeros ou a mistura racêmica seja neuropático apenas com estudos *in vitro*. Pois, apesar de ser possível estabelecer uma relação entre a inibição da ESNp e da AChE não se pode esquecer que *in vivo* existem outras variáveis, por exemplo o metabolismo, que podem favorecer o isômero com maior afinidade pela AChE do que aquele que apresenta maior afinidade pela ESNp. Além disso, é necessário uma segunda reação além da inibição da ESNp, conhecida como “envelhecimento” que é pré-requisito fundamental para gerar a NRIOP.

Devido ao fato de o mipafox ser um conhecido indutor da NRIOP e de ser um inibidor direto da ESNp (não precisa ser biotransformado como o TOCP) ele foi usado como controle positivo nos testes *in vitro*. Ao se comparar as relações $IC_{50}ESNp/IC_{50}AChE$ do mipafox com o (+)-metamidofós pode-se observar que o

primeiro apresenta maiores possibilidades de indução da NRIOP do que o segundo. Estes achados dão força aos resultados de Kellner et al. (2000) que afirmaram que a taxa de envelhecimento da ESNp promovida pelos enantiômeros do metamidofós é relativamente baixa e com isso pode-se dizer que o (+)-metamidofós é um fraco indutor da NRIOP quando se compara com os já estabelecidos causadores da NRIOP.

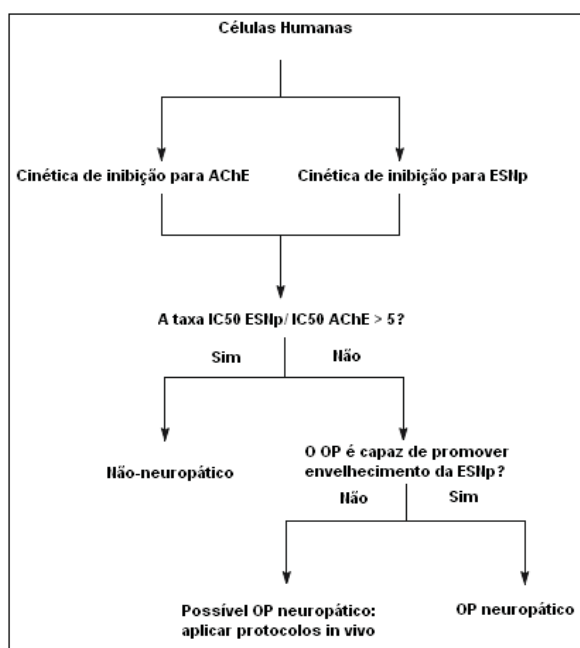


Figura 66: Capacidade de um OP induzir a NRIOP baseando-se em testes *in vitro* em células nervosas humanas (Fonte: SOGORB et al., 2010).

Diferenças toxicológicas entre os estereoisômeros para o potencial de indução da NRIOP foram claramente demonstradas com o metamidofós. O racemato de metamidofós não produz sinais clínicos da NRIOP em testes com galinhas em doses superiores à DL_{50} , quando administrado em conjunto com a terapia profilática contra a toxicidade colinérgica (atropina + pralidoxima). No entanto, a NRIOP foi relatada em humanos após graves incidentes de intoxicação (SENANAYAKE e JOHNSON, 1982). Em uma série de estudos posteriores para elucidar a razão para

o fracasso do teste inicial com galinhas, a administração de altas doses (5 a 7 vezes a DL₅₀ para galinhas) de (+)-metamidofós (seguida pela administração de atropina e oximas) induziu a NRIOP. Mas nenhuma evidência de neuropatia foi observada em estudos similares usando o (-)-metamidofós (BATTERSHILL et al., 2004). Bertolazzi et al. (1991) adotaram a relação entre a constante de inibição da AChE e a constante de inibição da ESNp. Os autores verificaram, assim como no presente trabalho, que a taxa Ki AChE/Ki ESNp do (-)-metamidofós foi muito maior do que a encontrada para a forma positiva. Assim, seria mais provável que a forma (+)-metamidofós possa gerar a NRIOP em seres humanos.

Mecanismos específicos envolvidos na indução de morte celular por OPs *in vitro* não são amplamente descritos, mas o envolvimento de processos apoptóticos é sugerido (CARLSON et al., 2000; QIAN et al., 2007; LIU et al., 2010). No presente trabalho, citometria de fluxo de células de neuroblastoma humano demonstraram que o (+)-metamidofós causou mais apoptose do que o (-)-metamidofós, quando ambos foram estudados em concentrações que causaram mais de 80% de inibição da ESNp (Figura 55). Mipafox, forte indutor da NRIOP, resultou em mais células apoptóticas nas mesmas condições e em menor concentração do que fez os enantiômeros de metamidofós. Assim, estes resultados apóiam os resultados de inibição de esterases encontrados no presente trabalho.

Existem vários trabalhos que descrevem a ativação de proteases cálcio dependentes (calpaínas) em galinhas após a intoxicação por OPs neuropáticos (EL-FAWALL et al., 1990; CHOUDHARY e GILL, 2001; EMERICK et al., 2010). Mas, este é o primeiro trabalho que avaliou a ativação da calpaína após incubação *in vitro* de cérebro de galinhas ou células SH-SY5Y com um OP neuropático (mipafox). Mas esta ativação não se comporta como uma curva concentração-resposta como se

pode observar com a AChE e a ESNp. No mecanismo de degeneração do tipo *Walleriana* já abordado neste trabalho, a entrada excessiva de cálcio ocorre após um período de latência e manutenção do neurônio, ou seja, é preciso que ocorra mais de 70% de inibição e envelhecimento da ESNp para o processo degenerativo se desencadeie. Assim, a concentração dos OPs teria de proporcionar, ao menos, 70% de inibição da ESNp para que houvesse ativação significativa da calpaína. Esta ativação da calpaína foi evidente com o mipáfox nas duas amostras avaliadas, mas com os enantiômeros do metamidofós não foi significativa (Figura 56). Também, foi visto que a ativação foi maior nas células de neuroblastoma humano. Provavelmente porque a cultura celular é relativamente mais pura quando comparada com os vários tipos celulares encontrados no homogenato de cérebro de galinhas.

Para confirmar se realmente a forma (+)-metamidofós poderia induzir a neuropatia nas aves seria necessária a administração das isoformas isoladas com a devida proteção contra a crise colinérgica. A maioria dos casos de neuropatia retardada induzida por organofosforados está associada com a ingestão oral de praguicidas organofosforados (ARAÚJO et al., 2007). Diante desta constatação, é importante discutir a intoxicação aguda via oral destes compostos para evitar o surgimento de graves efeitos irreversíveis após altas doses de organofosforados neuropáticos. A absorção por via oral ocorre em ambientes de trabalho com higiene precária, alimentos contaminados e nas tentativas de suicídio. Após absorvidos, estes compostos e seus produtos de biotransformação são rapidamente distribuídos por todos os tecidos (COSTA, 2007).

A ESNp foi originalmente identificada como alvo dos OPs neuropáticos por Johnson (1969). Por isso, a atividade desta esterase deve ser monitorada em todos os trabalhos que avaliam a capacidade ou não de um OP causar a NRIOP. Os

resultados de inibição da ESNp mostrados na Figura 57 demonstram que 500 mg/kg v.o. de TOCP foram suficientes para causar aproximadamente 90% de inibição da ESNp 24 horas após a dose. Para as formas (+)-, (+/-)- e (-)-metamidofós a inibição 24 horas após 50 mg/kg foi de aproximadamente 60%, 18% e 15%, respectivamente. No entanto, 21 dias após a dose já não foi notada diferença significativa em relação ao grupo controle para nenhum dos compostos avaliados. Isso se deve ao fato de que a síntese protéica se encarregou de substituir as enzimas inativadas pela reação de envelhecimento (GLYNN, 2006). Os resultados de inibição *in vitro* já apontaram que o (+)-metamidofós apresentou maior afinidade pela ESNp do que a forma (-)-metamidofós. Como visto também pelos resultados *in vitro*, apesar de o (+)-metamidofós apresentar maior possibilidade de gerar a NRIOP do que o outro enantiômero do metamidofós, o TOCP, usado como controle positivo (nos estudos *in vitro* foi usado o mipafox), mostrou maior força de indução da NRIOP do que o (+)-metamidofós. Os protocolos para reação de envelhecimento não foram realizados neste trabalho, mas para o TOCP (e para o mipafox) se sabe que a taxa de envelhecimento sempre está muito próxima da taxa de inibição da ESNp de galinhas (NOSTRANDT e EHRICH, 1992). Por outro lado, Kellner et al. (2000) publicaram que a taxa de envelhecimento do isômero (+)-metamidofós foi de 10% do total da ESNp inibida e para o (-)-metamidofós foi de 14%.

Em relação à inibição da AChE *in vivo*, os enantiômeros do metamidofós apresentaram comportamento semelhante. Os dois enantiômeros e a mistura racêmica do metamidofós causaram mais de 80% de inibição da AChE 24 horas após a dose administrada (Figura 58). Por outro lado, o TOCP só causou aproximadamente 20% de inibição da AChE 24 horas após a dose. Estes resultados da inibição *in vivo* da AChE pelos enantiômeros do metamidofós dão suporte à idéia

de que se houvesse inibição e envelhecimento de mais de 70% da ESNp ocorreria uma situação que dificilmente as aves sobreviveriam. Como havia ocorrido com a ESNp, não foi notada diferença significativa na atividade da AChE 21 dias após a dose em relação ao grupo controle para nenhum dos OPs testados.

Ensaio da atividade da calpaína também foram realizados *in vivo*. Como a NRIOP se desenvolve de maneira semelhante à degeneração axonal do tipo *Walleriana*, é comum a ativação de calpaínas após a intoxicação por OP neuropático (EL-FAWALL et al., 1990; CHOUDHARY e GILL, 2001; EMERICK et al., 2010). Não foi diferente com os resultados apresentados pela Figura 59, em que foi constatada ativação da calpaína de 40% 24 horas e de quase 20% 21 dias após a dose de TOCP. No entanto, nenhum dos enantiômeros do metamidofós foi capaz de promover ativação da calpaína com diferença significativa em relação ao grupo controle 24 horas após a dose. Corroborando os resultados obtidos com esterases, em que o (+)-metamidofós apresentou certo potencial para indução da NRIOP em galinhas, foi notada 11% de elevação da atividade desta protease 21 dias após a dose de 50 mg/kg de (+)-metamidofós.

Alterações neuropatológicas causadas pelo TOCP em galinhas foram primeiramente descritas por Cavanagh (1954). Pelo conhecimento desta degeneração na época se trabalhava com 2 hipóteses: (1) a origem das lesões seria na bainha de mielina (mielinopatia) ou (2) as lesões primárias ocorriam no axônio (axonopatias tipo Walleriana) e isso causava a perda da bainha de mielina. Mais tarde, com outros achados histopatológicos e bioquímicos ficou estabelecido como axonopatia (JORTNER, 2000). Lesões no trato espinho-cerebelar foram encontradas acima da C7 e foram caracterizadas por fibras inchadas em forma de balões,

redução significativa da bainha de mielina e axoplasma com aspecto granular (CAVANAGH, 1954).

No presente trabalho também ocorreram estas lesões no trato espino-cerebelar e fascículo grácil na porção cervical, trato pontino-espinal medial (porção lombar) da medula espinal do grupo que recebeu apenas 500 mg/kg de TOCP (Figura 62). Estes tratos da medula espinal são mais afetados por este tipo de neuropatia, pois se trata de axonopatia distal e o trato espino-cerebelar tem sua origem na porção lombo-sacral e se estende até o cerebelo (o próprio nome do trato é explicativo). Ou seja, a porção mais distal se encontra próximo das vértebras C1-C3. Esta regra também vale para o trato pontino-espinal medial, ou seja, origem na ponte e porção distal próximo a região lombo-sacral. Além disso, na porção distal do nervo ciático também foi visualizado estes mesmos tipos de lesões tanto no corte transversal como no corte longitudinal (Figura 61). Estas lesões não foram visualizadas nos grupos tratados com (+/-)- e (-)-metamidofós. No grupo tratado com (+)-metamidofós (Figura 63) foram visualizadas poucas lesões isoladas na medula espinal com características da axonopatia do tipo *Walleriana*. Estes achados neuropatológicos corroboram os resultados bioquímicos que confirmaram o forte potencial de indução da NRIOP do TOCP e um certo potencial de indução do (+)-metamidofós mesmo em uma dose 10 vezes menor do que a de TOCP.

Este tipo de coloração utilizada na confecção dos cortes não é possível visualizar estas lesões no cérebro, uma vez que existem mais corpos celulares do que axônios. Seria necessário utilizar colorações especiais como impregnação pela prata (TANAKA e BURSIAN, 1989). De fato, a coloração por H&E não é a mais apropriada para visualização de axônio e de bainha de mielina. Para este tipo de

tecido, seriam mais indicados corantes que apresentem maior afinidade para corar gorduras, como a toluidina e safranina (JORTNER, 2000; 2011).

Para a avaliação dos sinais de neurotoxicidade foi utilizada a escala descrita por Oliveira, et al. (2002) que é usada desde então por nosso grupo de trabalho. Segundo protocolos da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD 418, 1995; OECD 419, 1995) para avaliar a neurotoxicidade retardada de organofosforados é necessário que haja observação do comportamento motor das galinhas por 21 ou 28 dias. O tempo escolhido para avaliação foi por 21 dias, pois de acordo com Ehrich et al. (1993) as maiores alterações histopatológicas são vistas por volta de três semanas após a dose. Assim, as aves foram avaliadas durante um período de 21 dias e classificadas numa escala de zero a quatro, de acordo com a severidade da ataxia. A soma dos escores obtida com as três aves do grupo controle positivo foi de 08, o que é significativamente diferente do escore zero (Tabela 39). Como havia ocorrido com os parâmetros anteriores, somente o grupo controle positivo (TOCP 500 mg/kg) apresentou significância em relação ao grupo controle. Nenhum dos outros grupos apresentou sinais de ataxia com diferença significativa em relação ao escore zero. Apenas duas aves do grupo que recebeu TOCP + tratamento e duas aves do grupo que recebeu (+)-metamidofós apresentaram leves sinais de ataxia, mas sem diferença significativa em relação ao grupo controle.

No processo de degeneração axonal causada por OPs neuropáticos tem sido constatado que após a inibição e envelhecimento da ESNp há um desequilíbrio na homeostasia do cálcio que desencadeia a ativação de proteases responsáveis pela proteólise do citoesqueleto (LOPACHIN e LEHNING, 1997). Com o objetivo de impedir este desequilíbrio do cálcio foi testado o tratamento baseado, principalmente, na estratégia desenvolvida por Emerick et al. (2010). A diferença é

que no presente trabalho foram administradas duas doses de nimodipino com intervalo de 24 horas entre cada dose. Como já era esperado e pode ser observado nas Figuras 57 e 58, a administração do nimodipino e do gliconato de cálcio não influenciaram na atividade da ESNp e da AChE. Em contrapartida, esta estratégia de tratamento foi capaz de impedir a ativação da calpaína (Figura 59), o surgimento das lesões histopatológicas (Figura 64) e o desenvolvimento dos graves sinais de ataxia ilustrados pela Figura 65. Emerick et al. (2010) conseguiram provar a redução dos graves sinais de ataxia causados pelo TOCP com uma dose de nimodipino e uma dose de gliconato de cálcio. No entanto, os autores não realizaram avaliação histopatológica e as duas doses de nimodipino intercaladas por uma dose de gliconato de cálcio evitou o surgimento das lesões características da degeneração do tipo *Walleriana*.

Finalmente, é possível concluir e ter uma idéia sobre a avaliação da neurotoxicidade de enantiômeros de praguicidas OPs. Neste trabalho se utilizou o metamidofós, mas outros OPs que apresentem centro quiral podem ser avaliados. A maioria destes compostos está disponível no mercado na forma de racemato, mas a toxicidade é enantiosseletiva e para se obter sucesso na caracterização dos efeitos dos enantiômeros isolados é preciso iniciar com o desenvolvimento de um método de obtenção dos isômeros. A CLAE é a técnica mais comum, mas outros autores já utilizaram a síntese assimétrica (MIYAZAKI et al., 1988; KELLNER et al., 2000). A grande limitação neste processo de avaliação é o rendimento de obtenção dos enantiômeros. Lotti et al. (1995) usaram doses de 25 mg/kg para o (+)-metamidofós e de 120 mg/kg para o (-)-metamidofós. Johnson et al. (1991) indicaram que 200 mg/kg (8 x DL₅₀) de (+)-metamidofós seria neuropático para galinhas, mas 200 mg/kg de (-)-metamidofós não seria. Executamos testes iniciais com 80 mg/kg de

mistura racêmica associada à terapia profilática com atropina e os animais não sobreviviam até o terceiro dia após a dose. Analisando a inibição da AChE (> 80%) provocada por 50 mg/kg não seria fácil manter estes animais vivos por 21 dias com doses tão altas (200 mg/kg). Pelo rendimento obtido com o método de CLAE desenvolvido por Emerick et al. (2012a) (APÊNDICE C) não seria possível testar doses elevadas e é neste contexto que entra o método de avaliação *in vitro* (EMERICK et al., 2012b) (APÊNDICE D) que auxilia na triagem de compostos neuropáticos e pode dar o rumo certo na avaliação. De qualquer maneira, foi possível identificar diferenças na neurotoxicidade dos enantiômeros do metamidofós, mas a diferença entre a indução da NRIOP na espécie humana (MCCONNELL et al., 1999) e a não indução na galinha pelo (+/-)-metamidofós é algo que ainda intriga. Bertolazzi et al. (1991) sugeriram que esta diferença está na alta taxa de reativação espontânea da AChE humana, juntamente com outros fatores, incluindo tratamento (como a ventilação artificial, que está disponível só para o homem). Por outro lado, existem diferenças metabólicas entre o homem e a galinha que podem exercer papel nesta diferença de comportamento de indução da NRIOP e isso pode ser uma próxima etapa para o grupo de pesquisa em questão realizar.

9. CONCLUSÕES

- O método semipreparativo de separação por CLAE desenvolvido apresentou boa resolução entre os enantiômeros do metamidofós, com baixo tempo de retenção, elevado grau de pureza quiral e boa recuperação quando se utilizou a fase estacionária do tipo *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, com emprego de fase móvel composta por hexano:2-propanol (90:10 v/v).

- Pode-se dizer também que foram constatadas diferenças significativas entre as IC_{50} das três isoformas do metamidofós em relação às taxas de inibição *in vitro* das enzimas BChE, AChE e ESNp. A forma (+)-metamidofós apresentou IC_{50} cerca de 6 vezes menor do que a forma (-)-metamidofós para a ESNp linfocitária de galinhas e cerca de 4 vezes menor para a ESNp linfocitária humana. Por outro lado, a forma (-)-metamidofós apresentou IC_{50} cerca de 11 vezes menor do que a forma (+)-metamidofós para a AChE em cérebro de galinhas e cerca de 8 vezes menor para a AChE eritrocitária humana.

- Também foram constatadas diferenças significativas entre os resultados de inibição analisados entre as duas espécies. O metamidofós (todas as formas isoméricas) se mostrou mais tóxico para a espécie humana do que para as aves, pois todas as IC_{50} obtidas em amostras humanas foram menores do que aquelas obtidas em amostras de galinhas. Levando-se em conta somente os resultados *in vitro* da razão IC_{50} ESNp/ IC_{50} AChE e da calpaína pode-se dizer que a forma (+)-metamidofós apresentou maior possibilidade de induzir a NRIOP tanto no homem quanto na galinha do que a forma (-)-metamidofós.

- A análise bioquímica (ESNp, AChE e calpaína), histopatológica (medula espinhal e nervo ciático) e clínica (sinais de ataxia) da intoxicação das formas enantioméricas do metamidofós em galinhas indicou que o (+)-metamidofós apresentou potencial de indução da NRIOP em galinhas mesmo com a dose de 50 mg/kg. Esta análise indicou também que o tratamento com duas doses de nimodipino (com intervalo de 24 horas entre cada dose) e uma dose de gliconato de cálcio 30 minutos depois da primeira dose de nimodipino foram suficientes para impedir a ativação das calpaínas, o surgimento de lesões histopatológicas e de sinais clínicos da NRIOP causados pelo TOCP. Estes resultados dão fortes indicativos de que esta estratégia de tratamento é eficaz (até 18 horas após a intoxicação) e poderá ser considerada candidata para uso em seres humanos intoxicados por OPs neuropáticos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-DONIA, M.B. Organophosphorus ester-Induced chronic neurotoxicity. **Arch. Environ. Health**, v.58, p.484-497, 2003.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA [ANVISA]. Decreto nº 4074 de 04 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília (DF), 04 jan 2002.
3. AKASSOGLU, K.; MALESTER, B.; XU, L.; TESSAROLLO, J.; ROSENBLUTH, M.V. Chao, Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swiss cheese results in neurodegeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, p.5075–5080, 2004.
4. AMORIN, M.; MOREIRA, H.M.; FERREIRA, H.P. A Homeopatia na prevenção das doenças de origem ambiental por agrotóxicos: um estudo de caso com engenheiros agrônomos e técnicos agrícolas. 2003. 117f. (dissertação de mestrado). FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2003.
5. ARANGO, H.G. **Bioestatística Teórica e Computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 235 p.
6. ARAÚJO, A.J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M.O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, p.115-130, 2007.
7. BALLARD, R.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J. Changes in the activity of skeletal muscle calcium-activated neutral proteinase (EC 3.4.22.17) and its specific inhibitor in chickens grown at different rates in response to graded levels of dietary protein. **Br. J. Nutr.**, v.59, p.141-147, 1988.
8. BATTERSHILL, J.M.; EDWARDS, P.M.; JOHNSON, M.K. Toxicological assessment of isomeric pesticides: a strategy for testing of chiral organophosphorus (OP) compounds for delayed polyneuropathy in a regulatory setting. **Food Chem. Toxicol.**, v.42, p.1279-1285, 2004.
9. BERNARDI, C.C.; RIBEIRO, E.S.F.; CAVALLI, I.J.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SOUZA, R.L.R. Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.197, p.158-165, 2010.
10. BERTOLAZZI, M.; CAROLDI, S.; MORETTO, A.; LOTTI, M. Interaction of methamidophos with hen and human acetylcholinesterase and neuropathy target esterase. **Arch. Toxicol.**, v.65, p.580-585, 1991.
11. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of Protein-Dyie Binding. **Anal. Chem.**, v.72, p.248-254, 1976.

12. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agronegócio. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 3 mar. 2009
13. BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Dispõe sobre aprovar as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF.
14. BUROKER-KILGORE, M.; WANG, K.K.W. A coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. **Anal. Biochem.**, v.208, p.387-392, 1993.
15. CARLSON, K.; JORTNER, B.S.; EHRICH, M. Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.168, p.102-113, 2000.
16. CAVANAGH, J.B. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system: an experimental study in hens. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.17, p.163-172, 1954.
17. CHOUDHARY, S.; GILL, K.D. Protective effect of nimodipine on dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat brain. **Biochem. Pharmacol.**, v.62, p.1265-1272, 2001.
18. CORRELL, L.; EHRICH, M. A microassay method for neurotoxic esterase determinations. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v.16, p. 110-116, 1991.
19. COSTA, L.G. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 7th.ed. New York: McGraw-Hill. 2007. cap.22, p.883-930.
20. ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides In: CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Toxicology: the basic science of poisons**. 6th.ed. New York: McGraw-Hill. 2001. cap.22, p.763-785.
21. EHRICH, M.; CORRELL, L.; CARLSON, K.; WILCKE, J.; VERONESI, B. Examination of culture conditions on esterase activities in human and mouse neuroblastoma cells. **In Vitro Toxicol.**, v.8, p.199-207, 1995.
22. EHRICH, M.; CORRELL, L.; VERONESI, B. Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase inhibitions in neuroblastoma cells to distinguish organophosphorus compounds causing acute and delayed neurotoxicity. **Fund. Appl. Toxicol.** v.38, p.55-63, 1997.
23. EL-FAWAL, H.A.N.; CORRELL, L.; GAY, L.; EHRICH, M. Protease activity in brain, nerve and muscle of hens given neuropathy-inducing organophosphates and a calcium channel blocker. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.130, p.133-142, 1990.
24. ELLINGTON, J.J.; EVANS, J.J.; PRICKETT, K.B.; CHAMPIONJR, W.L. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of

- organophosphorus pesticides on polysaccharide chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, v.928, p.145-154, 2001.
25. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, p.88-95, 1961.
 26. EMERICK, G.L.; PECCININI, R.G.; OLIVEIRA, G.H. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: a simple and efficient therapeutic strategy. **Toxicol. Lett.**, v.192, p.238-244, 2010.
 27. EMERICK, G.L.; OLIVEIRA, R.V.; BELAZ, K.R.A.; GONÇALVES, M.; DeOLIVEIRA, G.H. Semipreparative enantioseparation of methamidophos by hplc-uv and preliminary in vitro study of butyrylcholinesterase inhibition. **Environ. Toxicol. Chem.**, doi: 10.1002/etc.729, 2012a.
 28. EMERICK, G.L.; DeOLIVEIRA, G.H.; OLIVEIRA, R.V.; EHRICH, M. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. **Toxicology**, doi:10.1016/j.tox.2011.12.004, 2012b.
 29. GAGNAIRE, B.; GEFFARD, O.; XUEREB, B.; MARGOUM, C.; GARRIC, J. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). **Chemosphere**, v.71, p.553-560, 2008.
 30. GAWLEY, R.E. Do the terms “%ee” and “%de” make sense as expressions of stereoisomer composition or stereoselectivity? **J. Org. Chem.**, v.71, p.2411-2416.
 31. GLYNN, P. Neural development and neurodegeneration: Two faces of neuropathy target esterase. **Progress Neurobiol.**, v.61, p.61-74, 2000.
 32. GLYNN, P. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy. **Toxicol. Lett.**, v.162, p.94-97, 2006.
 33. GLYNN, P. Axonal degeneration and neuropathy target esterase. **Arh. Hig. Rada Toksikol.**, v.58, p.355-358, 2007.
 34. GREINER, A.J.; RICHARDSON, R.J.; WORDEN, R.M.; OFOLI, R.Y. Influence of lysophospholipid hydrolysis by the catalytic domain of neuropathy target esterase on the fluidity of bilayer lipid membranes. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1798, p.1533-1539, 2010.
 35. GUIMARÃES, L.F.L.; COLLINS, C.H. Cromatografia líquida de alta eficiência In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. cap.09, p.183-238.

36. JOHNSON, M.K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds: identification of the phosphorylation site as an esterase. **J. Biochem.**, v.114, p.711-714, 1969.
37. JOHNSON, M.K. The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. **J. Neurochem.**, v.23, p.785-789, 1974.
38. JOHNSON, M.K. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of hen brain neurotoxic esterase. **Biochem. Pharmacol.**, v.24, p.797-805, 1975.
39. JOHNSON, M.K. The target site for the initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorous esters: biochemical studies and toxicological applications. In: HODGSON, J.R.; PHILIPOT, R.M. (Eds). **Rev. Biochem. Toxicol.**, v.4, p.141-212, 1982.
40. JOHNSON, M.K.; VILANOVA, E.; READ, D.J. Anomalous biochemical responses in tests of the delayed neuropathic potential of methamidophos (O,S-dimethyl phosphorothioamidate), its resolved isomers and of some higher O-alkyl homologues. **Arch. Toxicol.**, v.65, p.618-624, 1991.
41. JOHNSON, M.K.; GLYNN, P. Neuropathy target esterase (NTE) and organophosphorus-induced delayed polyneuropathy (OPIDP): recent advances. **Toxicol. Lett.**, v.82/83, p.459-463, 1995.
42. JOHNSON, M.K.; JACOBSEN, D.; MEREDITH, T.J.; EYER, P.; HEATH, A.J.; LIGTENSTEIN, D.A.; MARRS, T.C.; SZINICZ, L.; VALE, J.A.; HAINES, J.A. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. **Emerg. Med.**, v.12, p.22-37, 2000.
43. JORTNER, B.S. Mechanisms of toxic injury in the peripheral nervous system: neuropathologic considerations. **Toxicol. Pathol.**, v.28, p.54-69, 2000.
44. JORTNER, B.S.; HANCOCK, S.K.; HINCKLEY, J.; FLORY, L.; COLBY, L.; TOBIAS, L.; WILLIAMS, L.; EHRICH, M. Neuropathological studies of rats following multiple exposure to tri-ortho-tolyl phosphate, chlorpyrifos and stress. **Toxicol Pathol.**, v.33, p.378-385, 2005.
45. JORTNER, B.S. Preparation and analysis of the peripheral nervous system. **Toxicol Pathol.**, v.39, p.66-72, 2011.
46. KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry** – theory analysis and correlation. 2nd.ed. St. Louis Missouri. 1989. p.29-39.
47. KELLNER, T.; SANBORN, J.; WILSON, B. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of impurities and chirality on methamidophos-induced neuropathy target esterase aging. **Toxicol. Sci.**, v.54, p.408-415, 2000.
48. KEMAL, C.; CASIDA, J.E. Coenzyme a esters of 2-aryloxyphenoxypropionate herbicides and 2-arylpropionate antiinflammatory drugs are potent and

- stereoselective inhibitors of rat liver acetyl-CoA carboxylase. **Life Sci.**, v.50, p.533-540, 1992.
49. KURIHARA, N.; MIYAMOTO, J.; PAULSON, G. D.; ZEEH, B.; SKIDMORE, M. W.; HOLLINGWORTH, R. M.; KUIPER, H. A. Chirality in synthetic agrochemicals: bioactivity and safety consideration. **Pure App. Chem.**, v. 69, p. 2007-2025, 1997.
 50. LEFFINGWELL, J.C.; Chirality & bioactivity I.: pharmacology. **Leffingwell Reports**, v.3, p.1-27, 2003.
 51. LIN, K.; ZHOU, S.; XU, C.; LIU, W. Enantimeric resolution and biotoxicity of methamidophos. **J. Agric. Food. Chem.**, v.54, p.8134-8138, 2006.
 52. LIU, C.Y.; CHANG, P.A.; WU, Y.J. Trichlorfon induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the endoplasmic reticulum? **Chem. Biol. Interact.** v.181, p.37-44, 2010.
 53. LOPACHIN, R.M.; LEHNING, E. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.143, p.233-244, 1997.
 54. LOTTI, M.; MORETTO, A.; BERTOLAZZI, M.; PERAICA, M.; FIORONI, F. Organophosphate polyneuropathy and neuropathy target esterase: studies with methamidophos and its resolved optical isomers. **Arch. Toxicol.**, v.69, p.330-336, 1995.
 55. MAIER, N.M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **J. Chromatogr. A**, v.906, p.3-33, 2001.
 56. MARONI, M.; BLEECKER, M.L. Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. **J. Appl. Toxicol.**, v.6, p.1-7, 1986.
 57. MCCONELL, R.; TÉLLEZ, E.D.; CUADRA, R.; TORRES, E.; KEIFER, M.; ALMENDÁREZ, J.; MIRANDA, J.; EL-FAWAL, H.A.N.; WOLFF, M.; SIMPSON, D.; LUNDBERG, I. Organophosphate neuropathy due to methamidophos: biochemical and neurophysiological markers. **Arch. Toxicol.**, v.73, p.296-300, 1999.
 58. MIYAZAKI, A.; NAKAMURA, T.; KAWARADANI, M.; MARUMO, S. Resolution and biological activity of both enantiomers of methamidophos and acephate. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, p.835-837, 1988.
 59. MORETTO, A. Promoters and promotion of axonopathies. **Toxicol. Lett.**, v.112-113, p.17-21, 2000.
 60. NILLOS, M.G.; GAN, J.; SCHLENK, D. Chirality of organophosphorus pesticides: Analysis and toxicity. **J. Chromatogr. B**, v.878, p.1277-1284, 2010.
 61. NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P.; FONTECILL-CAMPS, J.C.; NACHON, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes substrates and products. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.41141-41147, 2003.

62. NOSTRANDT, A.C.; EHRICH, M. Development of a model cell culture system in which to study early effects of neuropathy-inducing organophosphorus esters. *Toxicol Lett.*, v.60, p.107-114, 1992.
63. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1995. Test No. 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure.
64. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1995. Test No. 419: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study.
65. OKAMOTO, Y.; IKAI, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chem. Soc. Rev.*, v.37, p.2593-2608, 2008.
66. OLIVEIRA, G.H.; MOREIRA, V.; GOES, S.P.R. Organophosphate induced delayed neuropathy in genetically dissimilar chickens: studies with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) and trichlorfon. *Toxicol. Lett.*, v.136, p.143-150, 2002.
67. PERES, F.; ROZEMBERG, B.; ALVES, S.R.; MOREIRA, J.C.; OLIVEIRA-SILVA, J.J. Pesticide use reporting in a rural area of Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Saúde Pública*, v.35, 564-570, 2001.
68. PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA M.C.P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, no.3, p.804-814, Jun. 2005a.
69. PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA M.C.P. Uso de agrotóxicos e suicídios no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, no.2, p.598-604, Abr. 2005b.
70. POPE, C.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.19, p.433-446, 2005.
71. POPE, C.N. Central nervous system effects and neurotoxicity. In: GUPTA, R.C. (Ed.) **Toxicology of organophosphate and carbamate compounds**. San Diego: Elsevier Academic Press. 2006. cap. 20, p. 271-291.
72. QIAN, Y.; VENKATRAJ, J.; BARHOUMI, R.; PAL, R.; DATTA, A.; WILD, J.R.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Comparative non-cholinergic neurotoxic effects of paraoxon and diisopropyl fluorophosphate (DFP) on human neuroblastoma and astrocytoma cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.219, p.162-171, 2007.
73. QUISTAD, G. B.; CASIDA, J. E. Sensitivity of blood-clotting factors and digestive enzymes to inhibition by organophosphorus pesticides. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v.14, p.51-56, 2000.
74. SALVI, R.M.; LARA, D.R.; GHISOLFI, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Sci.*, v.72, p.267-271, 2003.

75. SCHWAB, B.W.; RICHARDSON, R.J. Lymphocyte and brain neurotoxic esterase: dose and time dependence of inhibition in the hen examined with three organophosphorus esters. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 83, 1–9, 1986.
76. SCHLAEPFER, W.W.; BUNGE, R.P. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. **The Journal of Cell Biology**, v.59, p.456–470, 1973.
77. SENANAYAKE, N.; JOHNSON, M.K. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphorus insecticide. **The New England J. Med.**, v.306, p.155-157, 1982.
78. SHENOUDA, J.; GREEN, P.; SULTATOS, L. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.241, p.135-142, 2009.
79. SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M.; SALLES, J.B.; BASTOS, V.L.F.C.; CASSANO, V.P.F.; BASTOS, J.C. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicol Lett.**, v.153, p.247-254, 2004.
80. SILVA, J.M.; FARIA, H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M. **Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos**. Brasília. Ministério da saúde. 2006.
81. SINITOX- Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológicas. **Estatística Anual de casos de Intoxicação e Envenenamento**. Rio de Janeiro. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Informação Científica e Tecnológica. 2009.
82. SOGORB, M.A; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, I.; PAMIES, D.; VILANOVA, E. An alternative in vitro method for detecting neuropathic compounds based on acetylcholinesterase inhibition and on inhibition and aging of neuropathy target esterase (NTE). **Toxicology In vitro**, v.24, p.942-952, 2010.
83. SLOTKIN, T.A.; SEIDLER, F.J. Developmental exposure to organophosphates triggers transcriptional changes in genes associated with Parkinson's disease in vitro and in vivo. **Brain Res. Bull.**, v.86, p.340-347, 2011.
84. TANAKA, D.J.; BURSIA, S.J. Degeneration patterns in the chicken central nervous system induced by ingestion of the organophosphorous delayed neurotoxin -ottrrotlihy-ol phosphate. A silver impregnation study. **Brain Res.**, v.484, p.240-256, 1989.
85. TIAN, Q.; LV, C.; WANG, P.; REN, L.; QIU, J.; LI, L.; ZHOU, Z. Enantiomeric separation of chiral pesticides by high performance liquid chromatography on cellulose tris-3,5-dimethyl carbamate stationary phase under reversed phase conditions. **J. Sep. Sci.**, v.30, p.310-321, 2007.

86. TRYFONOS, M.; ANTONOPOULOU, E.; PAPAETHIMIOU, C.; CHALEPLIS, G.; THEOPHILIDIS, G. An in vitro assay for the assessment of the effects of an organophosphate, paraoxon, and a triazine, atrazine, on the heart of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Pest. Biochem. Physiol.**, v.93, p.40-46, 2009.
87. US Environment Protection Agency (EPA) (1996). Health effects test guidelines, OPPTS 870-6100. Delayed neurotoxicity of organophosphate substances following acute and 28-day exposure. Available at <http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/oppts_harmonized/870_health_effects_test_guidelines/drafts/870_6100.pdf>.
88. WANG, P.; LIU, D.; LEI, X.; JIANG, S.; ZHOU, Z. Enantiomeric separation of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography on an amylose tris-(S)-1-phenylethylcarbamate chiral stationary phase. **J. Sep. Sci.**, v.29, p.265-271, 2006.
89. WANG, P.; JIANG, J.; LIU, D.; ZHANG, H.; ZHOU, Z. Enantiomeric Resolution of Chiral Pesticides by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Agric. Food. Chem.** v.54, p.1577-1583, 2006.
90. WESSELING, C.; CORRIOLSB, M.; BRAVO, V. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.207, p.s697-s705, 2005.
91. WILSON, B.W.; HENDERSON, J.D. Blood esterase determinations as markers of exposure. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.128, p.55-69, 1992.
92. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: World Health Organization, 1990.
93. YANG, C.; DENG, J. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. **J. Chin. Med. Assoc.**, v.70, p.467-472, 2007.
94. YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **J. Chromatogr. A**, v.906, p.105-125, 2001.
95. YE, J.; WU, J.; LIU, W. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. **Trends Analytical Chem.**, v.28, p.1148-1163, 2009.
96. ZHAO, X.L.; ZHU, Z.P.; ZHANG, T.L.; ZHANG, C.L.; YU, L.H.; XIE, K.Q. Tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) decreases the levels of cytoskeletal proteins in hen sciatic nerve. **Toxicol. Lett.**, v.152, p.139-147, 2004.
97. ZONGDE, Z.; XINGPING, L.; XIAOMEI, W.; HONG, Z.; YANPING, S.; LIREN, C.; YONGMIN, L. Analytical and semipreparative resolution of enantiomers of albendazole sulfoxide by HPLC on amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.62, p.69-79, 2005.

12. APÊNDICE

APÊNDICE A - Cronograma de Atividades Desenvolvidas

ATIVIDADES	mar 2009	abr- jul 2009	ago- dez 2009	jan- jun 2010	jul- dez 2010	Jan- jun 2011	jul- dez 2011	jan- jul 2012
Revisão de Literatura.	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do projeto de pesquisa.	X							
Integralização dos créditos em disciplinas.	X	X	X	X	X			
Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da FCF – UNESP.		X						
Adaptação e padronização das técnicas analíticas de CLAE para separação enantiomérica.		X						
Adaptação, padronização e separação das formas enantioméricas do metamidofós utilizando a técnica de CLAE em escala preparativa.			X					
Adaptação e padronização das técnicas laboratoriais para ensaios de inibição das colinesterases e da ESNp <i>in vitro</i> .				X	X			
Adaptação e padronização das técnicas laboratoriais para determinação da atividade da PCD no nervo ciático de galinhas.							X	
Administração das diferentes formas enantioméricas do metamidofós e avaliação clínica e bioquímica das galinhas.							X	
Administração da forma enantiomérica do metamidofós que gerar os sinais mais severos de neurotoxicidade e posterior administração do nimodipino e gliconato de cálcio como estratégia de tratamento.							X	
Análise estatística dos resultados.						X	X	
Elaboração do relatório parcial.						X		
Exame geral de qualificação.						X		
Estágio na “ <i>Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine (Laboratory for Neurotoxicity Studies)</i> ”.						X	X	
Elaboração do relatório final.							X	
Publicação dos resultados.							X	X
Defesa de tese de doutorado.								X

APÊNDICE B - Questionário aplicado aos voluntários da pesquisa:

QUESTIONÁRIO

Dados Pessoais

Nome..... Data de nascimento/...../19..... Sexo..... Peso..... kg Altura..... m

Endereço

Av./Rua n°

Bairro Telefone Cidade

Há quanto tempo mora neste endereço?

Há alguma fábrica perto da sua casa? sim () Não ()

O que esta fábrica produz?

Sobre o Trabalho

Qual a sua ocupação?

Há quanto tempo trabalha nesta função?

Nos últimos 30 dias você entrou em contato com algum tipo de "veneno" para matar praga na lavoura, jardim, ou criação? sim () não ()

Qual o nome do veneno?

Sobre os costumes

Você fuma? sim () não () Quantos cigarros por dia?

Largou de fumar? Há quanto tempo?

Você tem costume de ingerir bebida alcoólica? sim () não ()

cerveja sim () não () quanto por dia? garrafas

pinga sim () não () quanto por dia? doses

outro tipo de bebida quanto por dia?

Sobre a saúde

Você tem dificuldade de se lembrar das coisas? sim () não ()

Você tem dificuldade para se concentrar? sim () não ()

Você fica nervoso sem motivo? sim () não ()

Você tem dor de cabeça pelo menos uma vez por semana? sim () não ()

Você já tomou remédio para desmaio? sim () não ()

Você está tomando algum remédio? sim () não ()

Qual o nome? quantas vezes ao dia

..... quantas vezes ao dia

Você tem algum problema de saúde? sim () não ()

O que é que você tem?

Observações:



Environmental Chemistry

SEMPREPARATIVE ENANTIOSEPARATION OF METHAMIDOPHOS BY HPLC-UV AND
PRELIMINARY IN VITRO STUDY OF BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITION

GUILHERME L. EMERICK,^{*,†} REGINA V. OLIVEIRA,[‡] KÁTIA ROBERTA A. BELAZ,[‡] MONIQUE GONÇALVES,[†]
and GEORGINO H. DE OLIVEIRA[†]

[†]Department of Natural Active Principles and Toxicology, University Estadual Paulista, Araraquara, Brazil

[‡]Department of Chemistry, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

(Submitted 6 July 2011; Returned for Revision 15 September 2011; Accepted 19 September 2011)

Abstract—Many chiral pesticides are introduced into the environment as racemates, although their pesticidal activity is usually the result of preferential reactivity of only one enantiomer, while the other enantiomer may have toxic effects against nontarget organisms. Methamidophos (*O*, 5-dimethyl phosphoramidothioate), a chiral compound, is an insecticide widely used in agriculture in both developed and developing countries. However, this pesticide has a high toxicity not only to targeted insects but also to human and animals. In the present study, the enantiomers of methamidophos were enantiomerically separated by a semipreparative chiral liquid chromatography at the multimilligram scale on a polysaccharide-based chiral stationary phase and a preliminary evaluation of their in vitro inhibition of plasma butyrylcholinesterase (BChE) of hens was performed. In the present study, our first effort was to resolve the racemic mixture of methamidophos and to that end reversed-phase, normal-phase, and polar organic elution conditions were investigated in four different polysaccharide-based chiral phases. The best performance was achieved on a cellulose *tr*(3,5-dimethylphenylcarbamate) phase under normal phase. This chromatographic condition allowed the separation of 225 mg of methamidophos enantiomers with a high degree of chiral purity (>98%) in a short analysis time. Significant differences were found between the concentration that causes 50% of enzyme inhibition (IC₅₀) of the three isoforms of methamidophos. (–)-Methamidophos showed an IC₅₀ approximately three times larger than the (+)-enantiomer for plasma BChE of hens. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012;31:239–245. © 2011 SETAC

Keywords—Methamidophos; High-performance liquid chromatography; Chiral separation; Polysaccharide-based chiral phases; Butyrylcholinesterase

OBSERVAÇÃO: Só serão colocados nesta tese os resumos dos trabalhos publicados para evitar replicação total do material pertencente à *Environmental Toxicology and Chemistry* e *Toxicology*. Para visualização completa dos trabalhos, os leitores deverão possuir livre acesso ao material das respectivas revistas.



OBSERVAÇÃO: Além desses dois artigos já publicados com resultados desta tese, mais 2 artigos estão em processo de submissão e de redação e seguem as referências:

Artigo Submetido:

1. EMERICK, G.L.; DeOliveira, G.H.; EHRICH, M. Two main mechanisms of intervention of organophosphorus-induced delayed neuropathy. **Chemico-Biological Interactions**, 2012. JCR: 2,832.

Artigo em redação:

2. EMERICK, G.L.; Ehrich, M.; JORTNER, B.S.; OLIVEIRA, R.V.; DeOliveira, G.H. Biochemical, histopathological and clinical evaluation of delayed effects caused by tocp and methamidophos enantiomers in hens: ameliorative effects using the control of calcium homeostasis. 2012.

12. ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 12/2009

Interessado: Guilherme Luz Emerick

Orientador: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

Projeto: Avaliação de Neurotoxicidade de formas de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas

Parecer nº 24/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Avaliação de Neurotoxicidade de formas de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em janeiro de 2012.

Araraquara, 27 de junho de 2009.


Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____,
Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente à (rua/av) _____, nº _____,
Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estabelecer um protocolo para avaliação da toxicidade de agrotóxicos que são muito utilizados em todo o Brasil.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para que um diagnóstico preciso possa ser dado pela equipe de saúde sempre que houver um quadro típico de intoxicações por agrotóxicos.
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico: não mais do que 10 mililitros de sangue que serão utilizados exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
4. A minha participação como voluntário se restringirá à doação de sangue para o banco de sangue da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP - FCFAR – UNESP e se encerra após a doação do material biológico;
5. Ao participar desta pesquisa, estarei tendo o desconforto normal de todo doador de sangue do presente banco de sangue, e o laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP - FCFAR – UNESP toma todos os cuidados cabíveis para evitar qualquer risco ao doador;
6. Não há necessidade de retorno do doador para uma coleta posterior;
7. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
8. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);
9. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
10. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
11. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (16) 3301-6989 com Guilherme Luz Emerick, pesquisador responsável pelo estudo;
13. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária (o), do estudo "AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE DE FORMAS ENANTIOMÉRICAS DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS: UM ESTUDO COMPARATIVO EM CÉLULAS HUMANAS E DE GALINHAS".

Araraquara,/...../.....

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

ANEXO C - Termo de Doação de Material Biológico

Termo de doação de material biológico

Eu,.....,
RG, Brasileiro, maior e responsável, estado civil
....., profissão.....,
residente à (rua/av),
cidade, São Paulo, no pleno gozo
de minhas faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade autorizo
ao funcionário do banco de sangue da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara-SP - FCFAR – UNESP, a retirar não mais do que 10 mililitros de
meu sangue, a qual serão doados e utilizados na pesquisa “AVALIAÇÃO DE
NEUROTOXICIDADE DE FORMAS ENANTIOMÉRICAS DE PRAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS: UM ESTUDO COMPARATIVO EM CÉLULAS
HUMANAS E DE GALINHAS”, sob a responsabilidade do pesquisador
Guilherme Luz Emerick.

Araraquara,/...../.....

Assinatura do voluntário

Obs: procedente do voluntário da pesquisa (no caso de
óbito do voluntário o termo de doação deverá ser
assinado pelos familiares).

ANEXO D - Parecer do CEP para Humanos:



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 09/2009

Interessado: Guilherme Luz Emerick

Projeto: Avaliação da neurotoxicidade de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas

Parecer nº 31/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Avaliação da neurotoxicidade de formas enantioméricas de praguicidas organofosforados: um estudo comparativo em células humanas e de galinhas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em agosto de 2012, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 04 de agosto de 2009.


Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO E - Assentamento escolar com os respectivos créditos realizados.

ASSENTAMENTO ESCOLAR

Nome do Programa: CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS						
Curso: DOUTORADO						
Nome: GUILHERME LUZ EMERICK				matrícula nº: 73114-2		
Disciplinas	Ano	Período Letivo	Créditos	Carga Horária	Freq.	Conceito
Bioestatística - T	2009	1º Semestre	4	60	100	A
Didática Aplicada ao Ensino Superior	2009	1º Semestre	4	60	100	A
Metodologia da Investigação Científica	2009	1º Semestre	4	60	94	A
Seminários Gerais	2009	1º Semestre	2	30	100	A
Tópicos Especiais						
Ética em Pesquisa com seres humanos e animais	2009	1º Semestre	3	45	91	A
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	2009	2º Semestre	4	60	95	A
Interações Medicamentosas	2009	2º Semestre	3	45	100	A
Teoria e prática em técnicas espectroscópicas UV-visível e fluorescência; aplicações em Biotecnologia - T	2011	2º Semestre	2	30	100	A
Total de créditos em disciplinas			26	390		
Total de créditos em atividades complementares (*)						
Total de créditos em tese			0	0		
APROVEITAMENTO DO MESTRADO:						
Avaliação toxicológica de fármacos						
Espectrometria de Massas de Produtos Naturais						
Farmacocinética aplicada ao desenvolvimento de fármacos e medicamentos I						
Latência de Fármacos						
Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos						
Tópicos Especiais						
-Doenças neurodegenerativas e química medicinal						
Total de créditos em aproveitamento do Mestrado			23	345		
TOTAL GERAL DE CRÉDITOS			49	735		
Regulamento do Programa aprovado pela Resolução UNESP n. 77 de 19/05/2005, alterada pela Resolução UNESP n. 34 de 17/07/2008						
1 crédito correspondente a 12 horas de atividades programadas até 13/9/99 (Res. UNESP 46, DE 15/6/91)						
1 crédito correspondente a 15 horas de atividades programadas a partir de 14/9/99 (Res. UNESP 45, DE 14/9/99)						
CONCEITOS:						
A - Excelente; B - Bom; C - Regular; D - Reprovado; I - Incompleto; T - Transferência; J - Cancelamento						
OBS: AE - Disciplina cursada como aluno especial						
TP - Disciplina cursada no programa						
T - Disciplina cursada fora do Programa						

Araraquara, 1 de fevereiro de 2012.