

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA**

TATIANA SANTANA RIBEIRO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE OXIMAS COMO ANTÍDOTOS PARA
INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS**

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

TATIANA SANTANA RIBEIRO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE OXIMAS COMO ANTÍDOTOS PARA
INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Química.

Orientador: Prof. José Daniel Figueroa-Villar – Ph.D.

Co-orientador: Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl – D.Sc.

Rio de Janeiro

2009

c2009

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro - RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e dos orientadores.

665.7 - Ribeiro, Tatiana Santana

R484u - Síntese e Avaliação de Oximas como Antídotos para Intoxicação por Organofosforados/ Tatiana Santana Ribeiro – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2009.

271 p.:il.

Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2009.

1. Oximas. 2. Acetilcolinesterase. 3. Agentes Neurotóxicos. 4. Organofosforados, I. Título. II. Instituto Militar de Engenharia.

CDD 665-7

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

TATIANA SANTANA RIBEIRO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE OXIMAS COMO ANTÍDOTOS
PARA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Química.

Orientador: José Daniel Figueroa-Villar – Ph.D.

Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Riehl – D.Sc.

Aprovada em 11 de maio de 2009 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. José Daniel Figueroa-Villar – Ph.D. do IME – Presidente

Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl – D.Sc. da UFRJ

Prof. João Batista Neves da Costa – D.Sc. da UFRRJ

Prof. Jochen Junker – Ph.D da Fiocruz

Prof. Wilma Araújo Gonzáles – D.C. do IME

Maj. Fábio Cano Bicalho – D.C. do IME

Rio de Janeiro

2009

Aos meus queridos pais, Antonio e Maria, pelo amor e dedicação e apoio por toda a minha vida. Ao meu querido irmão, Túlio, pelo carinho e amizade. Às minhas queridas avós Luzia e Maria da Graça pelo imenso amor. Dedico esta Tese a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e coragem de continuar a cada dia e a cada dificuldade.

Aos meus queridos pais e meu irmão que mesmo sem entenderem direito o que eu estava fazendo, sempre me apoiaram, sendo meu alicerce.

Ao professor Dr. José Daniel Figueroa Villar pela orientação, apoio, por todo amadurecimento científico e pela amizade.

Ao professor Dr. Carlos Alberto da Silva Riehl pela co-orientação e também pelo amadurecimento científico e pela amizade.

Ao professor Dr. Jefferson Silva Oliveira e ao professor Dr. Sérgio Rabello (Laboratório de Agrotóxicos do CESTH-Fiocruz) pela colaboração na realização dos ensaios biológicos e aos colegas que pertencem à mesma equipe, pelo apoio dado durante este período de trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora pela leitura crítica e pela valiosa contribuição ao nosso trabalho.

Aos professores da Pós Graduação do Departamento de Química do IME por contribuírem para a minha formação científica.

Aos amigos, funcionários do Departamento de Química do IME, Resende, Avanilson, Gil, Osmaura, Correia, Tonelli, Getúlio e Claudia pelo carinho, apoio, força nos momentos difíceis, amizade e excelentes momentos de descontração.

Aos amigos funcionários do IME, Elias, Anderson e Irani pelo constante apoio, “muitas quebras de galho”, e amizade.

Aos amigos de laboratório do IME Téo, Anna Carol, Adriana, Rocha, Nelson, Leandro, Rose, Claudinha, Martinha, Claudiona, Sibelle, Alessandra, Janaina e Marcele pelo carinho e pela força.

Aos amigos de Pós-Graduação, Mariane, Fernanda, Ingridy, Débora, Rodrigo Fráguas, Luciano, Gisélia, Zanio, Giseli, Ângela, Luiz, Coutinho, Dumani, Antonio, Malu, Raquel, Juliana, Barcelos, Paulo e Bianca, Áurea e Anderson pelos nossos momentos de estudo, “preciosos momentos de divertimento” e grandes risadas mesmos nas dificuldades da Tese e amizade.

Às amigas Alessandra e Márcia pelo carinho, amizade e grande contribuição nos meus treinos de operar a RMN.

Aos amigos do laboratório da ENSP-Fiocruz, Márcio, Artur, Jonas, Amandinha e Tati pela incrível força nos ensaios biológicos e pela amizade.

À técnica Rita, da UERJ, pela realização dos espectros de IV.

À professora Luzineide Tinoco pela colaboração com os experimentos de DOSY.

Aos amigos do laboratório do Riehl na UFRJ, Sidnei, Natália, Priscila e Vanessa e a professora Paula, pelo grande apoio e amizade.

Ao amigo Delfino pela valiosa contribuição em minha Tese, pelas conversas científicas, trocas de artigos, grande apoio e pela amizade.

Ao amigo Arlan e ao professor Pascutti (Biofísica-UFRJ) pela valiosa contribuição em Modelagem Molecular e pela amizade.

À amiga Magda, que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis, pelas nossas inúmeras conversas todos os dias, carinho e amizade.

Às amigas Manu e Andréia, pelo convívio de morar juntas no decorrer da minha Tese, pelo carinho, discussões científicas, risadas, desabafos e etc...

Ao amigo Rodrigo Otávio e sua família pela maravilhosa amizade e sempre me apoiando com palavras sábias.

Às minhas amigas, Neiva, Amanda Oliveira, Carlinha, Luciene, Grazi, Rose, Regininha, Amanda Forrester, Patricia Vermelho, Ana Luiza, Valéria e Cátia e também aos amigos, Vitor, Cristiano, André (Durvalino), André Bousquet, Cláudio, Ari, Ildomar, Luciano e Flavinho pelo apoio de longa data, carinho e amizade.

Aos meus queridos familiares que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e me descontraíram em nossos encontros.

A todos que participaram deste trabalho e na minha formação profissional direta e indiretamente e aos que não foram citados devido a minha fraca memória.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Instituto Militar de Engenharia pela oportunidade.

Muito obrigada.

Viva!
Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, porque o mundo pertence
a quem se atreve e a vida é “muito” pra ser
insignificante.
“Vida” (Charles Chaplin).

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	20
LISTA DE SIGLAS	22
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Os organofosforados e os agentes neurotóxicos	25
1.1.1 Os organofosforados	25
1.1.2 Os agentes neurotóxicos.....	29
1.2 As colinesterases.....	36
1.2.1 A acetilcolinesterase	37
1.3 Organofosforados: Drogas que inibem as colinesterases.....	41
1.4 Mecanismo de reativação da AChE.....	43
1.5 Envelhecimento da AChE.....	44
1.6 Manifestações clínicas de intoxicação aguda por anti-colinérgicos.....	45
1.7 Tratamento.....	46
1.8 Justificativas da Tese.....	49
2 OBJETIVOS	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Síntese de oximas	53
3.1.1 Nas análises, sínteses e purificações.....	53
3.1.2 Instrumental utilizado nas caracterizações espectrométricas.....	53
3.1.3 Outros equipamentos	54
3.1.4 Método convencional.....	54
3.1.5 Método por micro-ondas	54
3.1.6 Oximas sintetizadas.....	55
3.1.6.1 Síntese da 2-tiofenoaldoxima	55
3.1.6.2 Síntese da 2-piridinoaldoxima.....	57

3.1.6.3	Síntese da pirroilaldoxima.....	58
3.1.6.4	Síntese da furfuralaldoxima.....	59
3.1.6.5	Síntese da 1-metil-2-imidazoilaldoxima.....	60
3.1.6.6	Síntese da 4-metil-imidazoil-5-aldoxima.....	61
3.1.6.7	Síntese da 3-nitro-salicilaldoxima.....	62
3.1.6.8	Síntese da 5-nitro-salicilaldoxima.....	63
3.1.6.9	Síntese da 4-metoxi-benzaldoxima.....	64
3.1.6.10	Síntese da <i>o</i> -toluilaldoxima.....	65
3.1.6.11	Síntese da <i>N,N-p</i> -aminobenzaldoxima.....	66
3.1.6.12	Síntese da <i>m</i> -aminobenzaldoxima.....	67
3.1.6.13	Síntese da 4-cloro-benzaldoxima.....	68
3.1.6.14	Síntese da 4-flúor-benzaldoxima.....	69
3.1.6.15	Síntese da tereftaldoxima.....	70
3.1.6.16	Síntese da isoftaldoxima.....	71
3.1.6.17	Síntese da 4-nitro-benzaldoxima.....	72
3.2	Ensaio biológicos.....	73
3.2.1	Reagentes.....	73
3.2.2	Equipamentos.....	73
3.2.3	Grupos doadores de sangue.....	74
3.2.4	Coleta, processamento e contaminação das amostras de sangue.....	74
3.2.5	Análise colinesterásica pelo método de Ellman modificado por Oliveira-Silva <i>et al.</i> (2000).....	75
3.2.6	Tratamento de reativação da AChE por oximas.....	77
3.3	Ensaio das interações ligante-BSA e ligante-AChE utilizando as técnicas T ₁ , T ₂ e DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy) por RMN....	78
3.3.1	Reagentes	78
3.3.2	Equipamentos.....	78
3.3.3	Preparo das soluções.....	78
3.3.4	Metodologia de RMN.....	79
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.1	Síntese de oximas.....	85
4.1.1	As vantagens das reações de síntese de oximas por micro-ondas.....	86

4.1.2	As caracterizações das oximas.....	89
4.1.2.1	Caracterização da 2-tiofenoaldoxima.....	89
4.1.2.2	Caracterização da 2-piridinoaldoxima.....	91
4.1.2.3	Caracterização da 2-pirroilaldoxima.....	92
4.1.2.4	Caracterização da 2-furfurilaldoxima.....	94
4.1.2.5	Caracterização da 1-metil-2-imidazoilaldoxima.....	95
4.1.2.6	Caracterização da 4-metil-5-imidazoilaldoxima.....	97
4.1.2.7	Caracterização da 3-nitro-salicilaldoxima.....	99
4.1.2.8	Caracterização da 5-nitro-salicilaldoxima.....	100
4.1.2.9	Caracterização da 4-metoxi-benzaldoxima.....	102
4.1.2.10	Caracterização da <i>o</i> -toluilaldoxima.....	104
4.1.2.11	Caracterização da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima.....	105
4.1.2.12	Caracterização da <i>m</i> -aminobenzaldoxima.....	107
4.1.2.13	Caracterização da 4-cloro-benzaldoxima.....	109
4.1.2.14	Caracterização da 4-flúor-benzaldoxima.....	110
4.1.2.15	Caracterização da tereftalaldoxima.....	112
4.1.2.16	Caracterização da isoftalaldoxima.....	114
4.1.2.17	Caracterização da 4-nitro-benzaldoxima.....	115
4.1.3	Discussão dos resultados das caracterizações das oximas.....	117
4.2	Ensaio biológico.....	120
4.2.1	Fundamento do método usado nos ensaios.....	120
4.2.2	Determinação da concentração padrão de etil-paraoxon.....	120
4.2.3	Reativação da AChE pelas oximas, testes <i>in vitro</i>	123
4.3	Interações das oximas com BSA e AChE medidas por experimentos de RMN.....	135
4.3.1	Discussão dos resultados dos tempos de relaxação T_1 por RMN.....	135
4.3.2	Discussão dos resultados dos experimentos de DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy) por RMN.....	147
4.3.3	Efeito das interações entre a 2-tiofenoaldoxima e pralidoxima sobre a AChE Humana por medidas de relaxação spin-spin (T_2) por RMN.....	150
4.4	Resultados de ancoragem por Modelagem Molecular.....	151
4.4.1	Ancoragem de algumas oximas sintetizadas na HuAChE inibida pelo agente neurotóxico tabun.....	154

5	CONCLUSÕES	157
6	PERSPECTIVAS E SUGESTÕES	159
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
8	APÊNDICES	172
8.1	Apêndice A – Espectros de IV.....	173
8.2	Apêndice B – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C	191
8.3	Apêndice C – Arquivo do diretório para sequência de T_1	240
8.4	Apêndice D – Artigo publicado.....	242

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Tipos de organofosforados	26
FIG. 1.2	Tetraetilpirofosfato (TEPP).....	28
FIG. 1.3	Scharadan.....	28
FIG. 1.4	Estruturas químicas de alguns agrotóxicos fosforados.....	28
FIG. 1.5	Principais agentes neurotóxicos: nomenclatura da OTAN, nome comum e estrutura química.....	30
FIG. 1.6	Configuração absoluta dos enantiômeros dos agentes neurotóxicos mais ativos na inibição da AChE (BENSCHOP & JONG, 1988).....	33
FIG. 1.7	Acetilcolinesterase.....	37
FIG. 1.8	Interação e reação de hidrólise do substrato (ACh) com AChE.....	38
FIG. 1.9	Hidrólise da ACh pela enzima AChE (SOREQ & SEIDMAN 2001).....	39
FIG. 1.10	Esquema do sítio estereásico e aniônico da AChE.....	39
FIG. 1.11	Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (DOS SANTOS, 2007).....	40
FIG. 1.12	Compostos anticolinesterásicos.....	41
FIG. 1.13	Esquema geral de inibição da acetilcolinesterase, onde X é o grupo de saída do agente organofosforado (DOS SANTOS, 2007).....	43
FIG. 1.14	Mecanismo de reativação da AChE fosforilada pelas oximas.....	44
FIG. 1.15	Esquema de envelhecimento da acetilcolinesterase.....	45
FIG. 1.16	Principais oximas empregadas atualmente.....	46
FIG. 1.17	Oximas de Hagedorn.....	47
FIG. 1.18	Carbamatos usados como inibidores reversíveis no pré-tratamento de intoxicações da AChE.....	48
FIG. 3.1	Sistema de coordenadas utilizado para descrever as componentes da magnetização (WINK, 1989).....	79
FIG. 3.2	Magnetização em repouso antes da aplicação do pulso.....	80
FIG. 3.3	Inclinação da magnetização devida à aplicação de um pulso de $\theta=90^\circ$ (WINK, 1989).....	80
FIG. 3.4	Retorno exponencial da magnetização M_z e M_{xy} após um pulso de	

	$\theta=90^\circ$	81
FIG. 3.5	Esquema de aplicação de um gradiente em um campo magnético.....	84
FIG. 3.6	Sequência de pulso PGSE - <i>Pulsed Gradient Spin Echo</i> (ANTALEK, 2002).....	84
FIG. 4.1	Esquema e mecanismo de síntese de oximas.....	85
FIG. 4.2	Estruturas do paration e do paraoxon.....	121
FIG. 4.3	Efeito do etil-paraoxon sobre a atividade da AChE (<i>in vitro</i>).....	122
FIG. 4.4	Estruturas do clorpirifós e clorpirifós-oxon.....	122
FIG. 4.5	Efeito do clorpirifós-oxon sobre a atividade da AChE (<i>in vitro</i>).....	123
FIG. 4.6	Esquema explicando porque a reação é monitorada por espectroscopia UV-Visível a 412 nm.....	124
FIG. 4.7	O efeito da concentração da 4-nitro-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	126
FIG.4.8	O efeito da concentração da 4-cloro-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	127
FIG.4.9	O efeito da concentração da 4-flúor-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	128
FIG.4.10	O efeito da concentração da isoftaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	130
FIG.4.11	O efeito da concentração da tereftaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	131
FIG.4.12	O efeito da concentração da pralidoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	131
FIG.4.13	O efeito da concentração da 2-tiofenoaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.....	132
FIG.4.14	Estrutura da albumina humana.....	136
FIG.4.15	Medidas de T_1 da pralidoxima e da 2-tiofenoaldoxima com a AChE....	147
FIG.4.16	Curvas da determinação dos coeficientes de difusão da pralidoxima..	148
FIG.4.17	Curvas da determinação dos coeficientes de difusão da 2-tiofenoaldoxima.....	149
FIG.4.18	Espectro de RMN da relaxação spin-spin (T_2) da pralidoxima sem (A) e com (B) AChE.....	150
FIG.4.19	Espectro de RMN da relaxação spin-spin (T_2) da 2-tiofenoaldoxima	

	sem (A) e com (B) AChE.....	151
FIG.4.20	Número de conformações estáveis para cada oxima dentro do sítio ativo da HuAChE inibida por tabun.....	153
FIG.4.21	Modelo da HuAChE definido por homologia e usado para fazer as ancoragens (GONÇALVES, 2006).....	153
FIG.4.22	Ancoragem da pralidoxima em HuAChE-tabun.....	155
FIG.4.23	Ancoragem da 2-tiofenoaldoxima em HuAChE-tabun.....	156
FIG. 8.1	Espectro de IV da 2-tiofenoaldoxima.....	174
FIG. 8.2	Espectro de IV da 2-piridinoaldoxima.....	175
FIG. 8.3	Espectro de IV da 2-pirroilaldoxima.....	176
FIG. 8.4	Espectro de IV da 2-furfurilaldoxima.....	177
FIG. 8.5	Espectro de IV da 1-metil-2-imidazoilaldoxima.....	178
FIG. 8.6	Espectro de IV da 4-metil-imidazol-5-aldoxima.....	179
FIG. 8.7	Espectro de IV da 3-nitro-salicilaldoxima.....	180
FIG. 8.8	Espectro de IV da 5-nitro-salicilaldoxima.....	181
FIG. 8.9	Espectro de IV da 4-metoxi-benzaldoxima.....	182
FIG.8.10	Espectro de IV da o-toluilaldoxima.....	183
FIG.8.11	Espectro de IV da N,N-p-aminobenzaldoxima.....	184
FIG.8.12	Espectro de IV da m-aminobenzaldoxima.....	185
FIG.8.13	Espectro de IV da 4-cloro-benzaldoxima.....	186
FIG.8.14	Espectro de IV da 4-flúor-benzaldoxima.....	187
FIG.8.15	Espectro de IV da tereftaldoxima.....	188
FIG.8.16	Espectro de IV da isoftaldoxima.....	189
FIG.8.17	Espectro de IV da 4-nitro-benzaldoxima.....	190
FIG.8.18	Espectro de RMN ¹ H da 2-tiofenoaldoxima.....	192
FIG.8.19	Espectro de RMN ¹ H da 2-tiofenoaldoxima expandido.....	193
FIG.8.20	Espectro de RMN ¹³ C da 2-tiofenilaldoxima.....	194
FIG.8.21	Espectro de RMN ¹ H da 2-piridinoaldoxima.....	195
FIG.8.22	Espectro de RMN ¹³ C da 2-piridinoaldoxima.....	196
FIG.8.23	Espectro de RMN ¹ H da 2-pirroilaldoxima.....	197
FIG.8.24	Espectro de RMN ¹ H da 2-pirroilaldoxima expandido.....	198
FIG.8.25	Espectro de RMN ¹³ C da 2-pirroilaldoxima.....	199
FIG.8.26	Espectro de RMN ¹ H da 2-furfurilaldoxima.....	200

FIG.8.27	Espectro de RMN ^1H da 2-furfurilaldoxima expandido.....	201
FIG.8.28	Espectro de RMN ^{13}C da 2-furfurilaldoxima.....	202
FIG.8.29	Espectro de RMN ^1H da 1-metil-2-imidazoilaldoxima.....	203
FIG.8.30	Espectro de RMN ^1H da 1-metil-2-imidazoilaldoxima expandido.....	204
FIG.8.31	Espectro de RMN ^{13}C da 1-metil-2-imidazoilaldoxima.....	205
FIG.8.32	Espectro de RMN ^1H da 4-metil-5-imidazoilaldoxima.....	206
FIG.8.33	Espectro de RMN ^{13}C da 4-metil-5-imidazoilaldoxima.....	207
FIG.8.34	Espectro de RMN ^1H da 3-nitro-salicilaldoxima.....	208
FIG.8.35	Espectro de RMN ^1H da 3-nitro-salicilaldoxima expandido.....	209
FIG.8.36	Espectro de RMN ^{13}C da 3-nitro-salicilaldoxima.....	210
FIG.8.37	Espectro de RMN ^1H da 5-nitro-salicilaldoxima.....	211
FIG.8.38	Espectro de RMN ^1H da 5-nitro-salicilaldoxima expandido.....	212
FIG.8.39	Espectro de RMN ^{13}C da 5-nitro-salicilaldoxima.....	213
FIG.8.40	Espectro de RMN ^1H da 4-metoxi-benzaldoxima.....	214
FIG.8.41	Espectro de RMN ^{13}C da 4-metoxi-benzaldoxima.....	215
FIG.8.42	Espectro de RMN ^1H da <i>o</i> -toluilaldoxima.....	216
FIG.8.43	Espectro de RMN ^{13}C da <i>o</i> -toluilaldoxima.....	217
FIG.8.44	Espectro de RMN ^{13}C da <i>o</i> -toluilaldoxima expandido.....	218
FIG.8.45	Espectro de RMN ^1H da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima.....	219
FIG.8.46	Espectro de RMN ^1H da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima expandido	220
FIG.8.47	Espectro de RMN ^{13}C da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima.....	221
FIG.8.48	Espectro de RMN ^1H da <i>m</i> -aminobenzaldoxima.....	222
FIG.8.49	Espectro de RMN ^1H da <i>m</i> -aminobenzaldoxima expandido.....	223
FIG.8.50	Espectro de RMN ^{13}C da <i>m</i> -aminobenzaldoxima.....	224
FIG.8.51	Espectro de RMN ^1H da 4-cloro-benzaldoxima.....	225
FIG.8.52	Espectro de RMN ^1H da 4-cloro-benzaldoxima expandido.....	226
FIG.8.53	Espectro de RMN ^{13}C da 4-cloro-benzaldoxima.....	227
FIG.8.54	Espectro de RMN ^1H da 4-flúor-benzaldoxima.....	228
FIG.8.55	Espectro de RMN ^1H da 4-flúor-benzaldoxima expandido.....	229
FIG.8.56	Espectro de RMN ^{13}C da 4-flúor-benzaldoxima.....	230
FIG.8.57	Espectro de RMN ^{13}C da 4-flúor-benzaldoxima expandido.....	231
FIG.8.58	Espectro de RMN ^1H da tereftaldoxima.....	232
FIG.8.59	Espectro de RMN ^{13}C da tereftaldoxima.....	233

FIG.8.60	Espectro de RMN ^1H da isoftaldoxima.....	234
FIG.8.61	Espectro de RMN ^1H da isoftaldoxima expandido.....	235
FIG.8.62	Espectro de RMN ^{13}C da isoftaldoxima.....	236
FIG.8.63	Espectro de RMN ^1H da 4-benzaldoxima.....	237
FIG.8.64	Espectro de RMN ^1H da 4-benzaldoxima expandido.....	238
FIG.8.65	Espectro de RMN ^{13}C da 4-benzaldoxima.....	239

LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1	Tabela de defensivos agrícolas fornecida pela SINDAG.....	27
TAB. 1.2	Tabela de preços de defensivos agrícolas fornecida pela SINDAG...	27
TAB. 1.3	Propriedades físicas, químicas e toxicológicas dos principais agentes neurotóxicos.....	32
TAB. 1.4	Breve histórico sobre o uso de agentes neurotóxicos.....	35
TAB. 3.1	Construção da curva padrão de L-cisteína para o método de Ellman modificado por OLIVEIRA-SILVA, 2000.....	75
TAB. 3.2	Preparação dos tubos de análise para a dosagem da BSA.....	76
TAB. 3.3	Concentrações utilizadas nas medidas de interação T ₁ por RMN.....	79
TAB. 4.1	% de rendimentos de formação das oximas sintetizadas pelo método convencional (24 h) e por micro-ondas (10 min.).....	87
TAB.4.2	Caracterizações da 2-tiofenoaldoxima (26) por Infravermelho.....	90
TAB.4.3	Caracterizações da 2-tiofenoaldoxima (26) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	90
TAB.4.4	Caracterizações da 2-piridinoaldoxima (28) por Infravermelho.....	91
TAB.4.5	Caracterizações da 2-piridinoaldoxima (28) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	92
TAB.4.6	Caracterizações da 2-pirroilaldoxima (30) por Infravermelho.....	93
TAB.4.7	Caracterizações da 2-pirroilaldoxima (30) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	93
TAB.4.8	Caracterizações da 2-furfurilaldoxima (32) por Infravermelho.....	95
TAB.4.9	Caracterizações da 2-furfurilaldoxima (32) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	95
TAB.4.10	Caracterizações da 1-metil-2-imidazoilaldoxima (34) por Infravermelho.	96
TAB.4.11	Caracterizações da 1-metil-2-imidazoilaldoxima (34) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	97
TAB.4.12	Caracterizações da 4-metil-5-imidazoilaldoxima (36) por Infravermelho.	98
TAB.4.13	Caracterizações da 4-metil-5-imidazoilaldoxima (36) por RMN de ¹ H e ¹³ C.....	98
TAB.4.14	Caracterizações da 3-nitro-salicilaldoxima (38) por Infravermelho.....	100
TAB.4.15	Caracterizações da 3-nitro-salicilaldoxima (38) por RMN de ¹ H e ¹³ C....	100
TAB.4.16	Caracterizações da 5-nitro-salicilaldoxima (40) por Infravermelho.....	101
TAB.4.17	Caracterizações da 5-nitro-salicilaldoxima (40) por RMN de ¹ H e ¹³ C....	102
TAB.4.18	Caracterizações da 4-metoxi-benzaldoxima (42) por Infravermelho.....	103
TAB.4.19	Caracterizações da 4-metoxi-benzaldoxima (42) por RMN de ¹ H e ¹³ C.	103

TAB.4.20	Caracterizações da <i>o</i> -toluilaldoxima (44) por Infravermelho.....	105
TAB.4.21	Caracterizações da <i>o</i> -toluilaldoxima (44) por RMN de ^1H e ^{13}C	105
TAB.4.22	Caracterizações da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima (46) por Infravermelho.....	106
TAB.4.23	Caracterização da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima (46) por RMN de ^1H e ^{13}C	107
TAB.4.24	Caracterizações da <i>m</i> -aminobenzaldoxima (48) por Infravermelho.....	108
TAB.4.25	Caracterizações da <i>m</i> -aminobenzaldoxima (48) por RMN de ^1H e ^{13}C ...	108
TAB.4.26	Caracterizações da 4-cloro-benzaldoxima (50) por Infravermelho.....	110
TAB.4.27	Caracterizações da 4-cloro-benzaldoxima (50) por RMN de ^1H e ^{13}C	110
TAB.4.28	Caracterizações da 4-flúor-benzaldoxima (52) por Infravermelho.....	111
TAB.4.29	Caracterizações da 4-flúor-benzaldoxima (52) por RMN de ^1H e ^{13}C	112
TAB.4.30	Caracterizações da tereftaldoxima (54) por Infravermelho.....	113
TAB.4.31	Caracterizações da tereftaldoxima (54) por RMN de ^1H e ^{13}C	113
TAB.4.32	Caracterizações da isoftaldoxima (56) por Infravermelho.....	114
TAB.4.33	Caracterizações da isoftaldoxima (56) por RMN de ^1H e ^{13}C	115
TAB.4.34	Caracterizações da 4-nitro-benzaldoxima (58) por Infravermelho.....	116
TAB.4.35	Caracterizações da 4-nitro-benzaldoxima (58) por RMN de ^1H e ^{13}C	116
TAB 4.36	Tabela com as principais caracterizações das oximas sintetizadas.....	117
TAB.4.37	% de reativação da AChE, inibida por etil-paraoxon, pelas oximas e comparação com a pralidoxima (usada como referência).....	125
TAB.4.38	Predição <i>in silico</i> da permeação das oximas pela barreira hematoencefálica.....	133
TAB.4.39	Medidas de T_1 por RMN da pralidoxima com BSA.....	138
TAB 4.40	Medidas de T_1 por RMN da 2-tiofenoaldoxima com BSA.....	138
TAB.4.41	Medidas de T_1 por RMN da 1-metil-2-imidazolaldoxima com BSA.....	139
TAB.4.42	Medidas de T_1 por RMN da 4-metil-5-imidazoilaldoxima com BSA.....	140
TAB 4.43	Medidas de T_1 por RMN da 2-piridinoaldoxima com BSA.....	141
TAB.4.44	Medidas de T_1 por RMN da 2-pirroilaldoxima com BSA.....	141
TAB.4.45	Medidas de T_1 por RMN da 3-nitro-salicilaldoxima com BSA.....	142
TAB.4.46	Medidas de T_1 por RMN da 5-nitro-salicilaldoxima com BSA.....	143
TAB.4.47	Medidas de T_1 por RMN da 2-furfurilaldoxima com BSA.....	144

TAB.4.48	Medidas de T_1 por RMN da 4-metoxi-benzaldoxima com BSA.....	144
TAB.4.49	Medidas de T_1 por RMN da <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima BSA.....	145
TAB.4.50	Medidas de T_1 por RMN da <i>m</i> -aminobenzaldoxima com BSA.....	146
TAB.4.51	Resultados da variação de T_1 (s) e coeficiente de difusão na interação da pralidoxima e da 2-tiofenoaldoxima com AChE.....	149
TAB.4.52	Energias de ancoragem das oximas na HuAChE inibida por tabun.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

ACh	-	Acetilcolina;
AChE	-	Acetilcolinesterase;
B ₀	-	campo magnético;
BuChE	-	Butirilcolinesterase;
CDCl ₃	-	Clorofórmio deuterado;
D	-	coeficiente de difusão;
ΔD	-	Variação do coeficiente de difusão;
d	-	densidade;
d	-	duplete;
dd	-	duplo duplete;
DMSO- <i>d</i> ₆	-	Dimetilsulfóxido deuterado;
E _{ancoragem}	-	Energia de ancoragem;
HuAChE	-	Acetilcolinesterase Humana;
Hz	-	Hertz;
MHz	-	Mega-hertz;
<i>J</i>	-	Constante de acoplamento;
Kcal/mol	-	Kilocaloria por mol;
lit.	-	literatura;
M	-	Molar;
m	-	multipleto;
μg	-	microgramas;
μL	-	microlitro;
mM	-	milimolar;
MO	-	micro-ondas;
nm	-	nanômetro;
pf	-	ponto de fusão;
ppm	-	partes por milhão;
ptn	-	proteína;
% p/v	-	porcentagem peso por volume;

rf	-	rádio-frequência;
s	-	simpleto;
SER	-	Serina;
t	-	triplete;

SÍMBOLOS

Å	-	Ângstrons;
ϵ	-	absortividade ou coeficiente de absorção;
δ	-	deslocamento químico;
λ	-	comprimento de onda;
τ_c	-	Tempo de correlação;
ν	-	frequência;
γ	-	constante magnetogírica;

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina de Soro Bovino;
CCF	Cromatografia de Camada Fina;
CTBT	Tratado de Proibição Completa de Armas Nucleares;
CWC	Convenção de Armas Químicas;
DFT	Teoria do Funcional de Densidade;
DTNB	Ácido Ditionitrobenzóico;
IV	Infravermelho;
JBCS	<i>Journal Brazilian Chemistry Society</i> ;
ONU	Organização das Nações Unidas;
PAS	<i>Peripheral Anionic Site</i> ;
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13;
SNC	Sistema Nervoso Central;
UV	Ultravioleta;

RESUMO

Uma das grandes ameaças do mundo moderno é a possibilidade do uso de armas químicas por grupos terroristas. Entre estas armas, os chamados de agentes neurotóxicos, também conhecidos como “gases dos nervos”, constituem uma grande ameaça, por seus efeitos tóxicos aos seres humanos. Estes agentes são organofosforados inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e são similares a muitos organofosforados usados como inseticidas e que causam um grande número de intoxicações e mortes todo ano. A possibilidade do uso de organofosforados neurotóxicos em ataques terroristas e a intoxicação de pessoas com inseticidas é um grande motivo para continuarmos na pesquisa no desenvolvimento de antídotos mais eficientes.

Os antídotos usados na atualidade são todos oximas catiônicas, mas um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (GONÇALVES, 2006) mostrou que existe a possibilidade de que oximas neutras também funcionem como potenciais antídotos.

Neste trabalho foi sintetizada uma série de 17 oximas neutras simples, as quais foram caracterizadas e testadas como reativadoras da AChE eritrocitária humana inibida com etil-paraoxon. Paralelamente foram realizados estudos da interação destas oximas com albumina bovina (BSA) para avaliar seu potencial de interação com proteínas plasmáticas, e com a AChE, usando técnicas de ressonância magnética nuclear, com especial ênfase em medidas de tempos de relaxação longitudinal (T_1) e coeficientes de difusão (D). Também foram feitos estudos de ancoragem molecular (*docking*) das oximas com a AChE para comparar com os resultados experimentais.

Foi demonstrado que a 2-tiofenolaldoxima é mais eficiente que um dos antídotos mais utilizados na atualidade, a pralidoxima (2-PAM), indicando que oximas neutras tem potencial para funcionarem como novos antídotos para defesa contra armas químicas.

ABSTRACT

One of the major threats of the modern world is the possible use of chemical weapons by terrorist groups. Among these weapons, the so-called nerve agents, also known as "nerve gases" are a major risk due to their toxicity to humans. These organophosphorus agents are inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and are similar to many organophosphates used as insecticides, which cause a large number of poisonings and deaths every year. The possibility using nerve organophosphate agents in terrorist attacks, and the poisoning of people with insecticides, are the major reason to carry on the search in the development of more effective antidotes for intoxication with neurotoxic organophosphorus compounds.

The antidotes used nowadays are all cationic oximes, but a previous work of our research group (GONÇALVES, 2006) showed that there is a possibility that neutral oximes may also function as potential antidotes.

In this work was a series of 17 simple neutral oximes synthesized a series of 17 simple neutral oximes, characterized and tested as reactivating agents of the human erythrocyte AChE inhibited with ethyl-paraoxon. At the same time studies of the interaction of oximes with bovine albumin (BSA) were performed, to assess their potential for interaction with plasma proteins and human AChE, using techniques of nuclear magnetic resonance, with particular emphasis on the determination of longitudinal relaxation times (T_1) and diffusion coefficients (D). There were also carried out molecular modeling studies of the docking process of oximes to AChE, in order to compare this data with the experimental results.

It was shown that 2-thiophenealdoxime is a more efficient antidote for intoxication with paraoxon than the nowadays used antidote pralidoxime (2-PAM), indicating that neutral oximes have the potential to act as antidotes for intoxication with neurotoxic organophosphorus compounds and as lead compounds for the design of new defense agents against chemical weapons.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - OS ORGANOFOSFORADOS E OS AGENTES NEUROTÓXICOS

1.1.1 - OS ORGANOFOSFORADOS

Os inseticidas organofosforados são compostos anticolinesterásicos, com variado grau de toxidez para o ser humano. Estas substâncias vêm sendo amplamente utilizadas como inseticidas, fungicidas e parasiticidas na agricultura, desde a II Guerra Mundial (ROSATI, 1995).

Os organofosforados possuem um átomo de fósforo envolvido em uma ligação fosforila ($P = O$) ou tiofosforila ($P = S$) e, em essência, são ésteres, amidas ou derivados tiólicos dos ácidos fosfórico, fosfônico ou fosfínico, com diferentes combinações de átomos de oxigênio, enxofre, carbono ou nitrogênio ligados, como mostrado na Figura 1.1 (página 26) (GUPTA, 2006).

Uma série de compostos de fósforo é usada comercialmente com destaque aos compostos de fósforo orgânicos. Eles são usados como antioxidantes e estabilizantes para plásticos e óleos industriais, e em diversas áreas de aplicação, assim como resistência à corrosão, extração e complexação e como agroquímicos (inseticidas, fungicidas, herbicidas) (DOS SANTOS, 2007; KUCA and JUN, 2006; RAJSKI, 1998).

Outras aplicações podem ser citadas, como reagentes de flotação, materiais para a síntese de plásticos inflamáveis, antioxidantes, plastificantes, aditivos para óleos lubrificantes e combustíveis hidrocarbônicos, solventes aplicados para extrações seletivas e, principalmente, como inseticidas (DOS SANTOS, 2007; KUCA and JUN, 2006; TOY, 1976) e agentes antitumorais (DOS SANTOS, 2007). As aplicações industriais, junto com o aumento do uso de compostos de fósforo em síntese orgânica e na química de compostos organometálicos, têm adquirido um rápido aumento na literatura de organofosforados (DOS SANTOS, 2007).

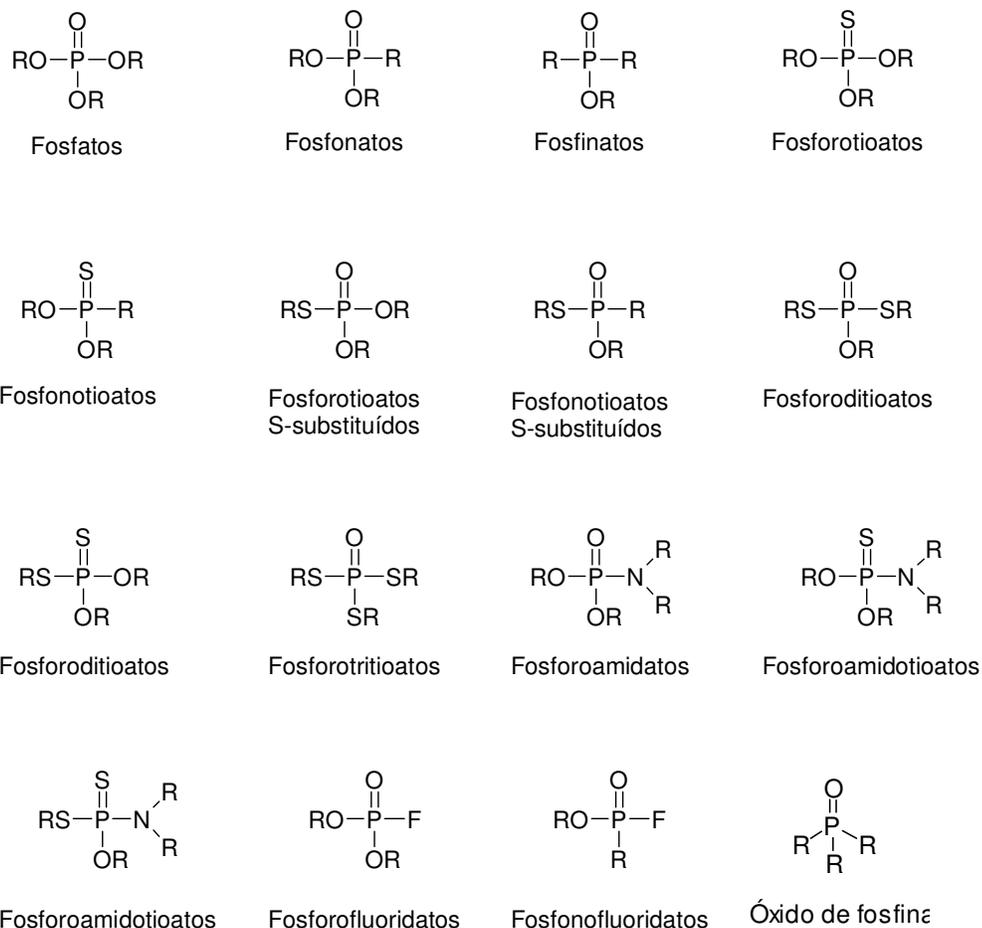


FIG. 1.1 – Tipos de organofosforados (GUPTA, 2006)

O crescente interesse na aplicabilidade de organofosforados se dá principalmente ao seu uso como agrotóxico (TAB. 1.1, página 27). O mercado de produtos químicos para defesa agrícola é avaliado em U\$\$ 5.371.965 bilhões somente no Brasil, segundo levantamento do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) em 2007 (TAB. 1.2, página 27) (www.sindag.gov.br, 2008).

TAB. 1.1 - Tabela de consumo de defensivos agrícolas.
(Dados de 2003-2007)

Classes	Produto Comercial (t)				
	2003	2004	2005	2006	2007
Total	375.048	463.604	485.969	480.120	599.834
Herbicidas	215.090	251.017	271.903	279.215	349.905
Fungicidas	41.863	65.167	61.860	56.077	68.254
Inseticidas	73.232	97.012	99.688	93.154	116.609
Acaricidas	14.362	13.702	10.644	15.895	19.888

(www.sindag.gov.br, 2008)

TAB. 1.2 - Tabela de preços de defensivos agrícolas.
(Dados de 2003-2007)

Classes	Valor – US\$ 1.000				
	2003	2004	2005	2006	2007
Total	3.136.342	4.494.948	4.243.748	3.919.841	5.371.965
Herbicidas	1.523.735	1.830.732	1.735.824	1.674.325	2.304.062
Fungicidas	713.544	1.388.177	1.089.522	917.408	1.264.416
Inseticidas	725.222	1.066.600	1.180.666	1.128.950	1.537.390
Acaricidas	80.026	77.963	82.789	70.390	92.136

(www.sindag.gov.br, 2008)

Os pesticidas organofosforados apareceram na década de 40 e seus principais representantes surgiram na década de 60 e 80, e mesmo com a aplicação de outras classes de pesticidas e de novas metodologias de controle de pragas, 40% do mercado mundial de pesticidas em 1999 era representado por organofosforados. O sucesso desta classe de compostos se dá pela sua forte atividade biológica e sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida em planta da ordem de 2 a 10 dias (DOS SANTOS, 2007).

O primeiro organofosforado a ser sintetizado foi o tetraetilpirofosfato (TEPP) (1) (FIG. 1.2, página 28), em 1854. Apesar dos avanços subsequentes na química desses compostos, seu potencial tóxico não foi explorado até o século seguinte (SIDELL, 1997; CORBRIDGE, 1995).

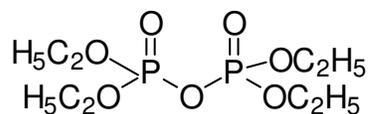
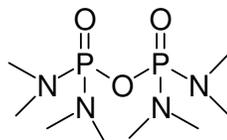


FIG. 1.2 - Tetraetilpirofosfato (TEPP)

Schrader e colaboradores descobriram, em 1941, o inseticida octametilpirofosforamida que foi chamado de Scharadan (2) (FIG. 1.3).



Scharadan (2)

FIG. 1.3 – Scharadan

O grande avanço dos inseticidas organofosforados foi pela descoberta do composto paration (3) por Schrader em 1944, primeiro produto de um novo grupo de inseticidas revolucionários que são usados até hoje. Apesar da sua toxidez relativa, outros inseticidas menos tóxicos tinham sido desenvolvidos com poucas modificações estruturais entre eles: clortion (4), fention (5) e fenitroton (6) e ainda compostos com toxidez mais baixa como malation (7) e dementon-S (8) (FIG. 1.4).

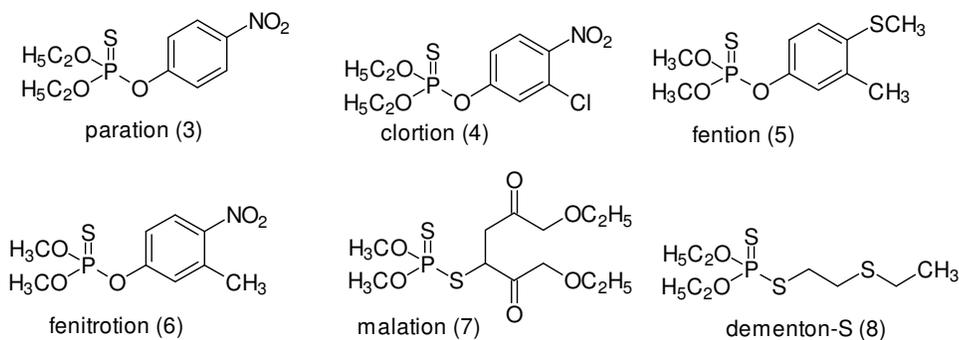


FIG. 1.4 - Estruturas químicas de alguns agrotóxicos fosforados.

Os organofosforados podem sofrer diversas biotransformações metabólicas, a maioria deles, com exceção dos fosfatos e fosfonatos, apresentam potencial anticolinesterásico baixo ou nulo em sua forma não-metabolizada (JOKANOVIC, 2001). A biotransformação de organofosforados não-tóxicos a metabólitos ativos

ocorre por intermédio de um grupo de reações, sendo a mais representativa destas a dessulfuração oxidativa do grupo tiofosfato, convertendo a ligação tiofosforila ($P = S$) a fosforila ($P = O$). Assim, os fosforotioatos e os fosforoditioatos, que são fracos inibidores da AChE (em virtude da relativamente baixa eletronegatividade do enxofre em relação ao oxigênio), são convertidos em suas formas oxidadas, que são compostos anticolinesterásicos extremamente tóxicos (JOKANOVIC, 2001).

O uso errado dos pesticidas organofosforados tem um impacto importante na Humanidade, que inclui desde agressões ao meio ambiente, até inúmeros casos de intoxicação de humanos e animais. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram cerca de três milhões de envenenamentos humanos e aproximadamente mais de 220.000 mortes causadas por pesticidas por ano, em todo o mundo (SOGORB, 2004, CARLTON, 1998).

Dentre os indivíduos expostos acidentalmente a estes produtos, estão os que manipulam estas substâncias nos seus ambientes de trabalho, aqueles que se expõem por falta de higiene, ou por contaminação direta de alimentos, ou por ingestão acidental. Existe ainda, a contaminação voluntária, como tentativa de suicídio (LARINI, 1993, BARDIN, 1994), que é extremamente expressiva (CARLTON, 1998). A toxidez destes produtos varia enormemente, sendo os de maior toxidez usados como agentes de guerra química e na agricultura, os de toxidez intermediária, como inseticidas para animais, e os de mais baixa toxidez, podem ser usados como inseticidas domésticos (CARLTON, 1998).

1.1.2 - OS AGENTES NEUROTÓXICOS

No final da década de 30 do século XX, um cientista alemão, o Dr. Gerhard Schraeder, pesquisando inseticidas com base em uma estrutura organofosforada, chegou ao composto tabun (*o*-etil-*N,N*-dimetil-fosforamido-cianidato) (9) (FIG.1.5, página 28). Porém, devido à sua alta letalidade para os animais, seu uso como inseticida foi descartado. Nesta mesma época, Schraeder também sintetizou *o*-isopropil-metil-fosfono-fluoridato, que mais tarde seria denominado sarin (10) (FIG.1.5, página 28). A alta toxidez desta substância levou-a, da mesma forma que no caso seu antecessor, ter seu emprego como inseticida descartado (SIDELL, 1997).

Contudo, militares alemães tiveram interesses despertados por estas substâncias. Em 1944, Richard Kuhn sintetizou *o*-pinacolil-metil-fosfono-fluoridato, mas conhecido como soman (11) (FIG.1.5, página 30). Ao final da II Guerra Mundial os alemães tinham grandes estoques dos agentes tabun e sarin. Foram estimados estoques entre 10.000 a 30.000 toneladas de tabun e menores quantidades de sarin destinados ao uso militar. Soman não foi produzido em larga escala. Apesar deste arsenal químico e dos aliados não terem conhecimento dos antídotos contra tais agentes, os mesmos nunca chegaram a ser empregados pelos alemães. Após a derrota do regime nazista, cientistas alemães deram início a pesquisas na área, agora em favor dos aliados e da União Soviética. A OTAN atribuiu os seguintes códigos de identificação aos agentes químicos: GA (tabun), GB (sarin), GD (soman) (SIDELL, 1992).

No início da década de 50, novamente decorrente de pesquisas para novos inseticidas, a Inglaterra sintetiza *o*-etil S-[2-(diisopropilamino)etil]-metil-fosfonotioato (13) (VX-Código OTAN, FIG. 1.5, página 30) (SIDELL, 1992).

Os quatro agentes: GA, GB, GD e VX (FIG.1.5, página 30), pelas suas características foram padronizados para uso em munição química e estocados em grandes quantidades por vários países. Os EUA e a antiga URSS foram os que mais estocaram. Isto faz com que eles sejam os principais agentes neurotóxicos estudados em defesa química (SIDELL, 1997).

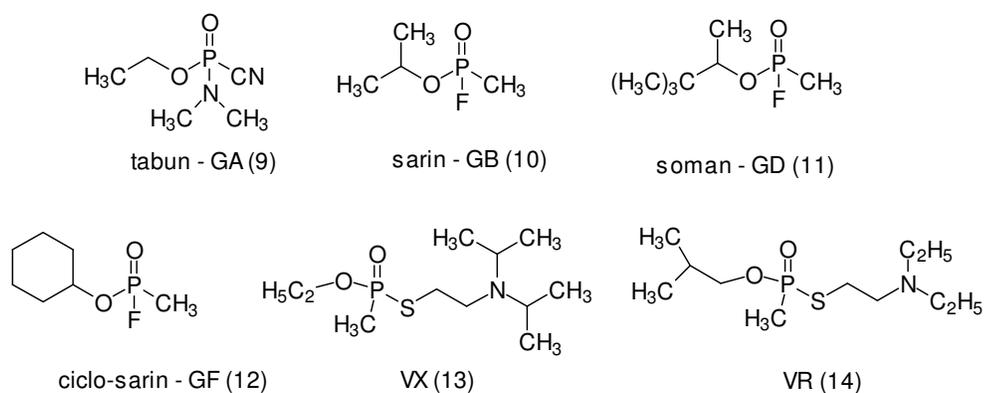


FIG. 1.5 - Principais agentes neurotóxicos: nomenclatura da OTAM, nome comum e estrutura química.

Além dos quatro agentes neurotóxicos principais existe ainda um antigo agente denominado GF (12) (ciclo-sarin – *o*-cicloexil-metil-fosfono-fluoridato), de fabricação

similar ao sarin; este neurotóxico teria sido descartado pelos Estados Unidos como sendo sem interesse, por razões ainda não esclarecidas, e foi fabricado pelo Iraque durante a Guerra do Golfo (SIDEELL, 1997). O VR (14) (VX russo – *o*-isobutil S-[2-(dietilamino)etil]-metil-fosfonotioato) é um análogo do VX desenvolvido na antiga União Soviética (FIG. 1.5, página 30).

Os agentes neurotóxicos são líquidos incolores à temperatura ambiente: o ponto de ebulição deles varia de 158 °C (sarin) a 298 °C (VX). Os compostos da série G são relativamente voláteis e oferecem maiores riscos quando inalados. O VX é muito pouco volátil, e semanas podem ser necessárias para que se dissipe por completo, conseqüentemente, o VX oferece pouco risco de ser inalado (a menos que a temperatura esteja elevada), mas um altíssimo risco de ser absorvido através da pele (SIDEELL, 1997). A Tabela 1.3 (página 32) mostra algumas propriedades físicas, químicas e toxicológicas dos principais agentes neurotóxicos.

TAB. 1.3 – Propriedades físicas, químicas e toxicológicas dos principais agentes neurotóxicos.

PROPRIEDADE	TABUN (GA)	SARIN (GB)	SOMAN (GD)	VX
Massa molecular (Da)	162,3	140,1	182,2	267,4
Ponto de ebulição (°C)	230	158	198	298
Ponto de fusão (°C)	- 49	- 56	- 80	- 20
Pressão de vapor (mm Hg)	0,037 (20°C)	2,1 (20°C)	0,40 (25°C)	0,0007 (20°C)
Densidade: Vapor (relativo ao ar)	5,6	4,9	6,3	9,2
Líquido (g/ml a 25°C)	1,08	1,10	1,02	1,01
Volatilidade (mg/m ³ a 25°C)	610	22.000	3.900	10,5
Solubilidade em água	9,8g/100g (25°C)	miscível	2,1g/100g (20°C)	miscível
Persistência no solo	1–1,5 dia (meia-vida)	2–24 h (5 a 20°C)	relativamente persistente	2–6 dias
LC _{t50} em humanos ^a (mg.min/m ³)	400	100	50	10
LD ₅₀ em humanos ^b (mg/70 kg de humano)	1.000 (percutâneo)	1.700 (percutâneo)	350 (percutâneo)	6–10 (percutâneo)

(a) LC_{t50}: exposição a vapor ou aerossol (produto da concentração pelo tempo de exposição) letal a 50% da população exposta

(b) LD₅₀: dose letal a 50% da população exposta a outras rotas de administração

FONTES: Sidell (1997) e Marrs (2007).

Todos estes agentes apresentam isomeria óptica: tabun, sarin, ciclo-sarin, VX e VR apresentam um átomo de fósforo quiral, enquanto que o soman possui, além deste, um segundo centro estereogênico em um átomo de carbono do grupo pinacolil. Estes estereoisômeros diferem entre si na velocidade com que reagem com a AChE, apresentando propriedades toxicológicas bem diferentes (BENSCHOP & DE JONG, 1988). As diferenças de propriedades toxicológicas entre os estereoisômeros de um mesmo neurotóxico resultam da estereoquímica do sítio ativo da AChE, que favorece a acomodação nele de um dos enantiômeros, em detrimento do outro.

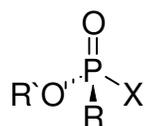


FIG. 1.6 – Configuração absoluta dos enantiômeros dos agentes neurotóxicos mais ativos na inibição da AChE (BENSCHOP & JONG, 1988).

Existe um grande interesse no estudo da cinética de atuação destes agentes neurotóxicos em função à irreversibilidade da AChE, após a etapa de envelhecimento (que será explicado mais adiante). A velocidade do envelhecimento varia entre os diferentes organofosforados.

O tabun possui o tempo de meia-vida em aproximadamente 19 horas para o envelhecimento da enzima fosforilada; o sarin, 3 horas; o ciclo-sarin, 7 horas; o VX, 36,5 horas; e para o soman, cerca de 2 minutos apenas (WOREK, 2004; WOREK, 2005). A altíssima velocidade de envelhecimento do soman representa um desafio para o tratamento de indivíduos afetados por este agente, pois exige uma administração quase que imediata dos antídotos atualmente existentes. Acredita-se que o rápido envelhecimento do soman seja consequência da formação de um carbênio terciário (que posteriormente se rearranja em compostos neutros) pela migração de um grupo metila do cátion secundário pinacolil, migração esta facilitada por um mecanismo “push-pull” (QIAN & KOVACH, 1993; BENCSURA, 1995; VIRAGH, 1997; SAXENA, 1998).

Os agentes neurotóxicos estão entre as substâncias mais mortais existentes no planeta, talvez atrás apenas das neurotoxinas biológicas (como a botulina, por exemplo). Conhecidos também como “gases dos nervos” são relativamente simples

e baratos de serem sintetizados, facilmente dispersados, difíceis de serem detectados, temidos pela opinião pública e de altíssimo potencial de letalidade, o que os torna armas adequadas para fins terroristas (CANNARD, 2006, NAGAO, 1997).

Na Guerra do Golfo, houve rumores sobre a ameaça da utilização destas armas químicas, o que motivou a distribuição de máscaras contra estes agentes e atropina, para a população civil em Israel (ROSATI, 1995), e os militares, por sua vez, portavam auto-injetores contendo atropina e pralidoxima, para tratar da eventual exposição aos agentes neurotóxicos (CARLTON, 1998).

Estes agentes tornaram-se notórios, pelo seu uso como armas em ataques terroristas, como o que ocorreu em 19 de março de 1995, no metrô de Tóquio, no Japão, envolvendo o agente neurotóxico sarin (ROSATI, 1995; NAGAO, 1997; CARLTON, 1998).

Recentemente, dezenas de engenheiros iranianos e 15 militares sírios morreram em um teste com arma de destruição em massa realizado em 23 de julho de 2007 na Síria. (Globo on line, 2007).

A equipe sírio-iraniana estava tentando montar uma ogiva química em um míssil Scud quando a explosão ocorreu, espalhando agentes químicos letais - incluindo o agente sarin - no local.

De acordo com a entidade Global Security, a Síria não é signatária da Convenção de Armas Químicas (CWC), um acordo internacional que proíbe a produção, o estoque e o uso de armas químicas.

A Síria teria começado a desenvolver armas químicas em 1973, pouco antes da guerra do Yom Kippur, contra Israel. Para a Global Security, Damasco tem um dos mais avançados programas de armas químicas no Oriente Médio.

A Tabela 1.4 (página 35) mostra um breve histórico sobre o uso de armas químicas, incluindo o uso destes agentes neurotóxicos.

TAB. 1.4 - Breve histórico sobre o uso de armas químicas.

Ano	Acontecimento
1915-18	Emprego de armas químicas na Primeira Guerra Mundial.
1936	O químico alemão Gerhard Schrader sintetiza o agente neurotóxico tabun.
1937	Schrader e sua equipe sintetizam o agente neurotóxico sarin.
1940-45	A Alemanha emprega Zyklon B, uma forma de cianeto de hidrogênio, em suas câmaras de gás.
1942	A Alemanha começa a produzir agentes dos nervos em Dyhenfurth.
1944	O alemão Richard Kuhn sintetiza o agente neurotóxico soman.
1984-86	Uso comprovado de armas químicas pelo Iraque, em sua guerra contra o Irã.
1988	Emprego de armas químicas pelo Iraque na repressão aos curdos, no norte do país.
1994	Atentado com sarin em Matsumoto, Japão, pela seita Aum Shinrikyo, resultando em 7 mortes e mais de 300 feridos.
1995	Aum Shinrikyo realiza um atentado com sarin no metrô de Tóquio, com 12 mortes e milhares de feridos.

1.2 - AS COLINESTERASES

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica (RANG, 2001). Estas enzimas mostram um polimorfismo das estruturas quaternárias, de atividade catalítica similar, mas diferindo nos seus parâmetros hidrodinâmicos e nas interações iônicas ou hidrofóbicas (TAYLOR & RADIC, 1994). Estas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ, 1993).

A acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8) são as enzimas que compõem o grupo das colinesterases. A primeira hidrolisa principalmente a acetilcolina e está associada principalmente aos nervos e aos músculos (sendo encontrada tipicamente nos contatos sinápticos). As vias colinérgicas do SNC, as junções neuromusculares e os eritrócitos contêm principalmente AChE, enquanto o plasma apresenta principalmente a forma de butirilcolinesterase (BuChE) (MASSOULIÉ, 1993).

Embora não esteja bem esclarecido o papel bioquímico da AChE eritrocitária, esta enzima apresenta sensibilidade similar àquela do SNC a diversos inibidores, tais como os organofosforados (WOREK, 2004). Desta forma, a utilização de sangue, um material de coleta biológica pouco invasivo, poderia ser de fundamental importância como dado laboratorial auxiliando em conjunto com os demais testes biológicos para o diagnóstico de um evento de intoxicação, sendo de interesse científico à avaliação da atividade da acetilcolinesterase sanguínea.

Desde a primeira determinação de estrutura primária de uma colinesterase (SCHUMACHER, 1986), tornou-se evidente que estas enzimas definem uma família única de serina hidrolases (TAYLOR & RADIC, 1994). Diferenças nas sequências destas enzimas, que resultam em tamanhos diferentes de cavidades nos sítios ativos, explicam suas diferentes especificidades (MASSON, 1997).

A concentração do substrato pode influenciar a atividade enzimática, dependendo da colinesterase considerada, uma vez que a AChE inibida por excesso de substrato enquanto a BuChE não apresenta tal efeito (NUNES-TAVARES, 2002).

Apesar da função fisiológica da BuChE não estar totalmente elucidada, sabe-se que esta enzima hidrolisa uma variedade de xenobióticos como aspirina, succinilcolina, heroína e cocaína (KLAASSEN, 1996).

1.2.1. A ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7, FIG.1.7) é a enzima responsável pela terminação da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através de uma rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (FIG. 1.7, página 37), reação que ocorre no interior do sítio ativo da acetilcolinesterase. Estas fibras colinérgicas são responsáveis pela estimulação de vários organismos e músculos voluntários e ocorre no sistema nervoso central e no periférico (RANG, 2001).

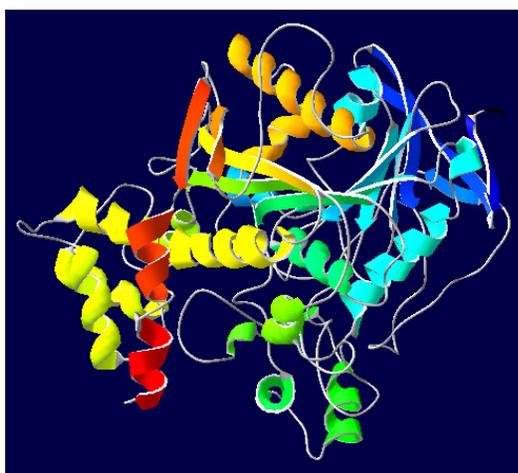


FIG. 1.7 – Acetilcolinesterase.

Caso a acetilcolina não seja hidrolisada, ocorrerá um acúmulo da mesma nos sítios de transmissão colinérgica, o que levará a superestimulação das estruturas enervadas. Os efeitos dessa acumulação de acetilcolina são diversos, sendo os mais relevantes: convulsões, depressão respiratória, arritmia cardíaca e fraqueza. A letalidade do processo deriva da parada respiratória central (depressão do centro respiratório) ou periférica (paralisa dos músculos respiratórios) (PATRICK, 2001; RANG, 2001).

E é por esta função chave, que a acetilcolinesterase se torna um dos alvos mais importantes dos agentes químicos de guerra e inseticidas.

A acetilcolinesterase é classificada como uma serina hidrolase. Possui gargalo com profundidade de 20Å, na base do gargalo situam-se os resíduos da tríade catalítica: Ser-203, His-447 e Glu-334 (SUSSMAN, 1991).

A acetilcolinesterase é uma das enzimas de maior eficiência catalítica que se conhece, com a capacidade de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de acetilcolina por

molécula de enzima por minuto, o que significa um tempo de renovação de 150 micro-segundos (SILMAN & SUSSMAN, 2005).

O mecanismo catalítico possui o grupamento OH da serina que se torna altamente nucleofílico por um sistema de reposição de carga que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (TAYLOR, 1994). Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acil-enzima com liberação concomitante da colina (FIG. 1.8).

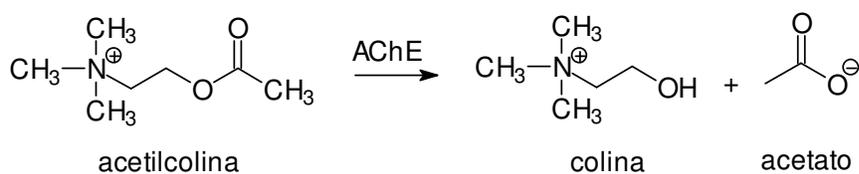
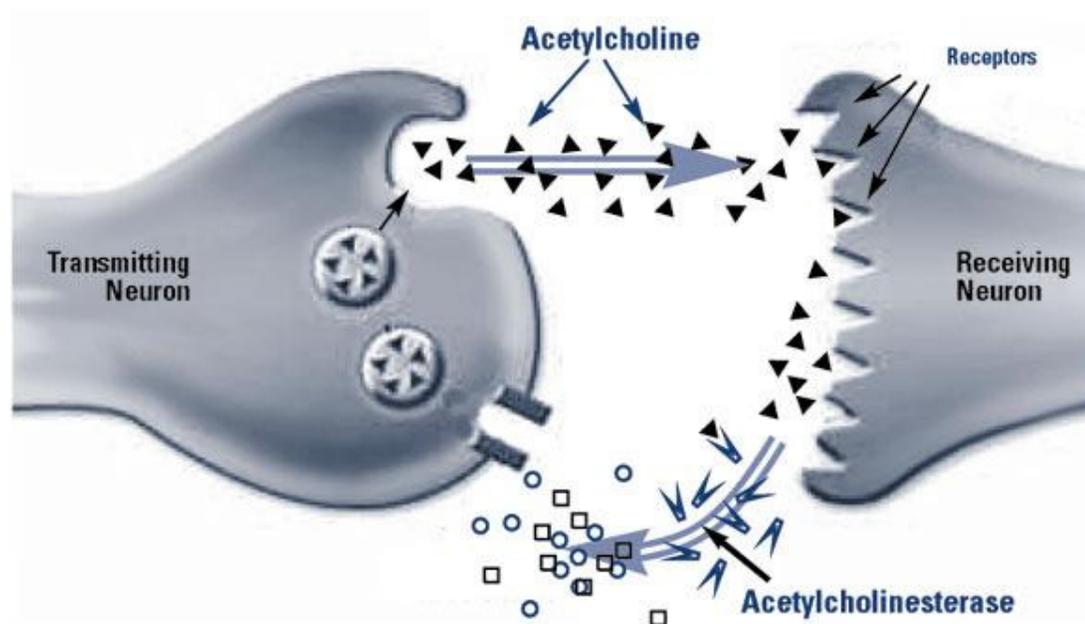


FIG. 1.8 - Interação e reação de hidrólise do substrato (ACh) com a AChE.

A acetil enzima é passível de hidrólise e essa resulta na formação do acetato e na regeneração da enzima ativa (FIG. 1.9) (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

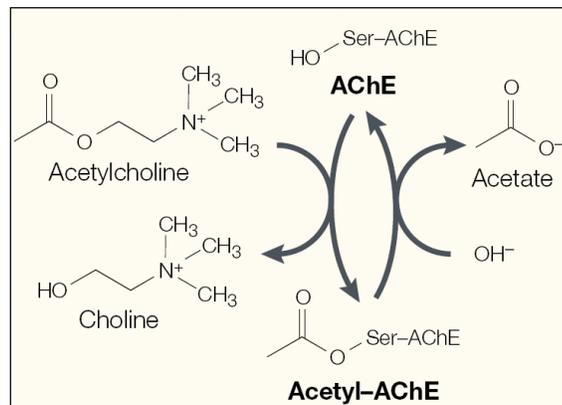


FIG. 1.9 - Hidrólise da ACh pela enzima AChE (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios; um sítio carregado negativamente ou “aniônico” ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário $[-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ da acetilcolina carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos (FIG. 1.10), que aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (TAYLOR & BROWN, 1999).

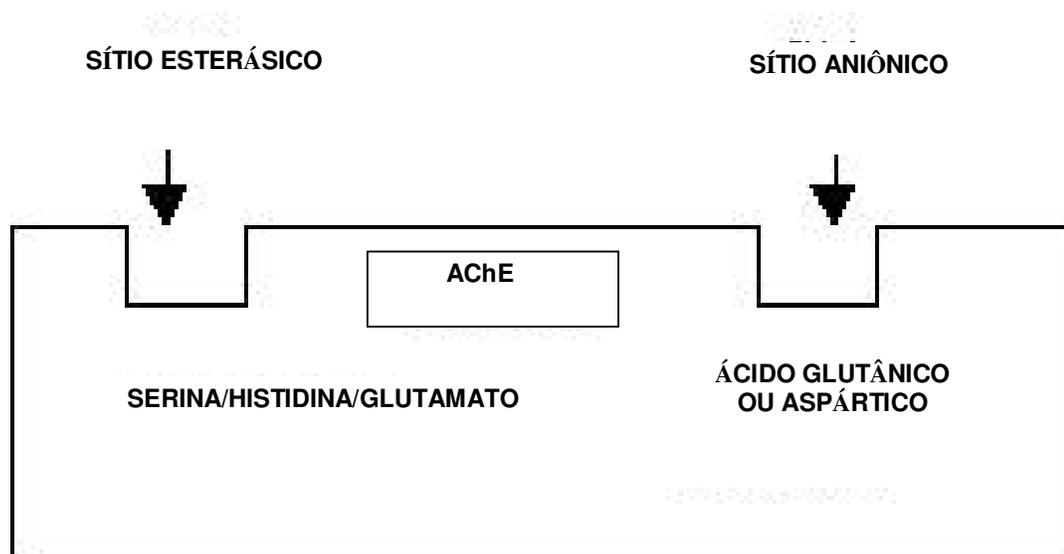


FIG. 1.10 – Esquema do sítio esterásico e aniônico da AChE.

Um segundo sítio “aniônico” que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site* - PAS) foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Sugere-se que este sítio periférico possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES, 2002; SILMAN & SUSSMAN, 2005). A ocupação do sítio periférico afeta a conformação do centro ativo e também a configuração ou a afinidade dos compostos ligados ao centro ativo.

O esquema da Figura 1.11 mostra o mecanismo de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela tríade catalítica Serina-Histidina-Glutamato que compõe o sítio esterásico da AChE.

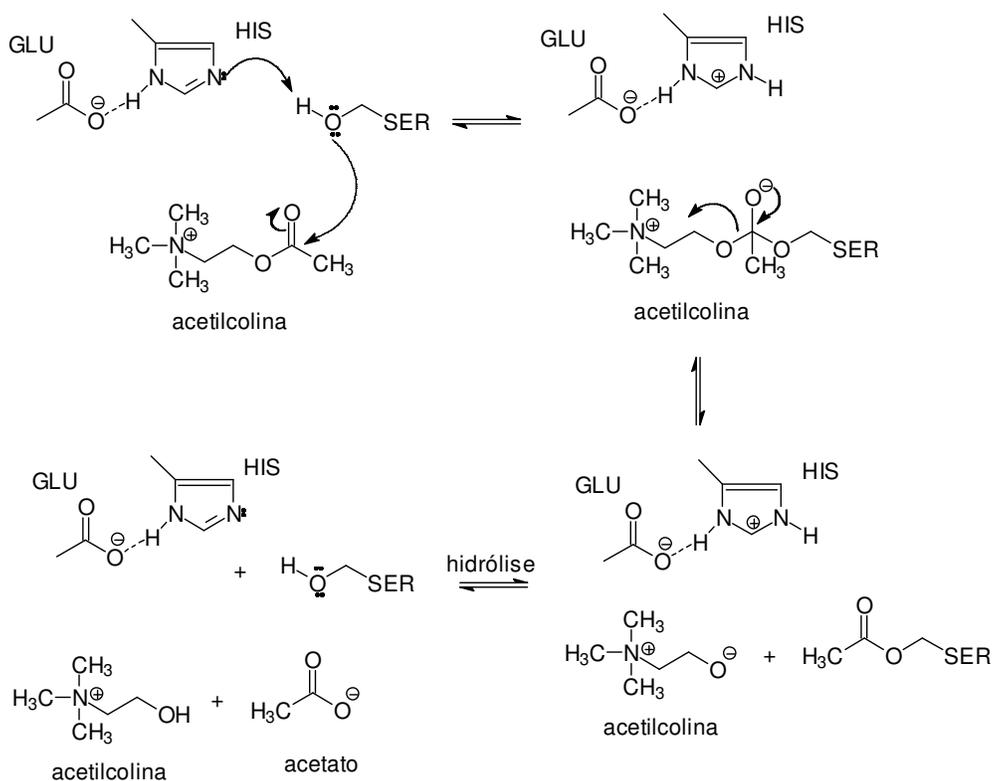


FIG. 1.11 – Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (DOS SANTOS, 2007).

1.3 - ORGANOFOSFORADOS: DROGAS QUE INIBEM AS COLINESTERASES

Os compostos anticolinesterásicos de ação periférica pertencem a três grupos principais, de acordo com a natureza de sua interação com o sítio ativo, que determina sua duração de ação. A maioria inibe de modo aproximadamente similar a AChE (acetilcolinesterase) (RANG, 2001). São elas:

- Anticolinesterásicos de ação curta (Ex: edrofônio (13));
- Anticolinesterásicos de ação média (Ex: neostigmina (14), fisostigmina (15));
- Anticolinesterásicos irreversíveis (Ex: diclorflós (16), ecotiopato (17), paration (3) (FIG.1.4, pág 28) e agentes dos nervos (FIG.1.5, pág 30) (SOMANI & ROMANO, 2001).

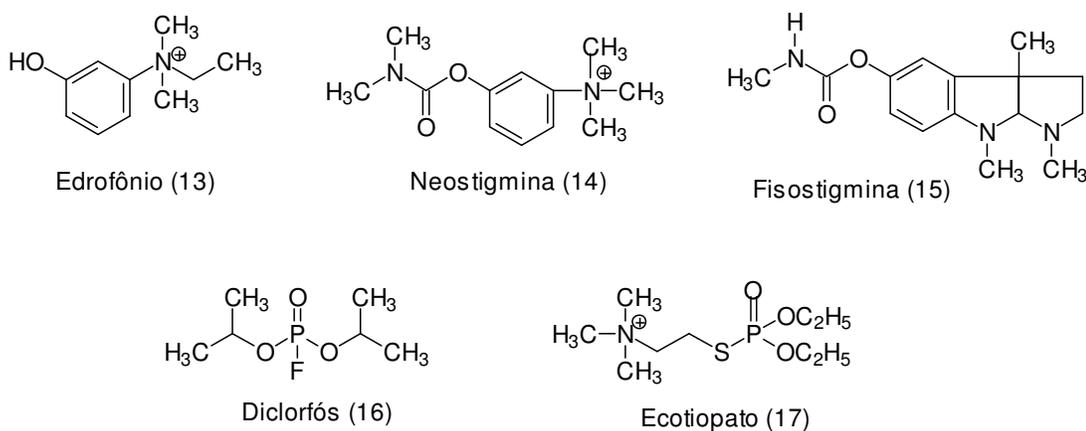


FIG. 1.12- Compostos anticolinesterásicos.

Os anticolinesterásicos irreversíveis são compostos com fósforo pentavalente e que contém um grupo de saída, como fluoreto (ex: no sarin (10), FIG.1.5, página 30; no diclorflós (16) ou um radical orgânico (ex: no paration (3), FIG. 1.4, página 28; e no ecotiopato (17)). Esse grupo é liberado, deixando o radical da molécula ligado de forma covalente através do átomo de fósforo ao grupo –OH da serina-203 da enzima humana. Em sua maioria, esses compostos organofosforados, que são numerosos, foram desenvolvidos como pesticidas ou agentes de guerra química, bem como para uso clínico. Interagem apenas com o sítio ativo da enzima e não com o grupo catiônico. O ecotiopato é uma exceção, visto que possui um grupo de nitrogênio quaternário que também se liga ao sítio aniônico da enzima acetilcolinesterase (RANG, 2001).

Em geral, a enzima fosforilada inativa é muito estável. No caso dos compostos como o diclorflós, não ocorre hidrólise considerável, e a recuperação da atividade enzimática depende da síntese de novas moléculas da enzima, um processo que pode levar várias semanas. Com outros fármacos, como o ecotiopato, ocorre hidrólise lenta após alguns dias, de modo que sua ação não é estritamente irreversível. O diclorflós (16) e o paration (3) são substâncias apolares voláteis de lipossolubilidade muito alta, rapidamente absorvidas através das mucosas e até mesmo através da pele íntegra e cutículas dos insetos. O uso dos agentes, como neurotóxicos ou inseticidas baseia-se nesta propriedade, sua intoxicação provoca sintomas como bradicardia intensa, hipotensão e dificuldade respiratória. Em associação com um bloqueio neuromuscular e efeitos centrais, o resultado pode ser fatal (RANG, 2001).

A inibição ocorre no interior do sítio ativo, perto de um aminoácido serina específico através da interação com o agente organofosforado. No caso da acetilcolinesterase humana (HuAChE), este agente liga-se covalentemente com o grupamento Ser-203. Esta ligação se dá entre o átomo de fósforo e o oxigênio da serina, com conseqüente desprendimento do grupo de saída do organofosforado (ORDENTLICH, 1996), como o mecanismo mostrado abaixo na Figura 1.13 (página 43).

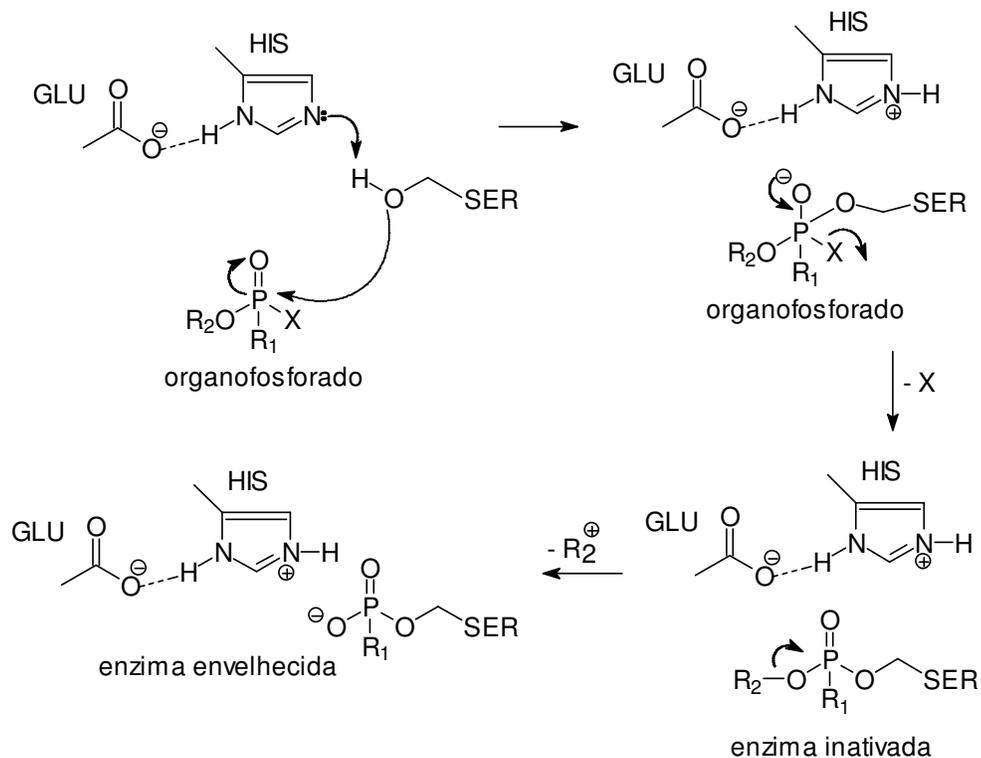


FIG. 1.13 – Esquema geral de inibição da acetilcolinesterase, onde X é o grupo de saída do agente organofosforado (DOS SANTOS, 2007).

1.4 - MECANISMO DE REATIVAÇÃO DA AChE

Para re-ativar a enzima inibida, geralmente se empregam substâncias conhecidas como oximas que reagem com o fósforo da serina fosforilada antes da etapa de envelhecimento. A compreensão deste mecanismo de reativação da AChE é de vital importância para a prevenção e tratamento dos casos de intoxicação pelos organofosforados (EDDLESTON, 2002; MASSON, 1997; GROSFELD, 1996; ASHANI, 1995; BENCSURA, 1995, SAXENA, 1993; SCHWART, 1972). A reativação da enzima depende tanto dos grupamentos do organofosforado assim como da natureza do re-ativador (LUO, 1998).

Na Figura 1.14 é apresentado um mecanismo proposto para a reativação da acetilcolinesterase e mostra que a eficiência de uma oxima é em função da nucleofilicidade do oximato (EYER & WOREK, 2007).

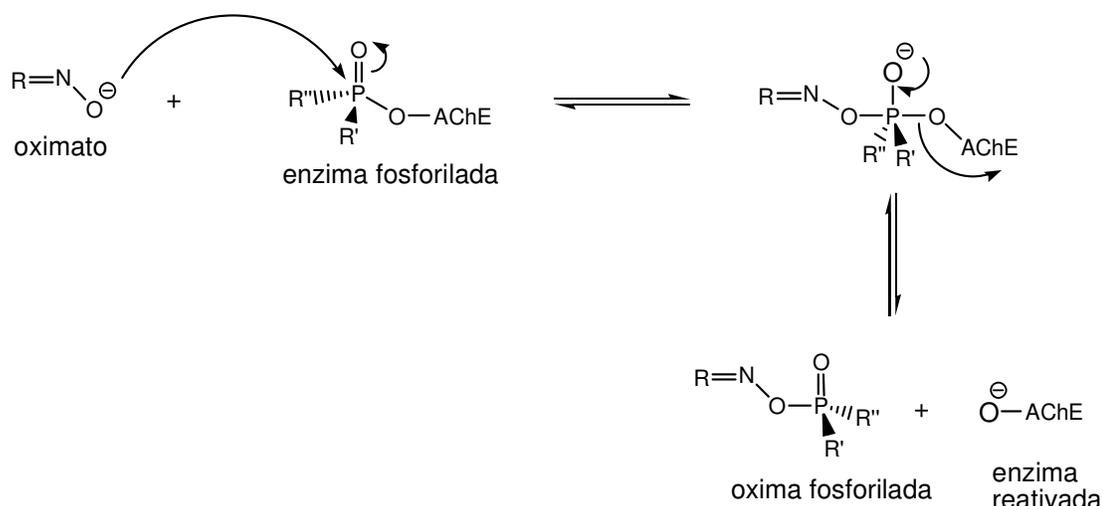


FIG. 1.14 - Mecanismo de reativação da AChE fosforilada pelas oximas.

1.5 - ENVELHECIMENTO DA AChE

A acetilcolinesterase inibida por neurotóxicos é considerada envelhecida quando há dealquilação da forma fosforilada. A enzima envelhecida dificilmente pode ser reativada por oximas. Ao contrário da enzima acetilada, a enzima fosforilada reage lentamente com a água, o que permite a dealquilação do substituinte alcoxila ligado ao átomo de fósforo (processo conhecido como envelhecimento) (FIG. 1.15, página 45).

O resultado é o surgimento de uma forte ligação entre o resíduo da histidina protonada do sítio catalítico e o átomo de oxigênio negativamente carregado do inibidor.

A histidina protonada não pode funcionar como catalisador básico geral para hidrólise da enzima fosforilada, necessária para reativação da acetilcolinesterase.

O processo de fosforilação depende muito da estrutura química do organofosforado inibidor. A interação da AChE e seu inibidor organofosforado parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, sendo esta estabilidade relacionada fundamentalmente com a estrutura química do inibidor.

A janela terapêutica das oximas é, muitas das vezes determinada pela taxa de envelhecimento (EDDLESTON, 2002).

"Aging" ou Envelhecimento

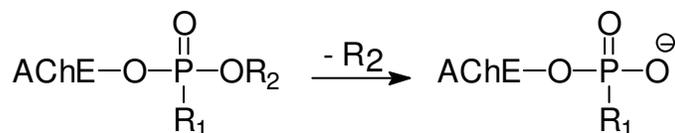


FIG. 1.15 - Esquema de envelhecimento da acetilcolinesterase.

1.6 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA POR ANTI-COLINÉRGICOS (RANG, 2001; SIDELL, 1997)

As manifestações clínicas mais comuns são listadas abaixo:

- Distúrbios cutâneo-mucosos: pele quente, seca e ruborizada, com erupções eritematosas ou escarlatiniformes. Secura das mucosas.
- Distúrbios oculares: pupilas dilatadas não reagentes, visão embaçada, fotofobia, paralisia de acomodação (olhos sem movimento), aumento da pressão intra-ocular.
- Distúrbios cardiocirculatórios: taquicardia, anormalidades no eletrocardiograma, hipertensão arterial.
- Distúrbios digestivos: dificuldade de deglutição, ruídos abdominais, diminuídos, constipação. Boca, lábios e língua secas. Sede intensa.
- Distúrbios periféricos / Sistema Nervoso Central: agitação, inquietude, hiperreflexia, incoordenação muscular, ataxia, distúrbios de fala, desorientação, confusão mental e alucinações geralmente visuais, vivas e coloridas.
- Outras manifestações: hipertermia, retenção urinária, diminuição das secreções salivar, gástrica e sudorípara.
- Em pacientes pediátricos: rubor da face, midríase bilateral e expressão desorientada. Hipertermia, grande agitação psicomotora e comportamento bizarro. Choro e risos alterados, linguagem incompreensível, desconexa, além de agressividade.

1.7 - TRATAMENTO

A base do tratamento médico da intoxicação por agentes neurotóxicos é a administração de antídotos específicos. Devido à rapidez de ação destes agentes, os antídotos são empregados em seringas auto-injetoras, de forma que possam ser usados pela própria vítima ou por um companheiro aos primeiros sinais de intoxicação.

Atualmente, os antídotos empregados dividem-se em três componentes (CASTRO, 2002; THIERMANN, 1999; VOLANS, 1996):

- Uma substância anticolinérgica, para diminuir os efeitos da acumulação de acetilcolina, em geral a atropina;
- Um depressor do sistema nervoso central, para reduzir a incidência de convulsões e espasmos musculares, em geral diazepam;
- Um re-ativador da acetilcolinesterase (**oxima**).

A principal deficiência no tratamento atualmente é a oxima (FIG. 1.16), o antídoto que age revertendo a intoxicação. Nenhuma delas possui desempenho satisfatório contra os principais agentes neurotóxicos de guerra.

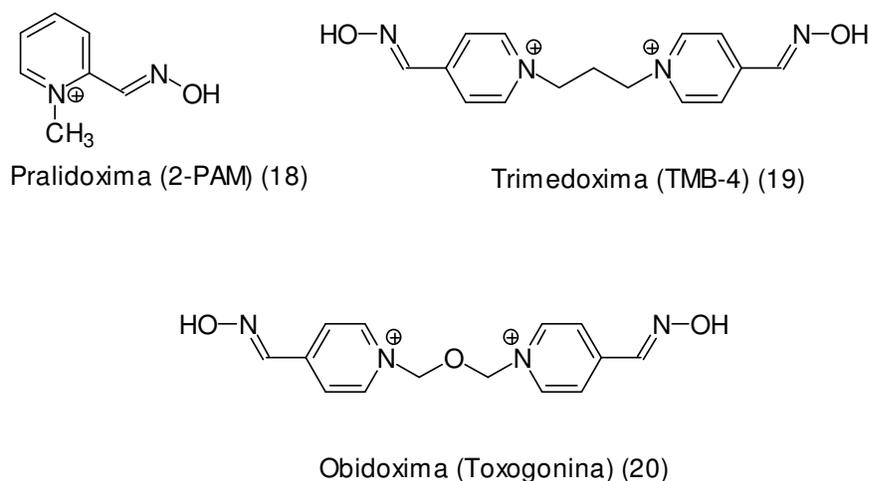


FIG. 1.16 - Principais oximas empregadas atualmente.

Em especial, todas estas oximas têm uma capacidade de reativação da AChE muito limitada no caso de intoxicação por soman, devido à rápida ocorrência de envelhecimento (“aging”) do complexo soman-enzima que ocorre em dois minutos (KIM, 2005; CASTRO, 2002).

Esta deficiência incentivou à síntese de novos tipos de oximas, das quais destacam-se as denominadas oximas de Hagedorn (H) (FIG. 1.17), que tem apresentado resultados promissores na reativação da AChE inibida por soman.

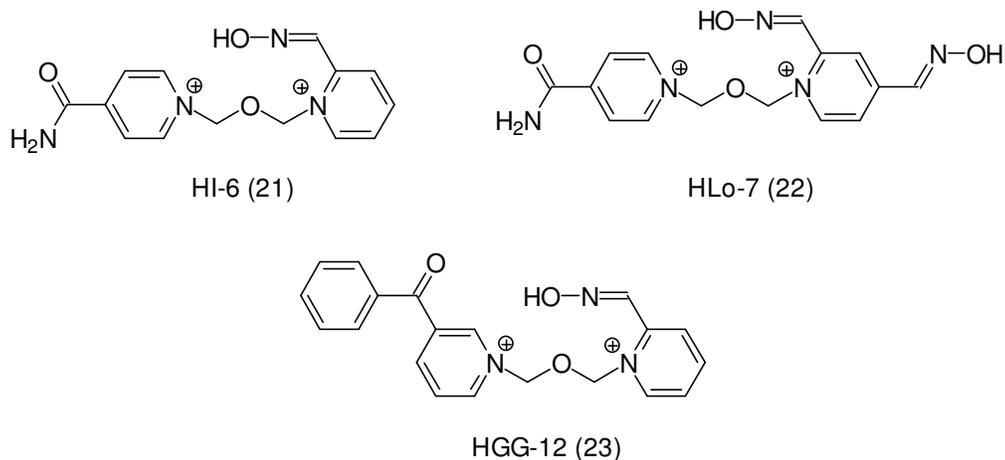


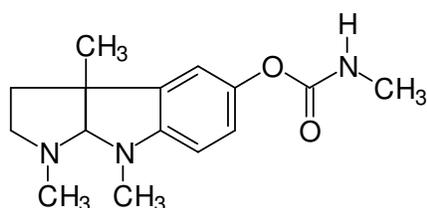
FIG. 1.17 - Exemplos de oximas de Hagedorn.

As oximas, em geral, são empregadas para a reativação da AChE inibida por organofosforados, sob a ressalva de que a enzima fosforilada ainda não esteja envelhecida. Elas são muito úteis no tratamento dos efeitos nicotínicos dos neurotóxicos. As diversas oximas adotadas diferem entre si na dose necessária para a reativação, na toxidez e na efetividade. Entretanto, elas apresentam três grandes deficiências:

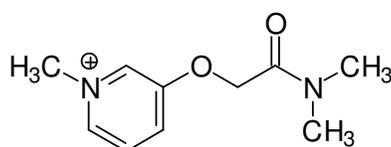
- Geralmente, utilizam-se oximas de íons de amônio quaternários, que não são capazes de cruzar a barreira sangue-cérebro. Em consequência, elas não reativam a AChE no SNC;
- As oximas não reativam a enzima fosforilada envelhecida;
- Ao contrário da atropina, as oximas não são efetivas contra todos os neurotóxicos, apresentando grandes diferenças de atividade em relação aos diversos organofosforados.

Uma série de oximas têm sido sintetizada, avaliando-se suas capacidades de reativar a AChE inibida por agentes neurotóxicos (LUCIC, 1997; KIM, 2005; KUCA, 2005; CALIC, 2006; KUCA, 2006; KASSA & KARASOVA, 2007; KUCA, 2007; MUSILEK, 2007; KASSA, 2008; JUN, 2008).

Além das oximas existem outras formas de tratamento para este tipo de intoxicação. Uma delas é a proteção da AChE através da pré-contaminação por inibidores reversíveis, os carbamatos (FIG. 1.18), sendo esta forma usada quando há uma expectativa de exposição pelos agentes neurotóxicos. Os carbamatos atuam se ligando a AChE e impedindo que ela se ligue irreversivelmente ao organofosforado. (ECKERT, 2006).



Fisostigmina (15)



Piridostigmina (24)

FIG. 1.18 – Carbamatos usados como inibidores reversíveis no pré-tratamento de intoxicações da AChE.

Uma outra forma de pré-tratamento é a utilização de “scavengers”. São os agentes sequestrantes ou que degradam os agentes neurotóxicos antes que eles cheguem a AChE. Podem ser usadas enzimas como as colinesterases e β -esterases em geral, que se ligam estequiometricamente ao organofosforado, (denominados agentes sequestrantes estequiométricos), ou podem ser usados também as hidrolases e anidrases de organofosforados que atuam como agentes sequestrantes catalíticos, elas hidrolisam as moléculas dos agentes neurotóxicos. (DOCTOR, 2005).

Algumas enzimas estão sendo estudadas como “scavengers”, a butirilcolinesterase obtida do plasma humano e a butirilcolinesterase humana recombinante expressa no leite de cabras transgênicas (DOCTOR, 2005).

Dando continuidade aos trabalhos que foram realizados no IME pelo do nosso grupo de pesquisa (CASTRO & FIGUEROA-VILLAR, 2002; SILVA, 2005; GONÇALVES, 2006), buscamos antídotos mais eficientes contra agentes

neurotóxicos, sendo o foco desta tese a síntese, teste de atividade biológica de reativação da AChE inibida por organofosforados e alguns estudos de interações por RMN para responder aos nossos questionamentos e dar prosseguimento nesta linha de pesquisa.

1.8 – JUSTIFICATIVAS DA TESE

Inseticidas a base de organofosforados são usados no meio civil para controlar várias espécies de insetos de interesse econômico e domiciliar. Devido a sua disponibilidade, estes inseticidas têm sido utilizados em casos de envenenamentos homicidas e suicidas levando a cerca de 220.000 óbitos por ano.

Existem também alguns compostos organofosforados, tais como: sarin, soman, tabun e VX que fazem parte de formulações usadas como agentes de guerra química. A experiência de duas grandes guerras e o aperfeiçoamento constante que os agentes químicos de guerra e seus métodos de lançamento e emprego vem sofrendo, situam a Guerra Química como uma das mais importantes ameaças à ordem pública e paz mundial, principalmente em função do seu relativamente baixo custo e da tecnologia necessária ser muito simples e estar amplamente disponível. Existe uma grande preocupação da Organização das Nações Unidas (ONU) e diversas forças armadas em buscar antídotos para estes agentes químicos. Atualmente, o mais importante protocolo para o controle das armas químicas é a Convenção para Proibição de Armas Químicas e Biológicas, que vigora desde 1997 e reafirma os termos do protocolo de Genebra de 1925. Este protocolo junto com outros mecanismos internacionais de controle busca impedir a utilização destas armas pelas nações e suas forças armadas. Porém, o interesse de organizações terroristas, evidentemente fora do controle da ONU faz com que a defesa contra tais agentes (Defesa Química) deixe de ser um foco de preocupação essencialmente militar e torna-se também uma preocupação no âmbito civil.

Pesquisas são realizadas tanto na área de detecção, como é o caso de desenvolvimento de novos biosensores (TAYLOR, 1992) como na área de proteção, com o surgimento de novas tecnologias para os equipamentos de proteção (LEJEUNE, 1998). Porém, é no nível de tratamento médico que a maior parte do esforço se concentra. O desenvolvimento de novos fármacos usados como pré-tratamento (carbamatos) e antídotos (oximas) contra neurotóxicos são os principais objetivos das linhas de pesquisas na área. Este trabalho está pautado no intuito de contribuir para o desenvolvimento de novas oximas, eficazes para o tratamento da intoxicação ocorrida por organofosforados neurotóxicos.

Nosso grupo de pesquisa já obteve resultados bastante importantes nesta linha. Inicialmente, o aluno de Mestrado Tenente Alexandre Taschetto de Castro fez

estudos por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurotóxicos. Seu trabalho de dissertação baseou-se em três etapas: Modelagem da Pralidoxima, com a descoberta da forma desprotonada como a mais ativa; construção de um modelo do sítio ativo inibido pelos agentes neurotóxicos com utilização de estruturas determinadas por raios-X, disponíveis no RCSB Protein Data Bank (PDB) para a construção de modelos da enzima inibida por sarin, tabun e VX e estudo da reativação da AChE (CASTRO, 2002).

O aluno de Mestrado Tenente Gustavo Rocha Silva fez um estudo de modelagem molecular por Teoria do Funcional de Densidade (DFT) da reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados. Ele realizou a análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da reação de desfosforilação, que mostrou características importantes da molécula que podem ajudar a entender seu mecanismo de ação, em especial no caso de intoxicação por soman (SILVA, 2005).

O aluno de mestrado Arlan da Silva Gonçalves fez um estudo por dinâmica molecular das interações da pralidoxima e da deazapralidoxima com a acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico tabun. Ele observou que, ao se simular processos de dinâmica molecular utilizando o modelo da acetilcolinesterase humana (HuAChE) inibida pelo organofosforado GA, é mostrado que as oximas catiônicas tem maior acessibilidade ao sítio ativo da enzima, mas que as oximas neutras também teriam capacidade de atingir o sítio ativo com certa eficiência (GONÇALVES, 2006).

Estes trabalhos são de grande incentivo para sintetizar novas e simples oximas bioativas, realizar ensaios biológicos e a partir destes resultados, escolher as melhores oximas para se fazer um estudo de suas interações com a AChE usando técnicas de RMN e fazer uma previsão destes resultados utilizando *docking* como ferramenta.

2 - OBJETIVOS

- Sintetizar oximas previamente sugeridas por modelagem molecular pelo nosso grupo de pesquisa (DE CASTRO, 2002; SILVA, 2005; GONÇALVES, 2006), especialmente oximas neutras, para avaliar experimentalmente se as oximas neutras teriam capacidade de funcionar com eficiência como antídotos para intoxicação com organofosforados neurotóxicos.
- Avaliar a eficiência na reativação da enzima acetilcolinesterase eritrocitária inibida por etil-paraoxon com estas oximas.
- Estudar as interações oxima-BSA para verificar a viabilidade de transporte das oximas sintetizadas ao alvo AChE usando a RMN através da técnica de medidas de tempos de relaxação T_1 .
- Estudar as interações oxima-AChE por RMN, realizando medidas de T_1 , T_2 e DOSY.
- Fazer um estudo prévio das interações entre as melhores oximas sintetizadas e a AChE inibida com o agente neurotóxico tabun usando ancoragem modelagem (“*docking*”).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - SÍNTESE DE OXIMAS

3.1.1 - REAGENTES, SOLVENTES E CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA.

- Os solventes usados foram: acetato de etila, hexano, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, metanol, todos fornecidos pela Vetec. Todos os solventes utilizados nas reações e nos métodos de purificação foram previamente destilados, quando necessário, e alguns deles foram tratados e secados de acordo com os métodos descritos na literatura (PERRIN, 1966).

- Os reagentes utilizados foram: 2-tiofenocarboxialdeído, 2-piridinocarboxialdeído, 2-pirroilcarboxialdeído, 1-metil-2-imidazoilcarboxialdeído, 4-metil-5-imidazoilcarboxialdeído, 2-furfurilcarboxialdeído, o-toluilcarboxialdeído, 3-nitro-salicilcarboxialdeído, 5-nitro-salicil-carboxialdeído, *N,N*-dimetil-p-aminobenzaldeído, m-aminobenzaldeído, 4-metoxi-benzaldeído, tereftaldeído, isoftaldeído, 4-cloro-benzaldeído, 4-flúor-benzaldeído, 4-nitro-benzaldeído, Na₂CO₃, NaSO₄ anidro, cloridrato de hidroxilamina, todos PA e da Sigma-Aldrich.

- A cromatografia de camada fina foi realizada usando cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por **CCF** (*Cromatografia de Camada Fina*) das reações.

3.1.2 - INSTRUMENTAL UTILIZADO NAS CARACTERIZAÇÕES ESPECTOMÉTRICAS

- Os espectros de RMN de ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz) foram obtidos em espectrômetro de marca Unity-300 (Varian), em sonda de 5 mm (IME). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes, clorofórmio (CDCl₃) e DMSO-*d*₆, na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Quando necessário foi utilizado controle de temperatura da análise, com precisão de $\pm 0,1$ °C.

- Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum One FTIR (UERJ) utilizando-se pastilhas de KBr para as amostras sólidas formadas com 1 mg da amostra e 100 mg de KBr seco.

3.1.3 - OUTROS EQUIPAMENTOS

- Aparelho Melt-Temp II para medição dos pontos de fusão.
- Evaporador rotatório da Fisaton-Modelo 802.
- Câmara de revelação para CCF equipada com lâmpadas U.V. com comprimento de onda 254 e 365nm.
- Placas de aquecimento e agitação magnética da Corning.
- Aquecedor de Raios Infra-Vermelho tipo LP-307.
- Dessecador.

3.1.4 - MÉTODO CONVENCIONAL DE SÍNTESE DAS OXIMAS

Em um balão de 50 mL foram dissolvidos cloridrato de hidroxilamina (4 mmols) em uma mistura de 10 mL de etanol e 3 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2 mmols do respectivo aldeído. O meio reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas e acompanhado por cromatografia por camada fina. Uma vez consumido todo o aldeído, o solvente foi removido por filtração à vácuo. O sólido filtrado foi lavado com água destilada e seco. A recristalização pode ser feita em etanol, metanol ou água. Os produtos foram secos em lâmpada de infravermelho por 12 horas. Os rendimentos foram em torno de 70-85 %.

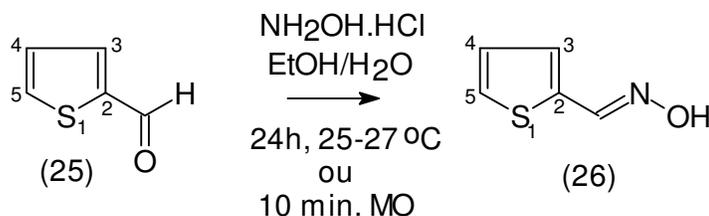
3.1.5 - MÉTODO POR MICRO-ONDAS

Em um balão de 100 mL foram dissolvidos 4 mmols de cloridrato de hidroxilamina em uma mistura de 20 mL de etanol e 6 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2 mmols do respectivo aldeído. O meio reacional foi mantido no micro-ondas doméstico (potência de 160 W com frequência de 2.450 MHz) adaptado com condensador e banho de termostato por 10 minutos e acompanhado por cromatografia por camada fina. Uma vez terminada a reação, o solvente foi removido por filtração à vácuo. O sólido foi lavado com água destilada e seco. A recristalização pode ser feita em etanol, metanol ou água. Os produtos

foram secos em lâmpada de infravermelho por 12 horas. Os rendimentos foram em torno de 80-90 %.

3.1.6 - OXIMAS SINTETIZADAS

3.1.6.1 - SÍNTESE DA 2-TIOFENOALDOXIMA



Pelo método convencional, em um balão de 50 mL foram dissolvidos 0,278g (4 mmols) de cloridrato de hidroxilamina em uma mistura de 10 mL de etanol e 3 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 0,18 mL (2 mmols; $d= 1,223$) de tiofeno-2-carboxialdeído. O meio reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas e acompanhado por cromatografia por camada fina. O solvente foi removido por filtração à vácuo. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e seco em lâmpada de infravermelho por 12 horas. Foram obtidos após recristalização com água destilada 0,203 g (80 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca (pf: 135-137°C).

Pelo método de micro-ondas, em um balão de 100 mL foram dissolvidos 0,278g (4 mmols) de cloridrato de hidroxilamina em uma mistura de 20 mL de etanol e 6 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 0,18 mL (2 mmols; $d= 1,223$) de tiofeno-2-carboxialdeído. O meio reacional foi mantido no micro-ondas doméstico (potência de 160 W com frequência de 2.450 MHz) adaptado com condensador e banho de termostato por 10 minutos e acompanhado por cromatografia por camada fina. O solvente foi removido por filtração à vácuo. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e seco em lâmpada de infravermelho por 12 horas. Foram obtidos após recristalização com água destilada 0,228 g (90 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca.

pf: 135-137°C (pf_{lit}: 135-136° C, GRUNANGER, 1959).

IV (cm^{-3} , KBr):

ν **O-H**: 3121

ν **C-H** (Csp^2): 3017

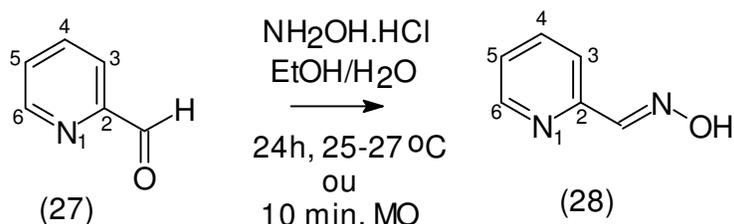
ν **C=N-OH**: 1632

ν **C=C**: 1507-1435

RMN ^1H (ppm, $\text{DMSO-}d_6$): **H₃**: 7,47 (d, $^3J= 3,9$; 1H); **H₄**: 7,12 (t, 1H); **H₅**: 7,73 (d, $^3J= 3,9$ Hz; 1H); **H-C=NOH**: 7,84 (s, 1H); **OH**: 11,86 (s, 1H).

RMN ^{13}C (ppm, $\text{DMSO-}d_6$): **C-2**: 131,1; **C-3**: 131,0; **C-4**: 126,2; **C-5**: 131,0; **H-C=NOH**: 139,8.

3.1.6.2 - SÍNTESE DA 2-PIRIDINOALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,19 mL (2 mmols; $d=1,126$) de piridino-2-carboxialdeído. Foram obtidos após recristalização com metanol 0,183 g (75 %) da oxima na forma de sólidos de coloração bege.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,207 g (85 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 110-112°C (pf_{lit}: 112,5-113° C, POZIOMEK, 1958).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3285

v **C-H** (Csp²): 3187-3005

v **C=N-OH**: 1653

v **C=C**: 1593-1472

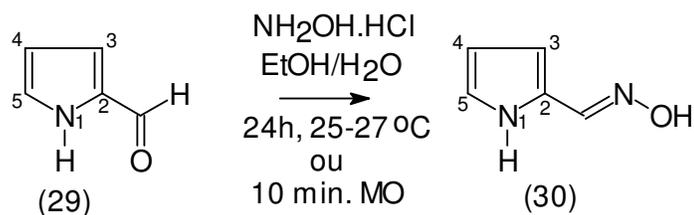
v **C-N** (conjugado): 1322

∂ **Csp²-H** (mono-substituído, fora do plano): 737

RMN ¹H (ppm, CDCl₃): **H₃**: 7,80 (m, 1H); **H₄**: 7,73 (m, 1H); **H₅**: 7,30 (m, 1H); **H₆**: 8,64 (m, 1H); **H-C=NOH**: 8,34 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, CDCl₃): **C-2**: 151,8; **C-3**: 121,0; **C-4**: 136,8; **C-5**: 124,0; **C-6**: 150,2; **H-C=NOH**: 149,3.

3.1.6.3 - SÍNTESE DA 2-PIRROILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,19 g (2 mmols) de pirroil-2-carboxialdeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,176 g (80 %) da oxima na forma de sólidos de coloração bege.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,198 g (90 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 183-185°C (pf_{lit.}: 182-184°C, FOURNARI, 1963).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3426

v **N-H**: 3419

v **C-H** (Csp²): 3033

v **C=N-OH**: 1646

v **C=C**: 1586-1461-1429

v **C-N** (conjugado): 1304

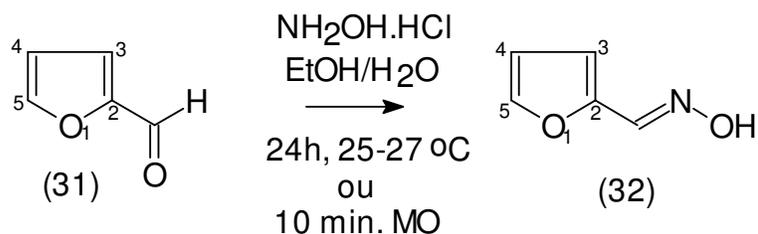
∂ **N-H** (fora do plano): 834

∂ **Csp²-H** (mono-substituído, fora do plano): 745

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₃**: 6,88 (d, ³J= 3,2; 1H); **H₄**: 6,10 (t, 1H); **H₅**: 6,55 (d, ³J= 3,2; 1H); **H-C=NOH**: 7,26 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-2**: 129,4; **C-3**: 113,8; **C-4**: 108,3; **C-5**: 120,8; **H-C=N-OH**: 137,1.

3.1.6.4 - SÍNTESE DA 2-FURFURILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,16 mL (2 mmols; $d = 1,159$) de furfural-2-carboxialdeído (recentemente destilado à vácuo, 15 mm Hg, com Na₂CO₃). Foram obtidos após recristalização com metanol 0,173 g (78 %) da oxima na forma de cristais de coloração âmbar.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,197 g (89 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 71-73°C (pf_{lit}: 70-72° C, MURATA, 1946)

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3165

v **C-H** (Csp²): 3080-3042

v **C=N-OH**: 1645

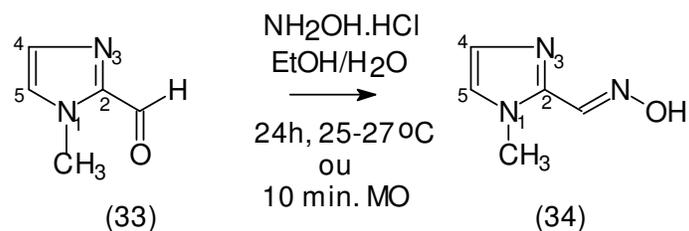
v **C=C**: 1567-1477-1449

∂ **Csp²-H** (mono-substituído fora do plano): 750

RMN ¹H (ppm, CDCl₃): **H₃**: 7,35 (dd, ³J= 3,5 Hz; ⁴J=0,6 Hz; 1H); **H₄**: 6,53 (dd, ³J= 3,5 Hz; ³J= 1,7 Hz; 1H); **H₅**: 7,47 (dd, ³J= 1,7 Hz; ⁴J= 0,6 Hz; 1H); **H-C=NOH**: 7,54 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, CDCl₃): **C-2**: 145,1; **C-3**: 118,2; **C-4**: 112,3; **C-5**: 143,4; **H-C=N-OH**: 137,0.

3.1.6.5 - SÍNTESE DA 1-METIL-2-IMIDAZOILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,220 g (2 mmols) de 1-metil-2-imidazoilcarboxialdeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,212 g (85 %) da oxima na forma de sólidos de coloração bege.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,225 g (90 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 169-171°C (pf_{lit}: 168-169°C, PHALGUNI, 2007).

IV (cm^{-3} , KBr):

v **O-H**: 3413

v **C-H** (Csp^2): 3118-3078

v_{ass} **C-H** (Csp^3): 2994-2917

v **C=N-OH**: 1628

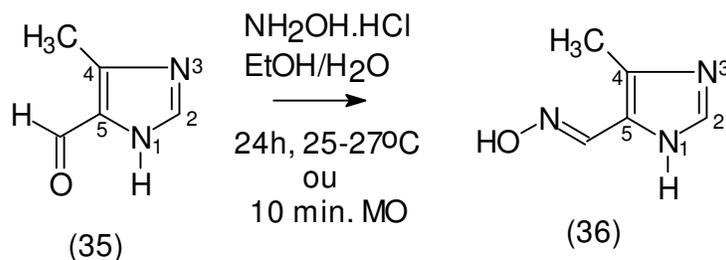
v **C=C**: 1556-1523-1477

v **C-N** (conjugado): 1357

RMN ^1H (ppm, $\text{DMSO}-d_6$): **CH₃**: 3,80 (s, 3H); **H₄**: 7,24 (d, $^3J= 3,0$; 1H); **H₅**: 6,98 (d, $^3J= 3,0$; 1H); **H-C=NOH**: 8,06 (s, 1H); **OH**: 11,59 (s, 1H).

RMN ^{13}C (ppm, $\text{DMSO}-d_6$): **CH₃**: 34,8; **C-2**: 140,2; **C-4**: 128,5; **C-5**: 124,6; **H-C=NOH**: 141,4.

3.1.6.6 - SÍNTESE DA 4-METIL-5-IMIDAZOILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,220 g (2 mmols) de 4-metil-5-imidazoilcarboxialdeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,212 g (85 %) da oxima na forma de sólidos de coloração bege.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,225 g (90 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 170-172°C.

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3407

v **N-H**: 3131

v **C-H** (Csp²): 3044

v_{ass} **C-H** (Csp³): 2926

v_s **C-H** (Csp³): 2872

v **C=N-OH**: 1655

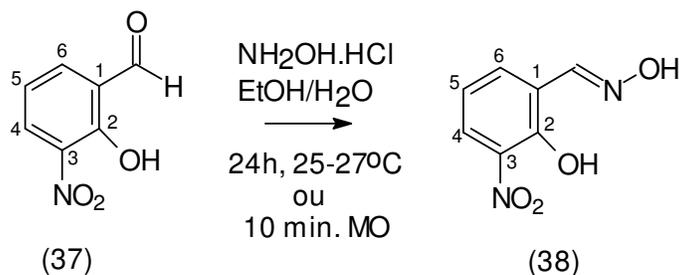
v **C=C**: 1609-1490-1434

v **C-N** (conjugado): 1327

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₂**: 8,18 (s, 1H); **CH₃**: 2,55 (s, 3H); **H-C=NOH**: 8,38 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-2**: 135,8; **C-4**: 139,4; **C-5**: 127,3; **CH₃**: 11,7; **H-C=NOH**: 146,8.

3.1.6.7 - SÍNTESE DA 3-NITRO-SALICILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,334 g (2 mmols) de 3-nitro-salicilaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,234 g (70 %) da oxima na forma de sólidos de coloração amarela.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,267 g (80 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 207-209°C.

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3409

v **C-H** (Csp²): 3087-3004

v **C=N-OH**: 1631

v **C=C**: 1584-1531-1434

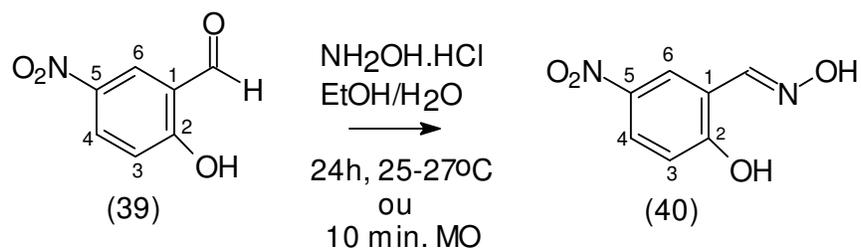
v **NO₂** (conjugado): 1343

v **C-NO₂**: 863

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₄**: 7,94 (dd, ³J= 8,2 Hz; ⁴J= 1,5 Hz; 1H); **H₅**: 7,07 (t, 1H); **H₆**: 7,84 (dd, ³J= 7,8 Hz; ⁴J= 1,5 Hz; 1H); **H-C=NOH**: 8,44 (s, 1H); **OH**: 11,84 (s, 2H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 119,5; **C-2**: 150,3; **C-3**: 137,2; **C-4**: 125,8; **C-5**: 122,0; **C-6**: 133,6; **H-C=NOH**: 146,7.

3.1.6.8 - SÍNTESE DA 5-NITRO-SALICILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,334 g (2 mmols) de 5-nitro-salicilaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,240 g (72 %) da oxima na forma de sólidos de coloração amarela.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,267 g (80 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 230-232°C.

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3308

v **C-H** (Csp²): 3099-3068

v **C=N-OH**: 1621

v **C=C**: 1576-1519-1483

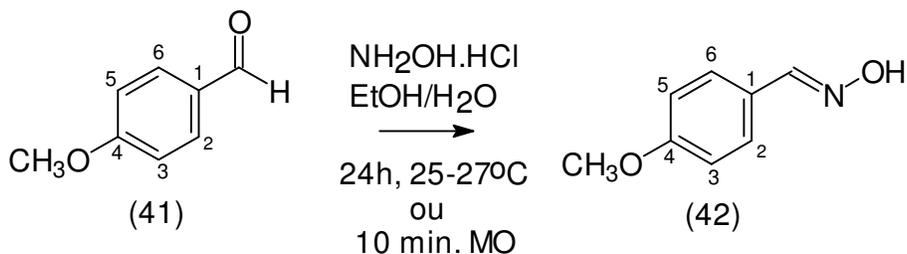
v **NO₂** (conjugado): 1339

v **NO₂**: 839

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₃**: 7,05 (d, ³J= 9,1 Hz; 1H); **H₄**: 8,10 (dd, ³J= 9,1 Hz; ⁴J= 3,0 Hz; 1H); **H₆**: 8,40 (d, ⁴J= 3,0 Hz; 1H); **H-C=NOH**: 8,34 (s, 1H); **OH**: 11,66 (s, 2H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 119,4; **C-2**: 161,3; **C-3**: 116,6; **C-4**: 126,0; **C-5**: 139,9; **C-6**: 122,5; **H-C=NOH**: 144,3.

3.1.6.9 - SÍNTESE DA 4-METOXI-BENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,24 mL (2 mmols; $d = 1,12$) de 4-metoxi-benzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,211 g (70 %) da oxima na forma de sólidos de coloração amarela.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,242 g (80 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 131-133°C (pf_{lit}: 131-133° C, BADRI, 2007).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3307

v **C-H** (Csp²): 3006

v_{ass} **C-H** (Csp³): 2966

v_s **C-H** (Csp³): 2838

v **C=N-OH**: 1608

v **C=C**: 1574-1466

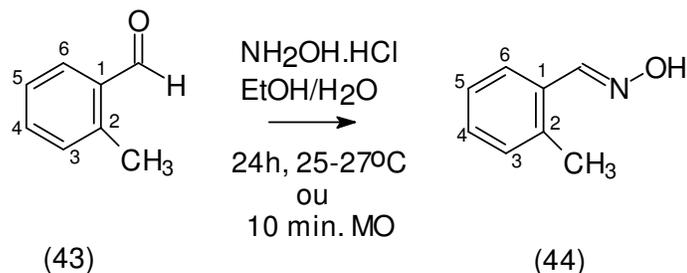
v **C-O**: 1252

∂ **Csp²-H** (2 hidrogênios adjacentes do anel *p*-substituído): 824

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₂** e **H₆**: 7,75 (d, ³*J*= 8,6 Hz; 2H); **H₃** e **H₅**: 6,91 (d, ³*J*= 8,6 Hz; 2H); **OCH₃**: 3,85 (s, 3H); **H-C=NOH**: 8,13 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 125,6; **C-2** e **C-6**: 127,8; **C-3** e **C-5**: 114,2; **C-4**: 160,1; **OCH₃**: 55,2; **H-C=NOH**: 147,6.

3.1.6.10 - SÍNTESE DA *o*-TOLUILALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,23 mL (2 mmols; $d = 1,039$) de *o*-toluilbenzaldeído. Foram obtidos após recristalização com metanol 0,202 g (75 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, obteve-se 0,243 g (90 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 51-53° C (pf_{lit}: 52-54° C, KAPURIYA, 2008).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3189

v **C-H** (Csp²): 3069

v_{ass} C-H (Csp³): 2991

v_s C-H (Csp³): 2870

v **C=N-OH**: 1624

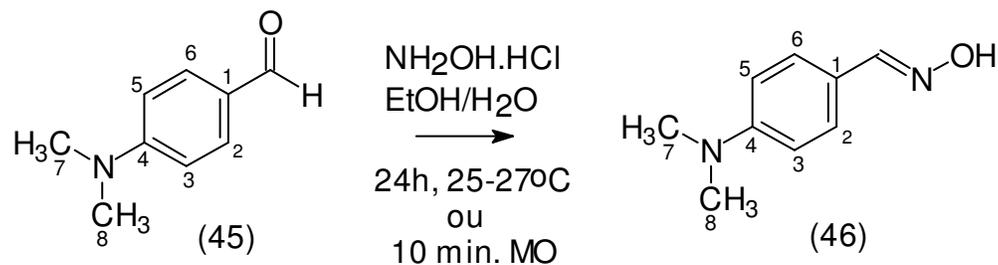
v **C=C**: 1599-1453

∂ **Csp²-H** (*orto*-substituído, fora do plano): 750

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₃**, **H₄** e **H₅**: 7,22 (m, 3H); **H₆**: 7,62 (m, 1H); **CH₃**: 2,36 (s, 3H); **H-C=NOH**: 8,32 (s, 1H); **OH**: 11,26 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 126,1 ; **C-2**: 135,9 ; **C-3**: 128,9 ; **C-4**: 131,1 ; **C-5**: 126,0 ; **C-6**: 130,7 ; **H-C=NOH**: 147,0; **CH₃**: 19,5.

3.1.6.11 - SÍNTESE DA *N,N*-DIMETIL-*p*-AMINO BENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,298 g (2 mmols) de *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,229 g (70 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,262 g (80 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 151-153^o C (pf_{lit}: 152-154^o C, LI, 2007).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3243

v **C-H** (Csp²): 3138

v_{ass} **C-H** (Csp³): 2985

v_s **C-H** (Csp³): 2913

v **C=N-OH**: 1609

v **C=C**: 1556-1445

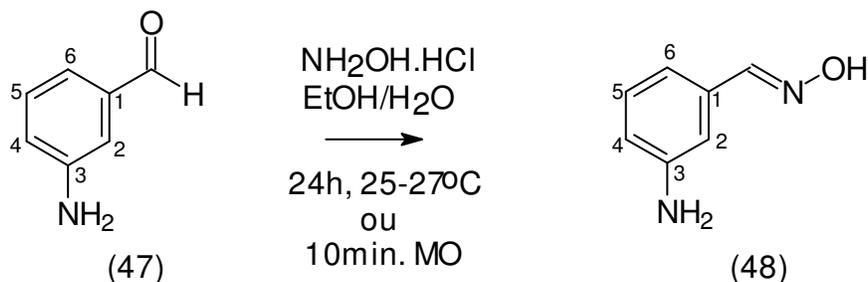
v **C-N**: 1361

∂ **Csp²-H** (2 hidrogênios adjacentes do anel *p*-substituído): 813

RMN ¹H (ppm, CDCl₃): **H₂** e **H₆**: 6,70 (d, ³J= 8,8 Hz; 2H); **H₃** e **H₅**: 7,42 (d, ³J= 8,8 Hz; 2H); **CH₃**: 2,94 (s, 6H); **H-C=NOH**: 7,98 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, CDCl₃): **C-1**: 121,5; **C-2** e **C-6**: 128,2; **C-3** e **C-5**: 112,4; **C-4**: 151,7; **C-7** e **C-8**: 40,0; **H-C=NOH**: 149,0.

3.1.6.12 - SÍNTESE DA *m*-AMINOBENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,298 g (2 mmols) de *m*-aminobenzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,190 g (70 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca.

Pelo método de micro-ondas, nas mesmas estequiometrias, foram obtidos 0,217 g (80 %) da oxima após sua recristalização.

pf: 142-145°C.

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3307

v **C-H** (Csp²): 3006

v_{ass} **C-H** (Csp³): 2966-2937

v_s **C-H** (Csp³): 2838

v **C=N-OH**: 1608

v **C=C**: 1574-1458

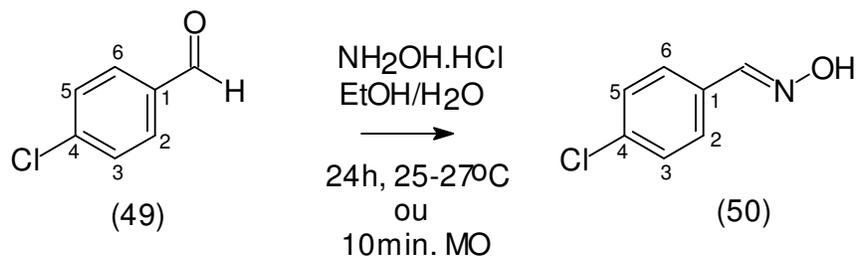
v **C-N** (aromático): 1252

∂ **Csp²-H** (m-substituído, fora do plano): 963

RMN ¹H (ppm, CDCl₃): **H₂**: 6,32 (s, 1H); **H₄**: 6,81 (d, ³J= 7,7 Hz; 1H); **H₅**: 7,18 (t, 1H); **H₆**: 7,41 (d, ³J= 8,1 Hz; 1H); **H-C=NOH**: 8,09 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, CDCl₃): **C-1**: 133,4; **C-2**: 111,9; **C-3**: 151,5; **C-4**: 119,7; **C-5**: 128,2; **C-6**: 132,8; **H-C=NOH**: 150,5.

3.1.6.13 - SÍNTESE DA 4-CLORO-BENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,281 g (2 mmols) de 4-cloro-benzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,248 g (80 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca (não foi realizada a reação com o micro-ondas).

pf: 111-114°C (pf_{lit}: 112-114°C, PICHA, 2004)

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3296

v **C-H** (Csp²): 2997

v **C=N-OH**: 1684

v **C=C**: 1595-1454

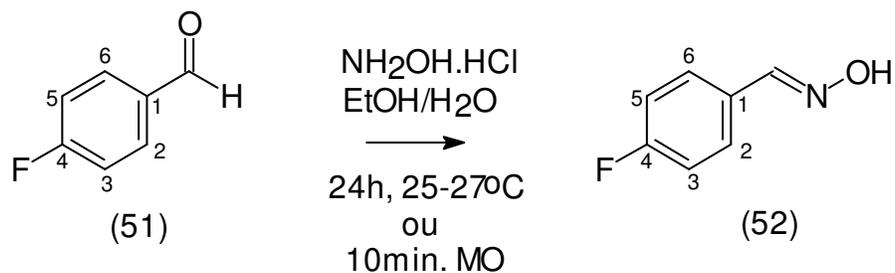
v **C-Cl**: 691

∂ **Csp²-H** (hidrogênios adjacentes do anel *p*-substituído): 822

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₂** e **H₆**: 7,60 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H); **H₃** e **H₅**: 7,44 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H); **H-C=NOH**: 8,15 (s, 1H); **OH**: 11,37 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 132,0; **C-2** e **C-6**: 128,0; **C-3** e **C-5**: 128,7; **C-4**: 133,7; **H-C=NOH**: 147,1.

3.1.6.14 - SÍNTESE DA 4-FLÚOR-BENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,248 g (2 mmols) de 4-flúor-benzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,231 g (83 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca (não foi realizada a reação com o micro-ondas).

pf: 115-117°C (p_{lit}: 116-117° C, JAIN, 2005).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3261

v **C-H** (Csp²): 3016

v **C=N-OH**: 1685

v **C=C**: 1608-1474

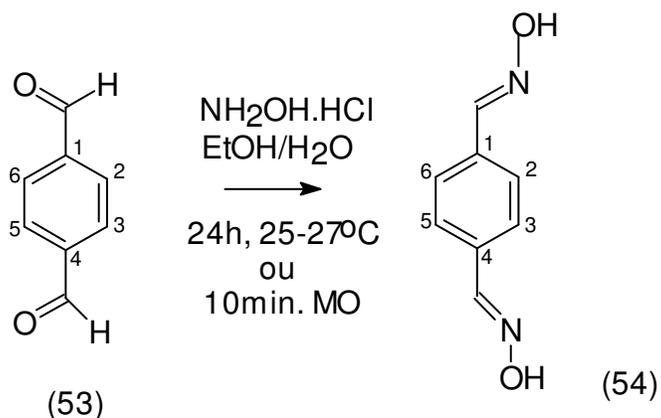
v **C-F**: 1242

∂ **Csp²-H** (*p*-substituído, fora do plano): 827

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₂** e **H₆**: 7,63 (dd, ³*J*_{HH}= 9,4 Hz e ⁴*J*_{HF}= 0,6 Hz, 1H); **H₃** e **H₅**: 7,22 (t, ³*J*_{HH}= 9,4 Hz e ³*J*_{HF}= 9,0 Hz, 1H); **H-C=NOH**: 8,14 (s, 1H); **OH**: 11,26 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 129,7 (⁴*J*_{FC}= 2,7 Hz); **C-2** e **C-6**: 128,4 (³*J*_{FC}= 8,5 Hz); **C-3** e **C-5**: 115,7 (²*J*_{FC}= 22,2 Hz); **C-4**: 162,5 (¹*J*_{FC}= 245,9 Hz); **H-C=NOH**: 147,1.

3.1.6.15 - SÍNTESE DA TEREFTALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,248 g (2 mmols) de tereftaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,193 g (72 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca (não foi realizada a reação com o micro-ondas).

pf: decompõe após 250°C .

IV (cm^{-3} , KBr):

v **O-H**: 3248

v **C-H** (Csp^2): 2989

v **C=N-OH**: 1624

v **C=C**: 1518-1477-1456

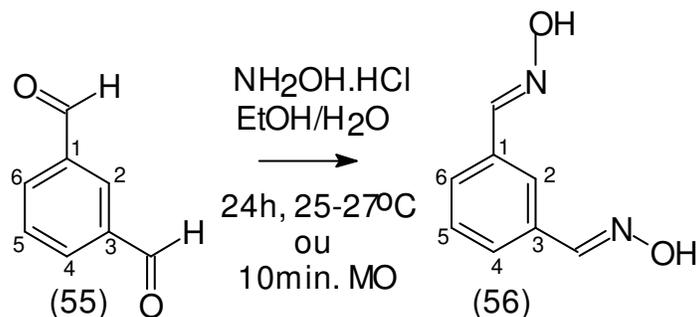
v **C-N** (conjugado): 1323

∂ **Csp²-H** (*p*-substituído, fora do plano): 821

RMN ^1H (ppm, $\text{DMSO-}d_6$): **H₂, H₃, H₅ e H₆**: 7,77 (s, 4H); **H-C=NOH**: 8,15 (s, 2H).

RMN ^{13}C (ppm, $\text{DMSO-}d_6$): **C-1 e C-4**: 134,2; **C-2, C-3, C-5 e C-6**: 130,2; **C-N=OH**: 149,5.

3.1.6.16 - SÍNTESE DA ISOFTALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 54, foram utilizados 0,248 g (2 mmols) de isoftaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,203 g (76 %) da oxima na forma de sólidos de coloração branca (não foi realizada a reação com o micro-ondas).

pf: decompõe após 250°C.

IV (cm^{-3} , KBr):

v **O-H**: 3247

v **C-H** (Csp^2): 3000

v **C=N-OH**: 1643

v **C=C**: 1490

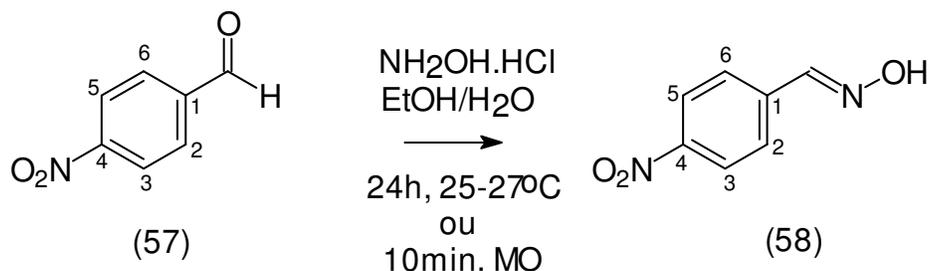
v **C-N** (conjugado): 1320

δ **Csp²-H** (m-substituído, fora do plano): 792

RMN ^1H (ppm, $\text{DMSO}-d_6$): **H₂**: 7,80 (s, 1H); **H₄** e **H₆**: 7,58 (dd, $J^3 = 7,6$ Hz e $J^4 = 1,7$ Hz, 2H); **H₅**: 7,41 (t, 1H); **H-C=NOH**: 8,17 e 8,16 (2s, 2H); **OH**: 11,32 (s, 2H).

RMN ^{13}C (ppm, $\text{DMSO}-d_6$): **C-1** e **C-3**: 133,5; **C-4** e **C-6**: 127,1; **C-5**: 124,2; **C-2**: 129,1; **C-N=OH**: 147,7.

3.1.6.17 - SÍNTESE DA 4-NITRO-BENZALDOXIMA



Seguindo o experimental descrito na página 52, foram utilizados 0,302 g (2 mmols) de 4-nitro-benzaldeído. Foram obtidos após recristalização com etanol 0,211 g (70 %) da oxima na forma de sólidos de coloração parda (não foi realizada a reação com o micro-ondas).

pf: 213-215°C (p_{lit.}: 215-216° C, PALM, 1954).

IV (cm⁻³, KBr):

v **O-H**: 3306

v **C-H** (Csp²): 3105-3012

v **C=N-OH**: 1606

v **C=C**: 1537-1496

v **NO₂** (conjugado): 1350

∂ **Csp²-H** (*p*-substituído, fora do plano): 749

RMN ¹H (ppm, DMSO-*d*₆): **H₂** e **H₆**: 7,83 (d, ³*J* = 8,7 Hz; 2H); **H₃** e **H₅**: 8,22 (d, ³*J* = 8,7 Hz; 2H); **H-C=NOH**: 8,29 (s, 1H); **OH**: 11,87 (s, 1H).

RMN ¹³C (ppm, DMSO-*d*₆): **C-1**: 139,5; **C-2** e **C-6**: 127,4; **C-3** e **C-5**: 124,0; **C-4**: 147,5; H-**C=NOH**: 146,9.

3.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.2.1 - REAGENTES

- Solução tampão de fosfato monobásico ou dibásico de sódio (0,02 M) em pH 7,6 para lise das hemácias (o pH foi ajustado em medidor de pH com NaOH ou HCl);

- Solução tampão de fosfato monobásico ou dibásico de sódio (0,12 M) em pH 7,6 para análise (o pH foi ajustado em medidor de pH com NaOH ou HCl);

- Solução de DTNB (ácido ditionitrobenzóico, P.M. = 396,3) a 2 mM. Esta solução foi preparada no tampão de análise (0,12M) em pH 7,6. Este reativo possui estabilidade de aproximadamente 2 meses (Sigma-Aldrich Co);

- Solução de iodeto de acetilcolina (P.M.=289,2) a 6,6 mM preparada em água destilada. Este reativo possui estabilidade de aproximadamente 1 mês. Conservado em congelador a $-10^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, em frascos âmbar (Sigma-Aldrich Co);

- Solução de hidróxido de sódio a 25 % p/v. Utilizada somente na dosagem de proteína da amostra de "ghost" que constitui um parâmetro utilizado no cálculo da atividade específica da AChE;

- Reagente de Folin: Foi utilizado puro (Sigma-Aldrich Co);

- Solução de albumina bovina a 1mg/mL. Estável por 2 meses. Conservado em congelador a $-10^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich Co);

- Solução-mãe de etil-paraoxon, preparado a 100 µg/mL em 10 % de Metanol (Chem. Serv. Co);

- Pralidoxima (Sigma-Aldrich Co);

- Oximas sintetizadas em laboratório.

3.2.2 - EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 160 A;

- Centrífuga Refrigerada HITACHI – CR₂₁E;

- Tubos de Ensaios;

- Tubos falcon;

- Pipeta Automática Ajustável de 200µL (Finnpipette);

- Pipeta Automática Ajustável de 1000µL (Finnpipette);

- Pipeta Automática Ajustável de 5000µL (Finnpipette);

- Ponteiras para pipetas automáticas;
- Béquer;
- Ependorfs.

3.2.3 - GRUPOS DE DOADORES DE AMOSTRAS DE SANGUE

O grupo de doadores foi composto de voluntários do CESTH – FIOCRUZ, supostamente não expostos a agentes anticolinesterásicos. Este grupo de voluntários foi submetido a um questionário cujo objetivo foi avaliar os possíveis fatores que pudessem interferir na atividade enzimática das colinesterases sangüíneas, como determinadas patologias e práticas domésticas e profissionais.

3.2.4 - COLETA, PROCESSAMENTO E CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com seringa ou vacuntainer em tubos heparinizados e posteriormente aliquotadas em tubos de ensaio em volumes de 1,8 mL. O sangue total foi incubado com três concentrações de etil-paraoxon (0,125 µg/mL, 1,0 µg/mL, 6,25 µg/mL) à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, 180 µL de tampão fosfato de análise (120 mM – pH 7.6) foram adicionados para completar o volume final de 2 mL.

Foram separadas as hemácias do plasma pela centrífuga clínica a 4000 RPM, por aproximadamente 10 minutos. Foram aliquotados 500 µL de papa de hemácias em tubos plásticos, adicionando-se 4,5 mL de tampão de lise (tampão fosfato de sódio 20 mM - pH 7.6) e congelando-se a -10°C +/- 3°C. O plasma obtido na centrifugação foi desprezado em água sanitária comercial.

Após esta etapa de congelamento, as hemácias foram submetidas a três centrifugações a 4000 G durante 15 min a 8 °C em centrífuga refrigerada para retirada da hemoglobina. Ao final de cada processo foi desprezado o sobrenadante em água sanitária comercial e as membranas das hemácias sedimentadas foram novamente ressuspensas em tampão de lise. Após a terceira centrifugação, foi retirado o sobrenadante acrescentando-se 500 µL de tampão fosfato de sódio de análise, obtendo-se uma suspensão da proteína AChE ou AChE inibida com etil-paraoxon que foi chamada de “ghost”.

3.2.5 - ANÁLISE COLINESTERÁSICA PELO MÉTODO DE ELLMAN MODIFICADO POR OLIVEIRA-SILVA (2000)

Para determinação da atividade da AChE, foram adicionados em tubos de análise 4,0 mL de tampão de análise (120 mM – pH 7.6), 1,0 mL de solução de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 2 mM, 50 µL de “ghost” e 1,0 mL de solução de acetilticolina 6,6 mM. As amostras de “ghost” e a solução de substrato (acetilticolina) foram adicionadas somente no momento da leitura no espectrofotômetro quando então é disparada a reação enzimática.

As alíquotas foram analisadas cineticamente em espectrofotômetro a 412 nm. As análises foram realizadas com os reagentes à temperatura ambiente. As atividades ópticas foram convertidas em µmols de substrato hidrolizado.min⁻¹.mL⁻¹ de amostra com o auxílio de uma curva-padrão de L-cisteína, a qual foi confeccionada utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,12 M, solução de DTNB 2 mM, H₂O destilada e solução de L-cisteína conforme é demonstrado na Tabela 3.1.

TAB. 3.1- Construção da curva padrão de L-cisteína para o método de Ellman modificado por Oliveira-Silva *et al.* (2000).

Conc. em nmols	Branco	10	25	50	100	150	250	500
T. análise (mL)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
DTNB (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
H ₂ O dest. (µL)	1000	980	950	900	800	700	500	0
L-cisteína (µL)	0	20	50	100	200	300	500	1000

Após adição dos reagentes, a absorvância correspondente a cada concentração de L-cisteína foi determinada fotometricamente em comprimento de onda de 412 nm.

Cálculo da Atividade Enzimática (A):

$$A = \left[\frac{(\text{Abs.min}^{-1} \times 10^{-3}) - 2,96}{2,11} \right] \times 20$$

Onde: **A** = atividade em nmols.min⁻¹.mL⁻¹ e E.10⁻³ = atividade em µmols.min⁻¹.mL⁻¹; Abs: absorvância

2,96: Coeficiente linear da curva de L-cisteína, obtida no experimento
 2,11: Coeficiente angular da curva de L-cisteína, obtida no experimento
 Fator de diluição: 20
 (Foi utilizado o programa SigmaPlot).

Para a determinação da concentração de proteína “ghost” foi utilizada uma curva-padrão de albumina, a qual foi confeccionada utilizando-se H₂O mili-Q, 200 µL de solução de NaOH a 25 %, 300 µL de Reagente de Folin e solução de albumina (1mg/mL) conforme descrito na Tabela 3.2.

TAB. 3.2 – Preparação dos tubos de análise para a dosagem da BSA.

	H ₂ O	Solução de albumina
Branco	4,50 mL	—
Padrão 100	4,45 mL	50 µL
Padrão 200	4,40 mL	100 µL
Padrão 300	4,20 mL	300 µL
Amostras	4,45 mL	50 µL

Nos tubos relativos às amostras para a análise foram pipetados 50 µL da suspensão de “ghost”. No primeiro tubo (branco) foram adicionados 4,45 mL de H₂O mili-Q, 200 µL de NaOH a 25 % e 300 µL de Reagente de Folin levando-se ao vórtex por 30 seg. O mesmo procedimento foi repetido para os demais tubos durante um período de 5 minutos. Transcorrido este tempo, foi iniciada a leitura no espectrofotômetro a partir do tubo branco e assim sucessivamente. Os valores de absorbância foram determinados fotometricamente em comprimento de onda a 660 nm. Os valores de absorbância obtidos foram descontados do branco.

A partir das absorbâncias dos padrões 100 e 300, construídos pela curva-padrão de albumina, foram feitos os gráficos dos valores de absorbância das amostras de “ghost”, para determinar a concentração de proteína AChE nas amostras de “ghost” em mg.mL⁻¹.

Os valores de atividade da AChE foram divididos pela concentração de proteína e a sua atividade específica foi expressa em µmoles.min.⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

Cálculo da Atividade Específica da AChE (Ae):

$$Ae = \frac{A}{P}$$

Ae, atividade específica ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$); **A**, atividade ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\text{mL}$); **P**, concentração de proteína ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

(Todos os cálculos foram obtidos com o programa SigmaPlot).

3.2.6 - TRATAMENTO DE REATIVAÇÃO DA AChE POR OXIMAS

O “ghost”, já contaminado com o etil-paraoxon, foi dividido em grupos para a realização do tratamento com oximas, onde foram adicionados 192 μL dessa solução, 16 μL de tampão de análise (120 mM – pH 7.6) e 16 μL da oxima na concentração de 25 μM diluídas neste tampão de análise. Após 30 minutos de tratamento foi feita a dosagem da atividade em espectrofotômetro UV-Visível pela metodologia descrita no item anterior. Este tratamento foi feito para cada oxima individualmente e todos os ensaios foram realizados em triplicata (todos os cálculos foram realizados com o programa SigmaPlot).

3.3 - ENSAIOS DAS INTERAÇÕES LIGANTE-BSA E LIGANTE-AChE UTILIZANDO AS TÉCNICAS T_1 , T_2 E DOSY (DIFFUSION-ORDERED SPECTROSCOPY) POR RMN.

3.3.1 - REAGENTES

• Solução tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico em D_2O na concentração de 20 mM, pH 7;

- Solvente $DMSO-d_6$;
- Solvente D_2O ;
- Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Co);
- Acetilcolinesterase humana recombinante (AChE) (Sigma-Aldrich Co);
- Pralidoxima (Sigma-Aldrich Co);
- Oximas sintetizadas em laboratório.

3.3.2 - EQUIPAMENTOS

- Espectrômetro Unity-300 (Varian), em sonda de 5 mm;
- Espectrômetro Bruker DRX 400, em sonda de 5 mm;
- Tubos de Ensaios;
- Pipeta Automática Ajustável de 200 μL (Finnpipette);
- Pipeta Automática Ajustável de 1000 μL (Finnpipette);
- Pipeta Automática Ajustável de 5000 μL (Finnpipette);
- Ponteiras para pipetas automáticas;
- Demais equipamentos de uso laboratorial comum.

3.3.3 - PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções das oximas com e sem BSA foram preparadas em tubos volumétricos de 1 mL e foi utilizado $DMSO-d_6$ (em 10 %) como solvente. Em cada solução foi adicionado tampão fosfato em D_2O , pH 7,0 (TAB. 3.3).

TAB. 3.3 – Concentrações utilizadas nas medidas de interação T_1 por RMN.

Descrição:	Concentração da oxima usada em 0,6 mL de solução:	Concentração do Tampão:	Concentração de BSA:
Sem BSA	25 mM	20 mM	sem BSA
Com BSA	25 mM	20 mM	0,2 mM

3.3.4 – METODOLOGIA DE RMN

Uma das técnicas de RMN que pode ser utilizada para estudo de interações moleculares é a relaxação de spins nucleares. Antes da aplicação do pulso de radiofrequência (rf) os spins se encontram em equilíbrio térmico, ou seja, as populações dos estados α e β correspondem à distribuição de Boltzmann. Contudo, quando um pulso de rf é aplicado ocorre uma perturbação do sistema tirando-o do equilíbrio. O processo pelo qual o sistema volta ao equilíbrio é denominado relaxação.

Uma das formas de se visualizar o fenômeno de relaxação é através da representação vetorial da magnetização macroscópica (\mathbf{M}_0) em um eixo de coordenadas xyz . Como pode se observar na Figura. 3.1 o vetor de magnetização possui duas componentes: M_z (ao longo do eixo z , que é paralelo ao campo principal \mathbf{B}_0) e \mathbf{M}_{xy} (perpendicular ao campo principal \mathbf{B}_0).

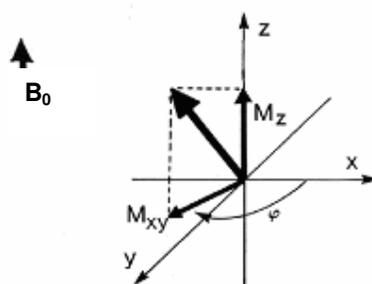


FIG. 3.1 - Sistema de coordenadas utilizado para descrever as componentes da magnetização (WINK, 1989).

No equilíbrio a magnetização \mathbf{M}_0 , é estacionária e alinhada com \mathbf{B}_0 assim $\mathbf{M}_z = \mathbf{M}_0$ e $\mathbf{M}_{xy} = 0$ (FIG. 3.2). A aplicação de um pulso causa a inclinação da magnetização de um ângulo θ a partir do equilíbrio (FIG. 3.3). O retorno da magnetização ao equilíbrio pode ser representado como o retorno independente de \mathbf{M}_z para \mathbf{M}_0 e de \mathbf{M}_{xy} para zero (FIG. 3.4).

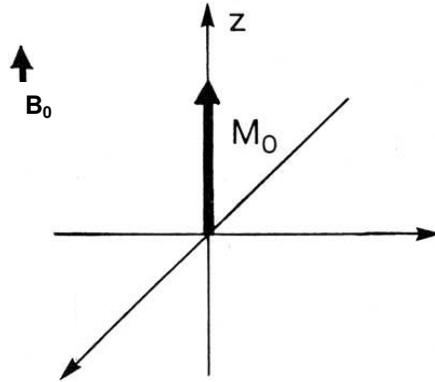


FIG. 3.2 - Magnetização em repouso antes da aplicação do pulso (WINK, 1989).

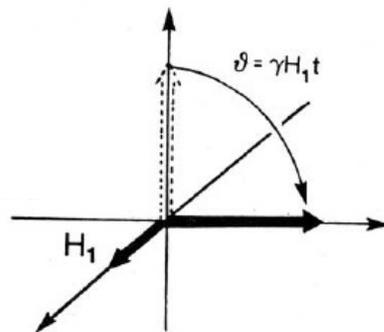


FIG. 3.3 - Inclinação da magnetização devida à aplicação de um pulso de $\theta = 90^\circ$ (WINK, 1989).

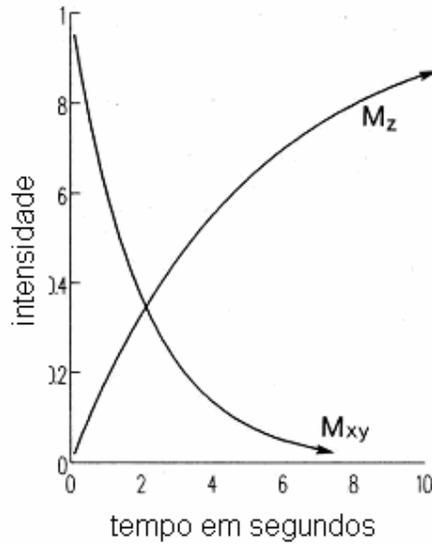


FIG. 3.4 - Retorno exponencial da magnetização M_z e M_{xy} após um pulso de $\theta = 90^\circ$. (WINK, 1989).

Ambos os processos de relaxação obedecem à cinética de 1ª ordem, que descreve convenientemente as velocidades e as leis de velocidade (EQ. 1 e 2) apresentadas para um tempo arbitrário t após um pulso de θ graus (EQ. 3 e 4) (WINK, 1989).

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{(M_0 - M_z)}{T_1} \quad (\text{EQ. 1})$$

$$-\frac{dM_{xy}}{dt} = \frac{(M_{xy})}{T_2} \quad (\text{EQ. 2})$$

$$M_z = M_0 [1 + (\cos \theta - 1) e^{-t/T_1}] \quad (\text{EQ. 3})$$

$$M_{xy} = - M_0 \sin \theta e^{-t/T_2} \quad (\text{EQ. 4})$$

As constantes de tempo T_1 e T_2 são denominadas tempo de relaxação longitudinal (ou spin-rede) e tempo de relaxação transversal (ou spin-spin), respectivamente. O tempo de relaxação spin-rede descreve a recuperação de M_z e o tempo de relaxação spin-spin descreve o decaimento de M_{xy} (WINK, 1989).

O processo de relaxação não é um fenômeno espontâneo, mas o resultado de campos magnéticos flutuantes (ou elétricos para núcleos quadrupolares, que são núcleos com spin $> 1/2$), com uma dependência aleatória do tempo que oscila a frequência de Larmor. Para um núcleo numa molécula presente num líquido, esses campos locais dependentes do tempo são devidos aos movimentos brownianos das moléculas vizinhas (GIL, 1987).

Existem vários meios pelos quais campos magnéticos flutuantes podem ser gerados, o que ocasiona o surgimento de uma série de mecanismos de relaxação. Estes mecanismos são regulados principalmente pela intensidade de interação dos spins entre si (T_2) e com a rede (T_1) (GIL, 1987).

A interação dipolo-dipolo (DD) é a principal forma de relaxação para núcleos com spin $1/2$. De maneira simplificada, pode-se relacionar esse mecanismo de relaxação com três principais variáveis: a distância r_{AB} entre os núcleos A e B e o valor de suas constantes magnetogíricas γ_A e γ_B (EQ. 5). O momento magnético relativamente grande do hidrogênio, junto com sua abundância na maioria das moléculas orgânicas faz com que esse mecanismo seja o principal responsável pela relaxação de hidrogênios (GIL, 1987).

$$(\overline{b_{loc}})^2 = \frac{(\gamma_A \gamma_B h)^2 [I(I + 1)]}{r_{AB}^6} \quad (\text{EQ. 5})$$

A velocidade de relaxação, devida às interações magnéticas dipolo-dipolo, aumentará rapidamente com o decréscimo da distância, ou seja, núcleos que estejam perto um do outro relaxam mais rapidamente. Assim, a velocidade de relaxação está relacionada com a estrutura molecular e com a dinâmica interna e global da molécula, isto é, com sua flexibilidade e mobilidade (GIL, 1987).

A partir destes conceitos foram realizados os estudos de interação entre as oximas (ligante) e a BSA com a utilização do espectrômetro Unity-300 (Varian), em sonda de 5 mm.

As medidas de T_1 não seletivo (todos os hidrogênios da molécula foram irradiados com o pulso de radiofrequência) foram feitas à temperatura ambiente

(25°C). O pulso de 90° para ^1H foi calibrado para cada amostra. A calibração foi feita através do macro findpw.

Foi utilizada a sequência inversão-recuperação, com as concentrações das oximas a 25 mM e de BSA a 0,2 mM. A variação de T_1 foi determinada por diferença entre os valores de T_1 para ligante-BSA e ligante ($\Delta T_1 = T_{1\text{ligante+BSA}} - T_{\text{ligante}}$).

O procedimento para a aquisição dos dados de tempos de relaxação T_1 está descrito no APÊNDICE C.

Paralelamente foram realizados os experimentos de DOSY para indicar as interações ligante-AChE e verificar como a pralidoxima e a 2-tiofenoaloxima interagem com a AChE.

O experimento de DOSY por RMN mede o coeficiente de difusão de uma molécula, ou seja, o movimento translacional da molécula.

Uma molécula tem um movimento cujo eixo e direção é continuamente alterado por colisões, onde o tempo médio entre colisões moleculares para uma molécula em um dado estado de movimento é dado pelo tempo de correlação (\mathcal{S}_c). Tempo de correlação é $6 D^{-1}$ ($\mathcal{S}_c = 6 D^{-1}$).

O controle de temperatura e de viscosidade do solvente é essencial para verificar o aumento ou a diminuição do coeficiente de difusão.

Outro fator relevante é o campo magnético que há em função do eixo z, logo, no decorrer deste experimento aplica-se um gradiente que faz o campo magnético mudar ao longo de z.

Se a molécula difunde muito, isto é, troca muito de lugar ao longo da aplicação do campo magnético (FIG. 3.5, página 84), a tendência é que seu sinal vá perdendo a intensidade, podendo até sumir.

Pela equação fundamental da RMN, a frequência e o campo magnético são diretamente proporcionais.

$$\nu = \frac{\gamma \cdot B_0}{2 \pi} \quad (\text{EQ. 6})$$

(onde: ν = frequência; B_0 = campo magnético; γ = constante magnetogírica)

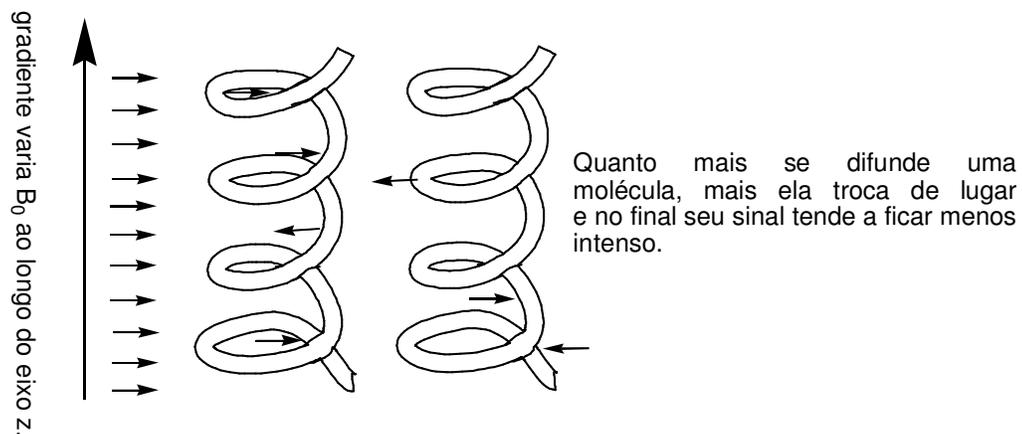


FIG. 3.5 – Esquema de aplicação de um gradiente em um campo magnético.

Os coeficientes de difusão foram determinados com concentrações 35 mmols.mL⁻¹ das oximas e 18 mg.mL⁻¹ da AChE usando a sequência spin-eco (FIG. 3.6) estimulado com pulsos bipolares, com o tempo de difusão de 20 ms e de duração do pulso de gradiente de 10 ms e variando a intensidade do pulso de gradiente de 0,68 a 13,62 G/cm em 8 etapas.

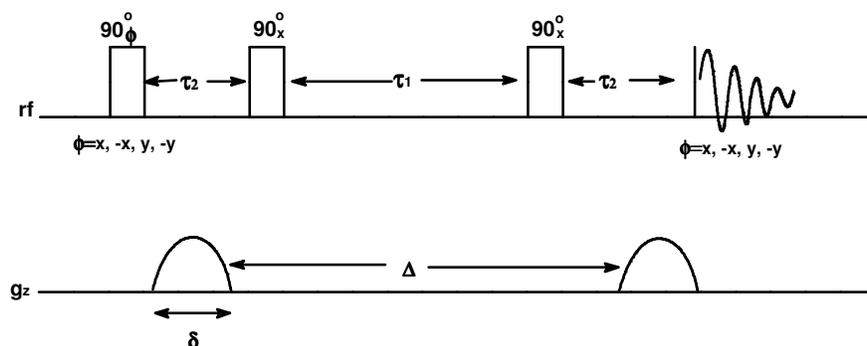


FIG. 3.6 – Sequência de pulso PGSE- *Pulsed Gradient Spin Echo* (ANTALEK, 2002).

4- RESULTADOS EXPERIMENTAIS

4.1 - SÍNTESE DAS OXIMAS

Existem reações clássicas na literatura que reportam a formação de oximas (DAMLJANOVIC, 2005; KIM, 2005; VOGEL, 1989; KNAPP, 1979). As oximas de interesse neste trabalho são aquelas derivadas de aldeídos aromáticos simples e com natureza neutra, para avaliar o potencial de oximas neutras como reativadores da AChE. A Figura 4.1 mostra o esquema e o mecanismo da síntese de oximas.

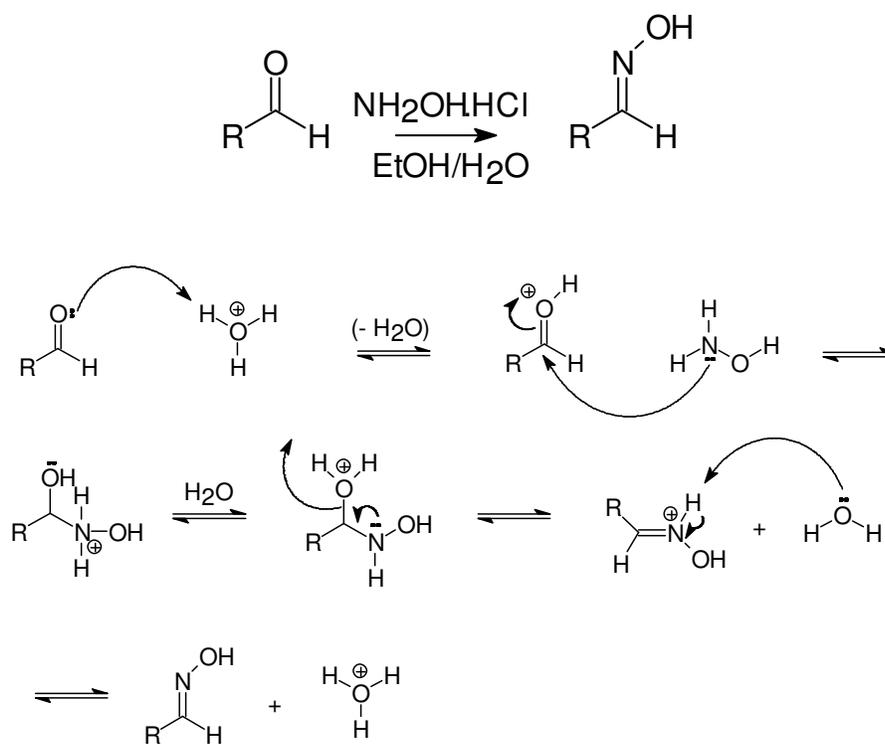
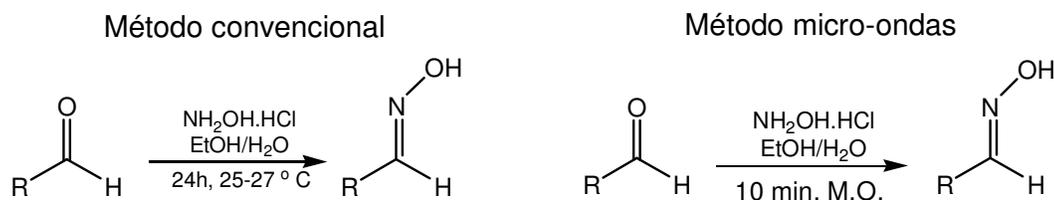


FIG. 4.1 – Esquema e mecanismo de síntese de oximas.

Neste trabalho as sínteses das oximas foram realizadas inicialmente pelo método convencional, usando um tempo de reação de 24 horas entre 25 a 27 °C. O método foi depois otimizado usando micro-ondas e um tempo de reação de 10 minutos. Estas reações também foram realizadas com a utilização de refluxo, de ultra-som e com Dean-Stark, porém, nenhum destes métodos forneceu bons

resultados, havendo formação de vários produtos e consumo incompleto dos reagentes. A Equação 1 mostra a otimização da metodologia de síntese das oximas.



EQ. 1: Otimização da reação de síntese de oximas.

4.1.1 - AS VANTAGENS DAS REAÇÕES DE SÍNTESE DE OXIMAS POR MICRO-ONDAS

O estudo de síntese orgânica via micro-ondas cresceu muito nos últimos anos e sendo alvo de um grande número de publicações. As reações podem ser realizadas em um forno de micro-ondas doméstico ou em reatores de micro-ondas desenhados especificamente para reações orgânicas em escala de laboratório (SANSEVERINO, A. M., 2000).

As principais vantagens da utilização de energia de micro-ondas sobre o aquecimento convencional (manta, bico de Bunsen, placa de aquecimento etc) para uma reação química são:

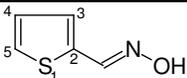
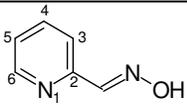
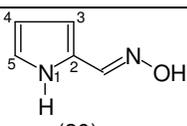
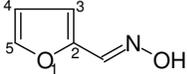
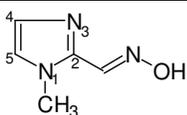
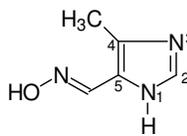
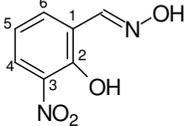
- a) as taxas de aquecimento em uma reação onde alguma substância (solvente ou um reagente) presente absorva bem micro-ondas são muito maiores que no aquecimento convencional;
- b) o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às micro-ondas (como teflon, por exemplo), a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solvente;
- c) a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento;
- d) a possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica.

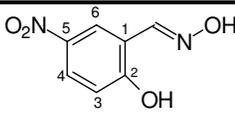
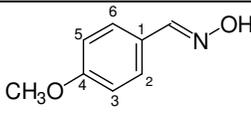
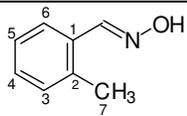
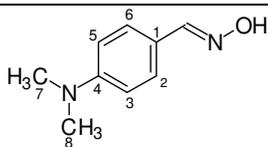
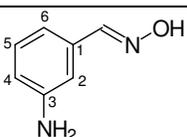
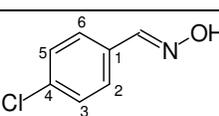
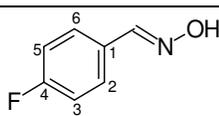
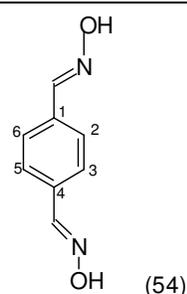
Estas vantagens são bem documentadas na literatura para várias reações orgânicas em sistemas homogêneos e heterogêneos (SANSEVERINO, A. M., 2002).

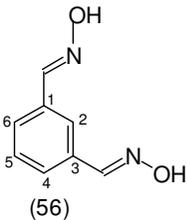
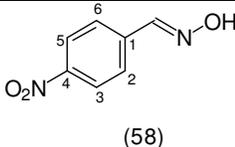
Nas tentativas de otimizar as reações de síntese das oximas, as reações via micro-ondas apresentaram os maiores rendimentos e em menores tempos

reacionais. Pelo método convencional a reação ocorreu em 24 horas, pelo método de micro-ondas a reação ocorreu em 10 minutos. Além do tempo de reação, a reação via micro-ondas forneceu maiores rendimentos comparados ao método convencional segundo demonstra a Tabela 4.1.

TAB. 4.1 – % de rendimentos de formação das oximas sintetizadas pelo método convencional (24 h) e por micro-ondas (10 min.).

OXIMAS	% de rendimento (método convencional)	% de rendimento (método micro-ondas)
 <p>(26)</p>	80 %	90 %
 <p>(28)</p>	75 %	85 %
 <p>(30)</p>	80 %	90 %
 <p>(32)</p>	78 %	89 %
 <p>(34)</p>	85 %	90 %
 <p>(36)</p>	85 %	90 %
 <p>(38)</p>	70 %	80 %

OXIMAS	% de rendimento (método convencional)	% de rendimento (método micro-ondas)
 <p>(40)</p>	72 %	80 %
 <p>(42)</p>	70 %	80 %
 <p>(44)</p>	75 %	90 %
 <p>(46)</p>	70 %	80 %
 <p>(48)</p>	70 %	80 %
 <p>(50)</p>	80 %	Não foi realizado
 <p>(52)</p>	83%	Não foi realizado
 <p>(54)</p>	72 %	Não foi realizado

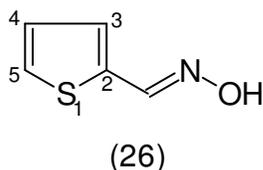
OXIMAS	% de rendimento (método convencional)	% de rendimento (método micro-ondas)
 <p>(56)</p>	76 %	Não foi realizado
 <p>(58)</p>	70 %	Não foi realizado

Não foi realizada a síntese da 4-cloro-benzaldoxima, 4-flúor-benzaldoxima, tereftaldoxima, isoftaldoxima e 4-nitro-benzaldoxima por falta de disponibilidade do micro-ondas.

4.1.2 - A CARACTERIZAÇÃO DAS OXIMAS

As oximas foram caracterizadas por espectroscopia de RMN (^1H e ^{13}C) e de IV.

4.1.2.1 - CARACTERIZAÇÃO DA 2-TIOFENOALDOXIMA



A 2-tiofenoaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 135-136^o C) (GRUNANGER, 1959). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1632 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3017 cm^{-1} , referente às deformações axiais das ligações C-H de carbonos sp^2 . Foi observada uma absorção a 3121 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H e absorções na região entre 1507-1435 cm^{-1} que indicaram as deformações axiais das ligações C=C do anel tiofeno (FIG. 8.1 e TAB. 4.2).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 7,84 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), dois dupletos referentes aos hidrogênios 3 e 5 do anel tiofeno que apresentaram sinais de δ 7,47 e δ 7,73 ppm, respectivamente com constante de acoplamento, 3J , de 3,9 Hz, um tripleto em δ 7,12 ppm referente ao hidrogênio 4 do anel tiofeno e um simpleto em δ 11,86 ppm referente à hidroxila do grupamento aldoxima (H-C=N-OH) (FIG. 8.18 e TAB. 4.3).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal a δ 139,4 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 131,1; δ 131,0; δ 126,2 e δ 131,0 ppm referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 do anel tiofeno, respectivamente (FIG. 8.19 e TAB. 4.3).

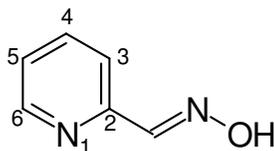
TAB. 4.2 – Caracterizações da 2-tiofenoaldoxima (26) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1632 cm^{-1}
C=C	1507-1435 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3017 cm^{-1}
O-H	3121 cm^{-1}

TAB. 4.3 – Caracterizações da 2-tiofenoaldoxima (26) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	-----	131,1
3	7,47 (d, $^3J= 3,9$; 1H)	131,0
4	7,12 (t, 1H)	126,2
5	7,73 (d, $^3J= 3,9$; 1H)	131,0
H-C=N-OH	7,84 (s, 1H)	139,4
O-H	11,86 (s, 1H)	-----

4.1.2.2 – CARACTERIZAÇÃO DA 2-PIRIDINOALDOXIMA



(28)

A 2-piridinoaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 112,5-113° C) (POZIOMEK, 1958). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1653 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre $3187\text{-}3005\text{ cm}^{-1}$, referentes as deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . A absorção observada a 3285 cm^{-1} indicou a presença de deformação axial O-H e a absorção observada a $1593\text{-}1472\text{ cm}^{-1}$ indicou deformações axiais das ligações C=C do anel piridínico (FIG. 8.2 e TAB. 4.4).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a $\delta\ 8,34\text{ ppm}$, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 7,80$; $\delta\ 7,73$; $\delta\ 7,30$ e $\delta\ 8,64\text{ ppm}$ referentes aos hidrogênios 3, 4, 5 e 6 como multipletos do anel piridínico, respectivamente. O sinal da hidroxila do grupamento oxima não apareceu indicando que houve a formação de dímeros (FIG. 8.21 e TAB. 4.5).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal a $\delta\ 149,3\text{ ppm}$ referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 151,8$; $\delta\ 121,0$; $\delta\ 136,8$; $\delta\ 124,0$ e $\delta\ 150,2\text{ ppm}$ referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel piridínico, respectivamente (FIG. 8.22 e TAB. 4.5).

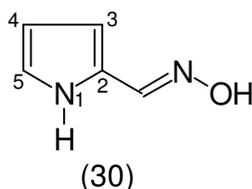
TAB. 4.4 – Caracterizações da 2-piridinoaldoxima (28) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1653 cm^{-1}
C=C	$1472\text{-}1593\text{ cm}^{-1}$
C-H (Csp^2 de arom.)	$3005\text{-}3187\text{ cm}^{-1}$
O-H	3285 cm^{-1}

TAB. 4.5 – Caracterizações da 2-piridinoaldoxima (28) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	-----	151,8
3	7,80 (m, 1H)	121,0
4	7,73 (m, 1H)	136,8
5	7,30 (m, 1H)	124,0
6	8,64 (m, 1H)	150,2
H-C=N-OH	8,34 (s, 1H)	149,3
O-H	-----	-----

4.1.2.3 – CARACTERIZAÇÃO DA 2-PIRROILALDOXIMA



A 2-pirroilaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 182-184° C) (FOURNARI, 1963). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1643 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3033 cm^{-1} , referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3426 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H, uma absorção a 3419 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial N-H e as absorções na região entre $1586\text{-}1429\text{ cm}^{-1}$ que indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel pirrol (FIG. 8.3 e TAB. 4.6).

No espectro de RMN ^1H foi observado um sinal simples a δ 7,26 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 6,88 e δ 6,55 ppm, como dupletos com $^3J = 3,2\text{ Hz}$ referentes aos hidrogênios 3 e 5 do anel pirrol e δ 6,10 ppm como um tripleto referente ao hidrogênio 4 do anel pirrol. O sinal da hidroxila do

grupamento oxima apareceu como um simpleto em δ 11,14 ppm (FIG. 8.24 e TAB. 4.7).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 137,1 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima ($\text{H}-\text{C}=\text{N}-\text{OH}$), além dos sinais a δ 129,4; δ 113,8; δ 108,3 e δ 120,8 ppm referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 do anel pirrol, respectivamente (FIG. 8.25 e TAB. 4.7).

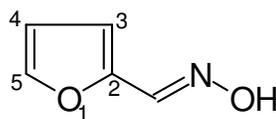
TAB. 4.6 – Caracterizações da 2-pirroilaldoxima (30) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1643 cm^{-1}
C=C	1429-1586 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3033 cm^{-1}
O-H	3426 cm^{-1}
N-H	3419

TAB. 4.7 – Caracterizações da 2-pirroilaldoxima (30) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	-----	129,4
3	6,88 (d, $^3J= 3,2$; 1H)	113,8
4	6,10 (t, 1H)	108,3
5	6,55 (d, $^3J= 3,2$; 1H)	120,8
H-C=N-OH	7,26 (s, 1H)	137,1
O-H	11,86 (s, 1H)	-----

4.1.2.4 – CARACTERIZAÇÃO DA 2-FURFURILALDOXIMA



(32)

A 2-furfuraldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 70-72° C) (MURATA,1946). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1645 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre 3080-3042 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3165 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H e as absorções na região entre 1567-1449 cm^{-1} que indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel furfural (FIG. 8.4 e TAB. 4.8).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 7,54 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (**H-C=N-OH**). Foi observado também um duplo duplete a δ 7,35 ppm referente ao hidrogênio 3, com constantes de acoplamento, 3J , de 3,5 Hz e 4J , de 0,6 Hz, um duplo duplete a δ 6,53 ppm referente ao hidrogênio 4, com constantes de acoplamento, 3J , de 3,5 Hz e 3J , de 1,7 Hz e um duplo duplete a δ 7,47 ppm referente ao hidrogênio 5, com constantes de acoplamento, 3J , de 1,7 Hz e 4J , de 0,6 Hz, todos eles do anel furfural. O sinal do hidrogênio da hidroxila do grupamento oxima não apareceu indicando que houve a formação de dímeros (FIG. 8.26 e TAB. 4.9).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 137,0 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (**H-C=N-OH**), além dos sinais a δ 145,1; δ 118,2; δ 112,3 e δ 143,4 ppm referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 do anel furfural, respectivamente (FIG. 8.28 e TAB. 4.9).

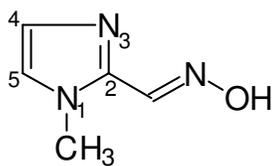
TAB. 4.8 – Caracterizações da 2-furfurilaldoxima (32) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1645 cm^{-1}
C=C	1449-1567 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3080-3042 cm^{-1}
O-H	3165 cm^{-1}

TAB. 4.9 – Caracterizações da 2-furfurilaldoxima (32) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	-----	145,1
3	7,35 (d, $^3J= 3,5$ e $^4J= 0,6$; 1H)	118,2
4	6,53 (d, $^3J= 3,5$ e $^3J= 1,7$; 1H)	112,3
5	7,47 (d, $^3J= 1,7$ e $^4J= 0,6$; 1H)	143,4
H-C=N-OH	7,54 (s, 1H)	137,0
O-H	-----	-----

4.1.2.5 – CARACTERIZAÇÃO DA 1-METIL-2-IMIDAZOILALDOXIMA



(34)

A 1-metil-2-imidazoilaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 168-169° C) (PHALGUNI, 2007). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1628 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que característica do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre 3118-3078 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-H de carbonos sp^2 e absorções na região entre 2994-2917 cm^{-1}

referentes às deformações axiais assimétricas das ligações C-H de carbono sp^3 . Também foi observada uma absorção a 3413 cm^{-1} de deformação axial O-H e as absorções na região entre $1556\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$ que indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel imidazol (FIG. 8.5 e FIG. 4.10).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a $\delta\ 8,06$ ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), dois dupletos referentes aos hidrogênios 4 e 5 do anel imidazol que apresentaram sinais de $\delta\ 7,24$ e $\delta\ 6,98$ ppm, respectivamente com constante de acoplamento, 3J , de $3,0$ Hz. O simpleto a $\delta\ 3,80$ ppm é referente aos 3 hidrogênios do grupamento metílico ligado ao nitrogênio do anel imidazol e o simpleto a $\delta\ 11,59$ ppm é referente ao hidrogênio da hidroxila do grupamento oxima (FIG. 8.29 e TAB. 4.11).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal a $\delta\ 141,4$ ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 140,2$; $\delta\ 128,5$ e $\delta\ 124,6$ ppm referentes aos carbonos C-2, C-4 e C-5 do anel imidazol, respectivamente e um sinal a $\delta\ 34,8$ ppm referente ao grupo metil ligado ao nitrogênio do anel imidazol (FIG. 8.31 e TAB. 4.11).

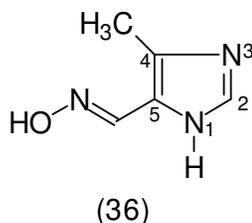
TAB. 4.10 – Caracterizações da 1-metil-2-imidazoilaldoxima (34) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1628 cm^{-1}
C=C	$1477\text{-}1556\text{ cm}^{-1}$
C-H (Csp^2 de arom.)	$3078\text{-}3118\text{ cm}^{-1}$
C-H (Csp^3)	$2917\text{-}2994\text{ cm}^{-1}$
O-H	3413 cm^{-1}

TAB. 4.11 – Caracterizações da 1-metil-2-imidazoilaldoxima (34) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	-----	140,2
4	7,24 (d, $^3J= 3,0$; 1H)	124,6
5	6,98 (d, $^3J= 3,0$; 1H)	143,4
H-C=N-OH	7,54 (s, 1H)	137,0
O-H	11,59 (s, 1H)	-----

4.1.2.6 – CARACTERIZAÇÃO DA 4-METIL-5-IMIDAZOILALDOXIMA



A 4-metil-5-imidazoilaldoxima apresentou ponto de fusão 170-172 $^{\circ}$ C e o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV da 4-metil-5-imidazoilaldoxima foi observada uma absorção a 1655 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3044 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 e das absorções na região entre 2926-2872 cm^{-1} referentes as deformações axiais assimétricas e simétricas das ligações C-H de carbono sp^3 . Também foi observada uma absorção a 3407 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H, uma absorção a 3131 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial N-H e as absorções na região entre 1609-1434 cm^{-1} que indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel imidazol (FIG. 8.6 e TAB. 4.12).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,38 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), além do hidrogênio 2 do anel imidazol que

apresentou um simpleto a δ 8,18 ppm e um simpleto a δ 2,55 ppm que foi referente aos 3 hidrogênios do grupamento metílico ligado ao carbono do anel imidazol. O sinal do hidrogênio da hidroxila do grupamento oxima não apareceu indicando que houve a formação de dímeros (FIG. 8.32 e TAB. 4.13).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 146,8 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima ($\text{H}-\text{C}=\text{N}-\text{OH}$), além dos sinais a δ 135,8; δ 139,4 e δ 127,3 ppm referentes aos carbonos C-2, C-4 e C-5 do anel imidazol, respectivamente e um sinal a δ 11,7 ppm referente ao grupo metil ligado ao carbono do anel imidazol (FIG. 8.33 e TAB. 4.13).

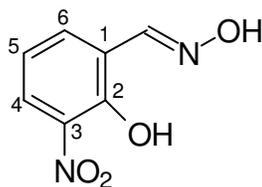
TAB. 4.12 – Caracterizações da 4-metil-5-imidazoilaldoxima (36) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1655 cm^{-1}
C=C	1434-1609 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3044 cm^{-1}
C-H (Csp^3)	2872-2926 cm^{-1}
O-H	3407 cm^{-1}
N-H	3131 cm^{-1}

TAB. 4.13 – Caracterizações da 4-metil-5-imidazoilaldoxima (36) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	8,18 (s, 1H)	135,8
4	-----	139,4
CH ₃	2,55 (s, 1H)	11,7
5	-----	127,3
H-C=N-OH	8,38 (s, 1H)	146,8
O-H	-----	-----

4.1.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DA 3-NITRO-SALICILALDOXIMA



(38)

A 3-nitro-salicilaldoxima apresentou ponto de fusão 207-209° C e o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV da 3-nitro-salicilaldoxima foi observada uma absorção a 1631 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre 3087-3004 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3409 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre 1584-1434 cm^{-1} indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático e uma absorção observada a 1343 cm^{-1} indicou a presença de deformações axiais de grupo nitro conjugado (FIG. 8.7 e TAB. 4.14).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,44 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH) e um simpleto a δ 11,44 ppm referentes às duas hidroxilas da 3-nitro-salicilaldoxima. Foi observado também um duplo duplete a δ 7,94 pmm referente ao hidrogênio 4, com constantes de acoplamento, 3J , de 8,2 Hz e 4J , de 1,5 Hz, um tripleto a δ 7,07 ppm referente ao hidrogênio 5 e um duplo duplete a δ 7,84 pmm referente ao hidrogênio 6, com constantes de acoplamento, 3J , de 7,8 Hz e 4J , de 1,5 Hz, todos eles do anel aromático (FIG. 8.34 e TAB. 4.15).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 146,7 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 119,5; δ 150,3; δ 137,2; δ 125,8; δ 122,0 e δ 133,6 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel aromático, respectivamente (FIG. 8.36 e TAB. 4.15).

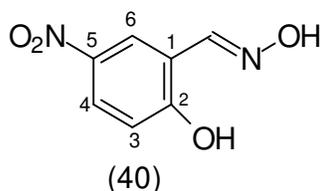
TAB. 4.14 – Caracterizações da 3-nitro-salicilaldoxima (38) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1631 cm^{-1}
C=C	1434-1584 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3004-3087 cm^{-1}
O-H	3409 cm^{-1}
NO_2 (conjugado)	1343 cm^{-1}

TAB. 4.15 – Caracterizações da 3-nitro-salicilaldoxima (38) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	119,5
2	-----	150,3
3	-----	137,2
4	7,94 (dd, $^3J= 8,2$ e $^4J= 1,5$; 1H)	125,8
5	7,07 (t, 1H)	122,0
6	7,84 (dd, $^3J= 7,8$ e $^4J= 1,5$; 1H)	133,6
H-C=N-OH	8,44 (s, 1H)	146,78
O-H	11,44 (s, 2H)	-----

4.1.2.8 – CARACTERIZAÇÃO DA 5-NITRO-SALICILALDOXIMA



A 5-nitro-salicilaldoxima apresentou ponto de fusão 230-232 $^{\circ}$ C e o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV da 5-nitro-salicilaldoxima foi observada uma absorção a 1621 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre 3099-3068 cm^{-1} referentes às

deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3308 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre $1576\text{-}1483\text{ cm}^{-1}$ indicaram as deformações axiais das ligações C=C do anel aromático e uma absorção observada a 1339 cm^{-1} indicou a presença de deformações axiais do grupo nitro conjugado (FIG. 8.8 e TAB. 4.16).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a $\delta\ 8,34\text{ ppm}$, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH) e um simpleto a $\delta\ 11,66\text{ ppm}$ referentes às duas hidroxilas da 5-nitro-salicilaldoxima. Foi observado também um duplete a $\delta\ 7,05\text{ ppm}$ referente ao hidrogênio 3, com constante de acoplamento, 3J , de $9,1\text{ Hz}$, um duplo duplete a $\delta\ 8,10\text{ ppm}$ referente ao hidrogênio 4, com constantes de acoplamento, 3J , de $9,1\text{ Hz}$ e 4J , de $3,1\text{ Hz}$ e um duplete a $\delta\ 8,40\text{ ppm}$ referente ao hidrogênio 6, com constante de acoplamento, 4J , de $3,1\text{ Hz}$, todos eles do anel aromático (FIG. 8.37 e TAB. 4.17)

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em $\delta\ 144,3\text{ ppm}$ referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 119,4$; $\delta\ 161,3$; $\delta\ 116,3$; $\delta\ 126,0$; $\delta\ 139,9$ e $\delta\ 122,5\text{ ppm}$ referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel aromático, respectivamente (FIG. 8.39 e TAB. 4.17).

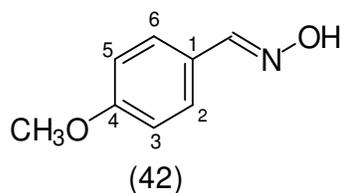
TAB. 4.16 – Caracterizações da 5-nitro-salicilaldoxima (40) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1621 cm^{-1}
C=C	$1483\text{-}1576\text{ cm}^{-1}$
C-H (Csp^2 de arom.)	$3009\text{-}3068\text{ cm}^{-1}$
O-H	3308 cm^{-1}
NO_2 (conjugado)	1339 cm^{-1}

TAB. 4.17 – Caracterizações da 5-nitro-salicilaldoxima (40) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	119,4
2	-----	161,3
3	7,05 (d, $^3J= 9,1$; 1H)	116,3
4	8,10 (dd, $^3J= 9,1$ e $^4J= 3,1$; 1H)	126,0
5	-----	139,9
6	8,40 (d, $^4J= 3,1$; 1H)	122,5
H-C=N-OH	8,34 (s, 1H)	144,3
O-H	11,66 (s, 2H)	-----

4.1.2.9 – CARACTERIZAÇÃO DA 4-METOXI-BENZALDOXIMA



A 4-metoxi-benzaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 131-133^o C) (BADRI, 2007). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1608 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3006 cm^{-1} referentes às deformações axiais ligações C-H de carbono sp^2 e a região de absorções entre 2966 a 2838 referentes as deformações axiais assimétricas e simétricas das ligações C-H de carbono sp^3 . Também foi observada uma absorção a 3307 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre 1574-1466 cm^{-1} indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.9 e TAB. 4.18).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,13 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH). Também foi observado um duplete a δ 7,75 ppm referente aos hidrogênios 2 e 6, com constante de acoplamento, 3J , de 8,6 Hz e um duplete a δ 6,91 ppm referente aos hidrogênios 3 e 5, com constante de acoplamento, 3J , de 8,6 Hz. O simpleto a δ 3,85 ppm é referente aos 3 hidrogênios do grupamento metílico ligado ao anel aromático. O sinal do hidrogênio da hidroxila do grupamento oxima não apareceu indicando que houve a formação de dímeros (FIG. 8.40 e TAB. 4.19).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 147,6 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 125,6; δ 127,8; δ 160,1 e δ 114,2 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-6, C-4, C-3 e C-5 do anel aromático, respectivamente e um sinal a δ 55,2 ppm referente ao grupo metil ligado ao carbono do anel aromático (FIG. 8.41 e TAB. 4.19).

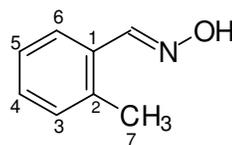
TAB. 4.18 – Caracterizações da 4-metoxi-benzaldoxima (42) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1621 cm^{-1}
C=C	1483-1576 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3009-3068 cm^{-1}
C-H (Csp^3)	2838-2966 cm^{-1}
O-H	3308 cm^{-1}

TAB. 4.19 – Caracterizações da 4-metoxi-benzaldoxima (42) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	125,6
2 e 6	7,75 (d, $^3J= 8,6$; 2H)	127,8
3 e 5	6,91 (d, $^3J= 8,6$; 2H)	114,2
4	-----	160,1
H-C=N-OH	8,13 (s, 1H)	147,6
O-CH ₃	3,85 (s, 3H)	55,2
O-H	-----	-----

4.1.2.10 – CARACTERIZAÇÃO DA *o*-TOLUILALDOXIMA



(44)

A *o*-toluilaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 52-53^o C) (KAPURIYA, 2008). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1624 cm⁻¹ que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3069 cm⁻¹ referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp² e uma região de absorções entre 2991-2870 cm⁻¹ referentes as deformações axiais assimétricas e simétricas das ligações C-H de carbono sp³. Também foi observada uma absorção a 3189 cm⁻¹ que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre 1599-1453 cm⁻¹ indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.10 e TAB. 4.20).

No espectro de RMN ¹H foi observado um simpleto a δ 8,32 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 7,22 e δ 7,62 ppm referentes aos hidrogênios 3, 4 e 5 e ao hidrogênio 6 como multipletos do anel aromático, respectivamente e um simpleto em δ 11,26 ppm referente à hidroxila do grupamento aldoxima (FIG. 8.42 e TAB. 4.21).

No espectro de RMN ¹³C foi observado um sinal em δ 147,0 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 126,1; δ 135,9; δ 128,9; δ 131,1; δ 126,0 e δ 130,7 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel aromático, respectivamente e um sinal a δ 19,5 ppm referente ao grupo metil ligado ao carbono do anel aromático (FIG. 8.43 e TAB. 4.21).

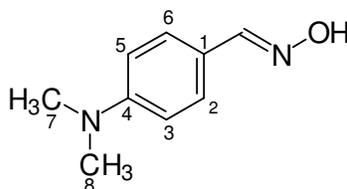
TAB. 4.20 – Caracterizações da *o*-toluilaldoxima (44) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm ⁻¹)
C=N	1624 cm ⁻¹
C=C	1453-1599 cm ⁻¹
C-H (Csp ² de arom.)	3069 cm ⁻¹
C-H (Csp ³)	2870-2991 cm ⁻¹
O-H	3189 cm ⁻¹

TAB. 4.21 – Caracterizações da *o*-toluilaldoxima (44) por RMN de ¹H e ¹³C:

Posição	δ ¹ H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1	-----	126,1
2	-----	135,9
3	7,22 (m, 1H)	128,9
4	7,22 (m, 1H)	131,1
5	7,22 (m, 1H)	126,0
6	7,62 (m, 1H)	130,7
H-C=N-OH	8,13 (s, 1H)	147,0
O-H	11,26 (s, 1H)	-----

4.1.2.11 – CARACTERIZAÇÃO DA *N,N*-DIMETIL-*p*-AMINOBENZALDOXIMA



(46)

A *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 152-154° C) (LI, 2007). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV da foi observada uma absorção a 1609 cm⁻¹ que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além

da absorção a 3138 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbonos sp^2 e uma região de absorção entre 2985-2913 referentes as deformações assimétricas e simétricas das ligações C-H de carbonos sp^3 . Também foi observada uma absorção a 3243 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre $1556-1445\text{ cm}^{-1}$ indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.11 e TAB. 4.22).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a $\delta\ 7,98\text{ ppm}$, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH). Também foi observado um duplete a $\delta\ 6,70\text{ ppm}$ referente aos hidrogênios 2 e 6, com constante de acoplamento, 3J , de 8,8 Hz e um duplete a $\delta\ 7,42\text{ ppm}$ referente aos hidrogênios 3 e 5, com constante de acoplamento, 3J , de 8,8 Hz. O simpleto a $\delta\ 2,94\text{ ppm}$ é referente aos 6 hidrogênios do grupamento metílico ligados no nitrogênio ligado ao anel aromático. Não aparece o sinal do hidrogênio da hidroxila do grupamento aldoxima devido a formação de dímeros (FIG. 8.45 e TAB. 4.23).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em $\delta\ 149,0\text{ ppm}$ referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 121,5$; $\delta\ 128,2$; $\delta\ 151,7$ e $\delta\ 112,4\text{ ppm}$ referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-6, C-4, C-3 e C-5 do anel aromático, respectivamente e um simpleto a $\delta\ 40,0\text{ ppm}$ referente aos dois grupos metil ligados no nitrogênio ligado ao anel aromático (FIG. 8.47 e TAB. 4.23).

TAB. 4.22 – Caracterizações da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima (46) por

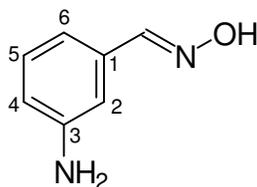
Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1609 cm^{-1}
C=C	$1445-1556\text{ cm}^{-1}$
C-H (C_{sp^2} de arom.)	3138 cm^{-1}
C-H (C_{sp^3})	$2913-2985\text{ cm}^{-1}$
O-H	3243 cm^{-1}

TAB. 4.23 – Caracterizações da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima (46) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	121,5
2 e 6	6,70 ($^3J= 8,80$; 2H)	128,2
3 e 5	7,42 ($^3J= 8,80$; 2H)	112,4
4	-----	151,7
H-C=N-OH	7,98 (s, 1H)	149,0
CH ₃	2,94 (s, 6H)	40,0
O-H	-----	-----

4.1.2.12 – CARACTERIZAÇÃO DA *m*-AMINOBENZALDOXIMA



(48)

A *m*-aminobenzaldoxima apresentou ponto de fusão 142-125° C e o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV da *m*-aminobenzaldoxima foi observada uma absorção a 1608 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3006 cm^{-1} referente as deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 e a região entre 2966-2838 cm^{-1} referentes as deformações axiais assimétricas e simétricas das ligações C-H de carbono sp^3 . Também foi observada uma absorção a 3307 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre 1574-1458 cm^{-1} indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.12 e TAB. 4.24).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,09 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH). Também foi observado um simpleto a δ 6,32 ppm referente ao hidrogênio 2, dois dupletos a δ 6,81 e a δ 7,41 ppm, com constantes de acoplamento, 3J , de 7,7 Hz e de 8,1 Hz referentes aos hidrogênios 4 e 6, respectivamente e um tripleto a δ 7,18 ppm referente ao hidrogênio 5, todos do anel aromático. Não aparece o sinal da hidroxila do grupamento aldoxima devido à formação de dímeros (FIG. 8.48 e TAB. 4.25).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 150,5 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 133,4; δ 111,9; δ 151,5; δ 119,7; δ 128,2 e δ 132,8 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel aromático (FIG. 8.50 e TAB. 4.25).

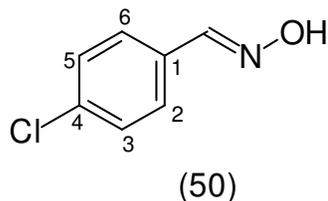
TAB. 4.24 – Caracterizações da *m*-aminobenzaldoxima (48) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1608 cm^{-1}
C=C	1458-1574 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3006 cm^{-1}
C-H (Csp^3)	2838-2966 cm^{-1}
O-H	3307 cm^{-1}

TAB. 4.25 – Caracterizações da *m*-aminobenzaldoxima (48) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	133,4
2	6,32 (s, 1H)	111,9
3	-----	151,5
4	6,81 ($^3J= 7,7$; 1H)	119,7
5	7,18 (t, 1H)	128,2
6	7,41($^3J= 8,1$; 1H)	132,8
H-C=N-OH	8,09 (s, 1H)	150,5
O-H	-----	-----

4.1.2.13 – CARACTERIZAÇÃO DA 4-CLORO-BENZALDOXIMA



A 4-cloro-benzaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 112-114°C) (PICHA, 2004). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1684 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção na região a 2997 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3296 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H e uma absorção a 691 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial C-Cl. As absorções observadas na região entre 1595-1454 cm^{-1} indicaram as deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.13 e TAB. 4.26).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,15 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH) e um simpleto a δ 11,37 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila do grupamento oxima. Também foi observado um duplete a δ 7,60 ppm referente aos hidrogênios 2 e 6, com constante de acoplamento, 3J , de 8,8 Hz e um duplete a δ 7,44 ppm referente aos hidrogênios 3 e 5, com constante de acoplamento, 3J , de 8,8 Hz (FIG. 8.51 e TAB. 4.27).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 147,1 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 132,0; δ 128,0; δ 133,7 e δ 128,7 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-6, C-4, C-3 e C-5 do anel aromático (FIG. 8.56 e TAB. 4.27).

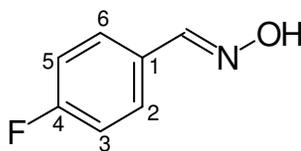
TAB. 4.26 – Caracterizações da 4-cloro-benzaldoxima (50) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1684 cm^{-1}
C=C	1454-1595 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	2997 cm^{-1}
C-Cl	691 cm^{-1}
O-H	3296 cm^{-1}

TAB. 4.27 – Caracterizações da 4-cloro-benzaldoxima (50) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	132,0
2 e 6	7,60 (d, $^3J= 8,8$; 1H)	128,0
3 e 5	7,44 (d, $^3J= 8,8$; 1H)	128,7
4	-----	133,7
H-C=N-OH	8,15 (s, 1H)	147,1
O-H	11,37 (s, 1H)	-----

4.1.2.14 – CARACTERIZAÇÃO DA 4-FLÚOR-BENZALDOXIMA



(52)

A 4-flúor-benzaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 116-117°C) (JAIN, 2005). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1642 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3016 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3261 cm^{-1} que indicou a

presença de deformação axial O-H e uma absorção a 1242 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial C-F. As absorções observadas na região entre $1608\text{-}1474\text{ cm}^{-1}$ indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.14 e TAB. 4.28).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a $\delta\ 8,14$ ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH) e um simpleto a $\delta\ 11,26$ ppm referente a hidroxila do grupamento oxima. Também foi observado um duplo duplete a $\delta\ 7,63$ ppm referente aos hidrogênios 2 e 6, com constantes de acoplamento, $^3J_{HH}$, de $9,4$ Hz e $^4J_{HF}$, de $0,6$ Hz e um tripleto a $\delta\ 7,22$ ppm referente aos hidrogênios 3 e 5, com constantes de acoplamento, $^3J_{HH}$, de $9,4$ Hz e $^3J_{HF}$, de $9,0$ Hz. (FIG. 8.57 e TAB. 4.29).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal a $\delta\ 147,1$ ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 129,7$ ppm ($^4J_{FC=}$ $2,7$ Hz) ; $\delta\ 128,4$ ppm ($^3J_{FC=}$ $8,5$ Hz); $\delta\ 115,7$ ppm ($^2J_{FC=}$ $22,2$ Hz) e $\delta\ 162,5$ ppm ($^1J_{FC=}$ $245,9$ Hz) referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-6, C-3 e C-5 e C-4 do anel aromático (FIG. 8.59 e TAB. 4.29).

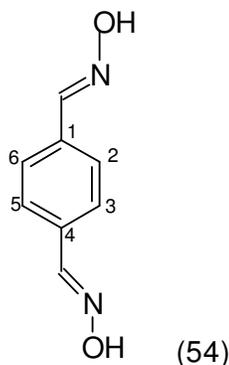
TAB. 4.28 – Caracterizações da 4-flúor-benzaldoxima (52) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1642 cm^{-1}
C=C	$1474\text{-}1608\text{ cm}^{-1}$
C-H (Csp ² de arom.)	3016 cm^{-1}
C-F	1242 cm^{-1}
O-H	3261 cm^{-1}

TAB. 4.29 – Caracterizações da 4-flúor-benzaldoxima (52) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm), J (Hz)
1	-----	129,7 ($^4J_{FC} = 2,7$)
2 e 6	7,63 (d, $^3J_{HH} = 9,4$ e $^4J_{HF} = 0,6$; 1H)	128,4 ($^3J_{FC} = 8,5$)
3 e 5	7,22 (t, $^3J_{HH} = 9,4$ e $^3J_{HF} = 9,0$; 1H)	115,7 ($^2J_{FC} = 22,2$)
4	-----	1162,5 ($^1J_{FC} = 245,9$)
H-C=N-OH	8,14 (s, 1H)	147,1
O-H	11,26 (s, 1H)	-----

4.1.2.15 – CARACTERIZAÇÃO DA TEREFTALDOXIMA



No espectro de IV da tereftaldoxima foi observada uma absorção a 1624 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além da absorção a 3016 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3248 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. As absorções observadas na região entre $1518\text{-}1456\text{ cm}^{-1}$ indicaram deformações axiais das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.15 e TAB. 4.30).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simplete a δ 8,15 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH), além um simplete a δ 7,77 ppm referente aos

hidrogênios 2, 3, 5 e 6 do anel aromático. Não apareceu o sinal da hidroxila do grupamento oxima indicando a formação de dímeros (FIG. 8.61 e TAB. 4.31).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal a δ 149,5 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima ($\text{H}-\text{C}=\text{N}-\text{OH}$), além dos sinais a δ 134,2 ppm referentes aos carbonos C-1 e C-4 e δ 130,2 ppm referentes aos carbonos C-2, C-3, C-5 e C-6 do anel aromático (FIG. 8.62 e TAB. 4.31).

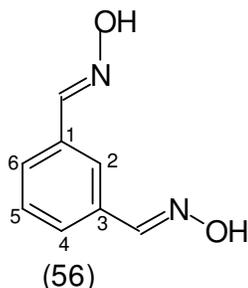
TAB. 4.30 – Caracterizações da tereftaldoxima (54) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1624 cm^{-1}
C=C	1456-1518 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3016 cm^{-1}
O-H	3248 cm^{-1}

TAB. 4.31 – Caracterizações da tereftaldoxima (54) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1 e 4	-----	134,2
2, 3, 5 e 6	7,77 (s, 1H)	130,2
H-C=N-OH	8,15 (s, 1H)	149,5
O-H	-----	-----

4.1.2.16 – CARACTERIZAÇÃO DA ISOFTALDOXIMA



No espectro de IV da isoftaldoxima foi observada uma absorção a 1643 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorção a 3000 cm^{-1} referente às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3247 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. A absorção observada a 1490 cm^{-1} indicou deformação axial das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.16 e TAB. 4.32).

No espectro de RMN ^1H foram observados dois simpletos a $\delta\ 8,16$ e a $\delta\ 8,17$ ppm, referentes aos hidrogênios aldoxímicos (H-C=N-OH) e um simpleto a $\delta\ 11,32$ ppm referente a hidroxila do grupamento oxima. Também foi observado um simpleto a $\delta\ 7,80$ ppm referente ao hidrogênio 2, um duplo duplete a $\delta\ 7,58$ ppm referente aos hidrogênios 4 e 6, com constantes de acoplamento, 3J , de $7,6\text{ Hz}$ e 4J , de $1,7\text{ Hz}$ e um triplete a $\delta\ 7,41$ ppm referente ao hidrogênio 5, todos anel aromático (FIG. 8.63 e TAB. 4.33).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em $\delta\ 147,7$ ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a $\delta\ 133,5$; $\delta\ 129,1$; $\delta\ 127,1$ e $\delta\ 124,2$ ppm referentes aos carbonos C-1 e C-3, C-2, C-4 e C-6, C-5, respectivamente, todos do anel aromático (FIG. 8.65 e TAB. 4.33).

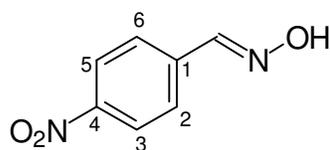
TAB. 4.32 – Caracterizações da isoftaldoxima (56) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1643 cm^{-1}
C=C	1490 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3000 cm^{-1}
O-H	3247 cm^{-1}

TAB. 4.33 – Caracterizações da isoftaldoxima (56) por RMN de ^1H e ^{13}C :

Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1 e 3	-----	133,5
2	7,80 (s, 1H)	129,1
4 e 6	7,58 (dd, $^3J= 7,6$ e $^4J= 1,7$; 2H)	127,1
5	7,41 (t, 1H)	124,2
H-C=N-OH	8,16 e 8,17 (s, 2H)	147,7
O-H	11,32 (s, 1H)	-----

4.1.2.17 – CARACTERIZAÇÃO DA 4-NITRO-BENZALDOXIMA



(58)

A 4-nitro-benzaldoxima apresentou ponto de fusão próximo ao da literatura (pf. 215-216° C) (PALM, 1954). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise.

No espectro de IV foi observada uma absorção a 1606 cm^{-1} que é uma deformação axial C=N, que indicou a presença do grupamento funcional oxima, além das absorções na região entre 3105-3012 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-H de carbono sp^2 . Também foi observada uma absorção a 3306 cm^{-1} que indicou a presença de deformação axial O-H. A absorção observada na região entre 1537-1496 cm^{-1} indicou deformação axial das ligações C=C do anel aromático (FIG. 8.17 e TAB.4.34).

No espectro de RMN ^1H foi observado um simpleto a δ 8,29 ppm, referente ao hidrogênio aldoxímico (H-C=N-OH) e um simpleto a δ 11,87 ppm referente a hidroxila do grupamento oxima. Também foi observado um duplete a δ 7,83 ppm referente aos hidrogênios 2 e 6, com constante de acoplamento, 3J , de 8,7 Hz e um

duplete a δ 8,22 ppm referente aos hidrogênios 3 e 5, com constante de acoplamento, 3J , de 8,7 Hz. (FIG. 8.66 e TAB. 4.35).

No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em δ 146,9 ppm referente ao carbono do grupamento aldoxima (H-C=N-OH), além dos sinais a δ 139,5; 127,4; 124,0 e 147,5 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-6, C-3 e C-5, C-4 respectivamente. (FIG. 8.68 e TAB. 4.35).

TAB. 4.34 – Caracterizações da 4-nitro-benzaldoxima (58) por Infravermelho:

Grupos funcionais	Vibrações por IV (cm^{-1})
C=N	1606 cm^{-1}
C=C	1496-1537 cm^{-1}
C-H (Csp^2 de arom.)	3012-3105 cm^{-1}
O-H	3306 cm^{-1}

TAB. 4.35 – Caracterizações da 4-nitro-benzaldoxima (58) por RMN de ^1H e ^{13}C :

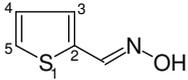
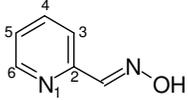
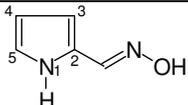
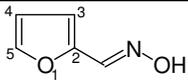
Posição	δ ^1H (ppm), J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	139,5
2 e 6	7,83 (d, $^3J= 8,7$; 2H)	127,4
3 e 5	8,22 (d, $^3J= 8,7$; 2H)	124,0
4	-----	147,5
H-C=N-OH	8,29 (s, 1H)	146,9
O-H	11,87 (s, 1H)	-----

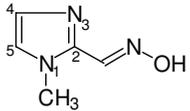
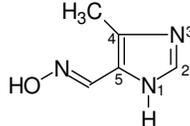
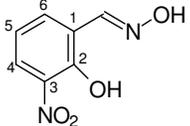
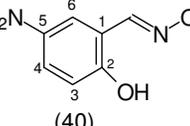
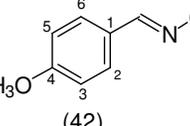
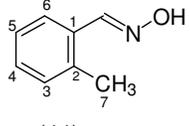
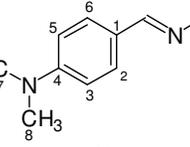
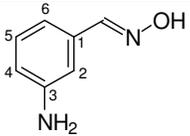
4.1.3 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DAS CARACTERIZAÇÕES DAS OXIMAS

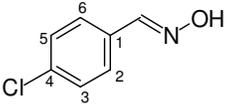
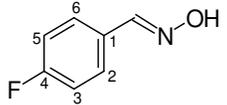
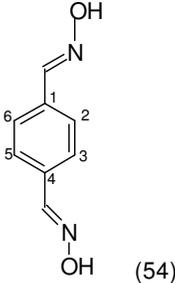
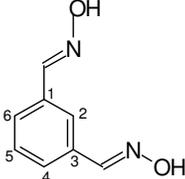
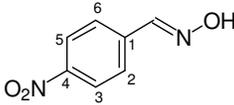
Todas as oximas sintetizadas possuem caracterizações que identificam o grupamento R-**HC=NOH**. Nos espectros de IV foram observadas as deformações axiais **C=N** características dos grupamentos oxima. Estas vibrações podem variar em uma faixa de 1606 cm⁻¹ a 1685 cm⁻¹ (TAB. 4.36). As vibrações em 1606 cm⁻¹ a 1609 cm⁻¹ indicam que as oximas estão com a configuração *cis* (Z). A grande maioria das oximas sintetizadas apresentou configuração *trans* (E).

Por RMN ¹H e ¹³C também foram observadas as mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios aldoxímicos e nos carbonos dos grupamentos oximas, de acordo com tipo de substituinte em que estão ligados. Estes deslocamentos podem variar em uma faixa de δ 7,26 ppm a δ 8,44 ppm para os deslocamentos químicos dos hidrogênios e de δ 137,0 ppm a δ 150,5 ppm para os deslocamentos químicos dos carbonos (TAB. 4.36).

TAB. 4.36 - Tabela com as principais caracterizações dos grupamentos aldoximas sintetizados.

OXIMAS	RMN ¹H (δ, ppm) H-C=NOH	RMN ¹³C (δ, ppm) H-C=NOH	IV (cm⁻¹) H-C=NOH
 (26)	7,84 (s, 1H)	139,8	1632
 (28)	8,34 (s, 1H)	149,3	1653
 (30)	7,26 (s, 1H)	137,1	1646
 (32)	7,54 (s, 1H)	137,0	1645

OXIMAS	RMN ¹H (δ, ppm) H-C=NOH	RMN ¹³C (δ, ppm) H-C=NOH	IV (cm⁻¹) H-C=NOH
 (34)	8,06 (s, 1H)	141,4	1628
 (36)	8,38 (s, 1H)	146,8	1655
 (38)	8,44 (s, 1H)	146,7	1631
 (40)	8,34 (s, 1H)	144,3.	1621
 (42)	8,13 (s, 1H)	147,6	1608
 (44)	8,32 (s, 1H)	147,0	1624
 (46)	7,98 (s, 1H)	149,0	1609
 (48)	8,09 (s, 1H)	150,5	1608

OXIMAS	RMN ¹ H (δ, ppm) H-C=NOH	RMN ¹³ C (δ, ppm) H-C=NOH	IV (cm ⁻¹) H-C=NOH
 (50)	8,15 (s, 1H)	147,1	1684
 (52)	8,14 (s, 1H)	147,1	1685
 (54)	8,15 (s, 2H)	149,5	1624
 (56)	8,17 e 8,16 (s, 2H)	147,7	1643
 (58)	8,29 (s, 1H)	146,9	1606

4.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 - FUNDAMENTO DO MÉTODO UTILIZADO NOS ENSAIOS

O método de Ellman tem por finalidade quantificar a atividade da AchE através da formação de um composto colorido (ácido tionitrobenzóico) formado pela reação da tiocolina com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB). O ácido tionitrobenzóico pode ser determinado cineticamente a 412 nm. A tiocolina é gerada por hidrólise da acetiltiocolina pela AChE eritrocitária (ELLMAN, 1971).

No método de Ellman modificado por Oliveira-Silva e colaboradores (2000) a enzima AChE é isolada após a lise das hemácias, através da qual é obtida a “proteína ghost”.

A vantagem do método de Ellman modificado por Oliveira-Silva e colaboradores (2000) em relação às outras metodologias que utilizam amostras frescas de sangue é a possibilidade de se estocar as amostras congeladas sem perda da atividade enzimática possibilitando assim o deslocamento das amostras para o laboratório de referência.

O método de Ellman vem sendo muito utilizado nos estudos de reativação da HuAChE, uma vez que a acetilcolinesterase eritrocitária apresenta sensibilidade similar a acetilcolinesterase do SNC (WOREK, 2004).

A primeira etapa do trabalho consistiu em formar um grupo de voluntários, doadores de sangue, que foram submetidos a responder um questionário com o objetivo de que não haja fatores que possam interferir nos experimentos como determinadas práticas domésticas e profissionais

4.2.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PADRÃO DE PARAOXON

Os primeiros experimentos tiveram o objetivo de estabelecer a concentração de etil-paraoxon utilizada no estudo da reativação da AChE pelas oximas. Para isso foi determinado qual seria a concentração mínima do etil-paraoxon que seria necessária para inibir a AChE em 100%. O etil-paraoxon é o metabólito ativo do pesticida etil-paration (FIG. 4.2). Foram realizados inúmeros testes, todos em triplicata, variando-se a concentração do etil-paraoxon em $0,125 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

¹, 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Seu efeito na inibição da atividade da acetilcolinesterase humana demonstrou que a concentração de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibe aproximadamente 100% do sistema enzimático (FIG. 4.3). Desta forma, não houve excesso de organofosforado e, portanto re-inibição da AChE pelo etil-paraoxon livre. Este excesso também seria prejudicial no experimento porque a oxima livre poderia se ligar no organofosforado ao invés de reverter a AChE inibida por ele e desta forma interferir nos resultados dos nossos experimentos.

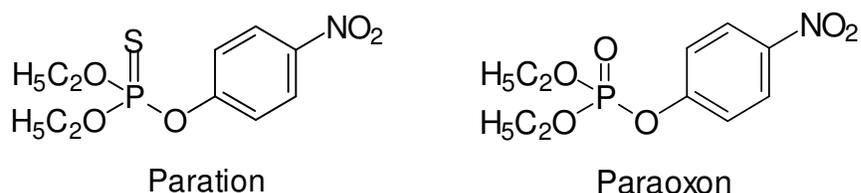


FIG. 4.2 – Estruturas do Paration e do Paraoxon.

Como já havia descrito na metodologia, foram realizados todos os experimentos foram realizados em triplicata e o objetivo foi determinar qual seria a melhor concentração de etil-paraoxon no processo inibitório da AChE, de forma que ela atingisse 100% de inibição sem excesso de organofosforado.

O gráfico da FIG. 4.3 mostra a curva de concentração do etil-paraoxon com as concentrações testadas e fica claro que a melhor concentração é a de $1\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, pois ela é a mínima e se aproxima dos 100 % de inibição da AChE. Este processo é feito em sangue total, antes da centrifugação com o tampão de lise, e a determinação da inibição já é realizada no “ghost”.

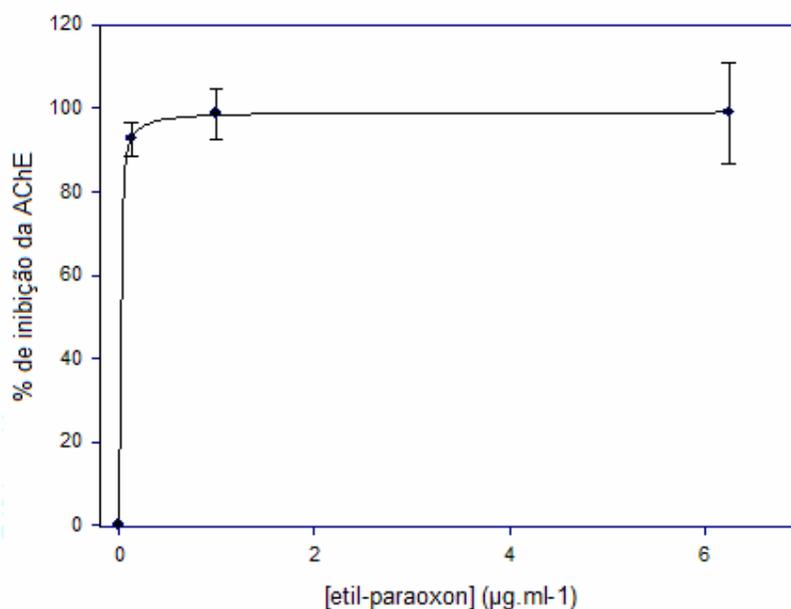


FIG. 4.3 – Efeito do etil-paraoxon sobre a atividade AChE (*in vitro*).

Ao realizar os experimentos com o etil-paraoxon, com o objetivo de se chegar numa boa reprodutibilidade, foram realizados paralelamente experimentos com um outro organofosforado, o clorpirifós-oxon (metabólito ativo do clorpirifós, FIG. 4.4) com o objetivo de comparar com os resultados do etil-paraoxon e verificar qual deles seria melhor nos ensaios biológicos da reativação da AChE pelas oximas sintetizadas em laboratório.

O clorpirifós-oxon que é a forma metabolizada do clorpirifós (FIG. 4.4), e demonstrou que a concentração de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibe aproximadamente 100% do sistema enzimático (FIG. 4.5). Ambos organofosforados podem ser utilizados nos testes *in vitro* e em uma mesma concentração de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

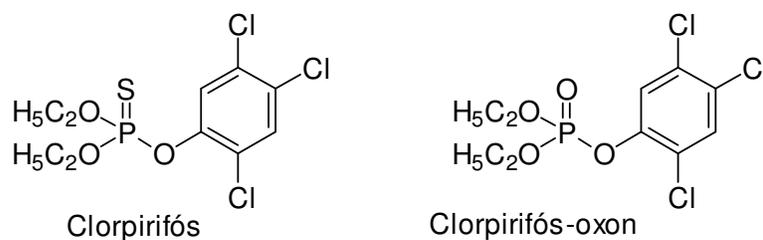


FIG. 4.4 – Estruturas do Clorpirifós e do Clorpirifós-oxon.

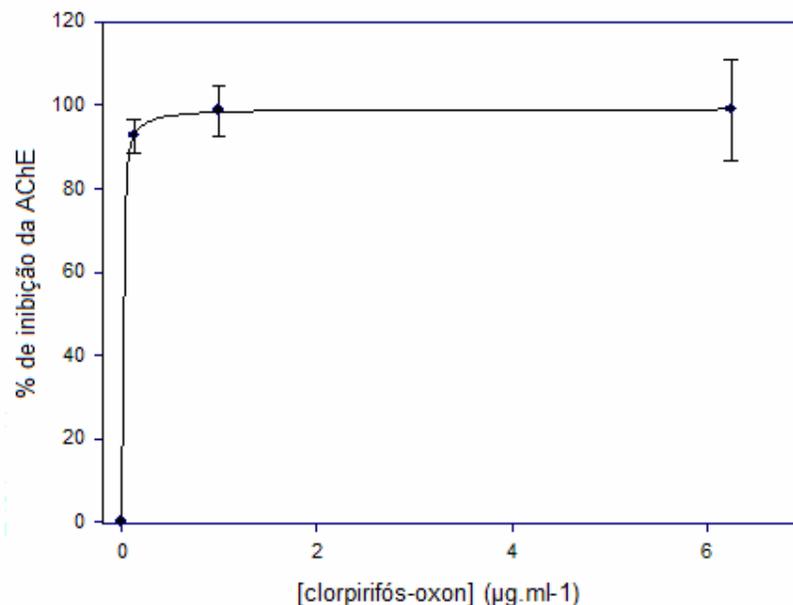


FIG. 4.5 – Efeito do clorpirifós-oxon sobre a atividade AChE (*in vitro*).

Como ambos obtiveram um resultado satisfatório, escolhemos, por conveniência, utilizar o etil-paraoxon (por serem mais relatados na literatura os testes com o etil-paraoxon), mas ambos obtiveram uma boa resposta na inibição da AChE.

4.2.3 - REATIVAÇÃO DA ACHE PELAS OXIMAS, TESTES *in vitro*

A reativação da AChE inibida por etil-paraoxon foi realizada pelo método descrito por Oliveira-Silva e colaboradores (2000). Após a contaminação com o etil-paraoxon, a primeira etapa, dos experimentos, consistiu em separar as hemácias do plasma para que não haja a interferência da butirilcolinesterase no momento da medida de reativação da acetilcolinesterase. A butirilcolinesterase está contida no plasma e a acetilcolinesterase no sangue, por isso que é feita esta separação. Em seguida foi realizada a lise das hemácias para que não haja interferência da hemoglobina na leitura do espectrofotômetro, obtendo-se a “proteína ghost”.

Experimentalmente, *in vitro*, foram preparados os tubos de análise contendo o tampão de análise e a “proteína ghost” contaminada com o etil-paraoxon. Foi realizado o tratamento com a oxima por 30 minutos. Após este tempo são adicionados o DTNB e o substrato (acetilticolina) e é iniciada a leitura dos dados pelo UV-Visível que foi realizada cineticamente a 412 nm.

No momento que a AChE inibida pelo etil-paraoxon é reativada, ela possui a capacidade de hidrolisar a acetilticolina, formando a tiocolina, que por sua vez reage com DTNB formando ácido tionitrobenzóico conforme o esquema da Figura 4.6.

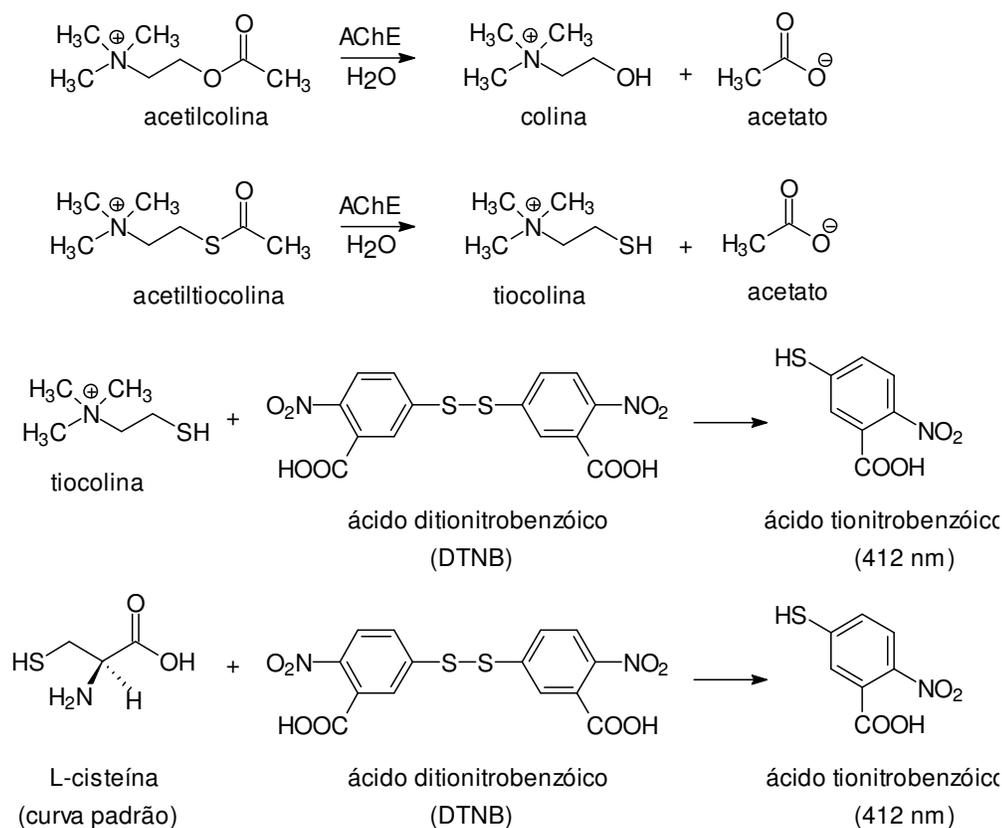


FIG. 4.6 - Esquema explicando porque a reação é monitorada por espectroscopia UV-Visível a 412

As atividades enzimáticas foram medidas cineticamente a $\lambda_{\text{máx}} = 412 \text{ nm}$ e corrigidas pela curva-padrão de L-cisteína que também reage com DTNB formando o ácido tionitrobenzóico (cada molécula de L-cisteína equivale estequiometricamente a uma molécula de tiocolina).

Foi realizada também a determinação da concentração da proteína “ghost” dos experimentos com o auxílio de uma curva padrão de albumina bovina (BSA), conforme foi descrito na metodologia. Estes ensaios foram determinados fotometricamente a $\lambda_{\text{máx}} = 660 \text{ nm}$, que é o comprimento de onda máximo de absorção da reação entre o reagente de Folin e os resíduos aromáticos da AChE.

Todas as oximas levaram a um processo de reativação da AChE conforme descreve a Tabela 4.37. Foram realizados também ensaios de reativação com a pralidoxima, antídoto mais usado nos casos de intoxicação, logo, foi usada como referência.

TAB. 4.37 - % de reativação da AChE, inibida por etil-paraoxon, pelas oximas sintetizadas e comparação com o efeito da pralidoxima (usada como referência).

Oxima (25 μM)	Reativação da AChE (%)
Pralidoximam (18)	83
2-tiofenoaldoxima (26)	93
3-nitrosalicilaldoxima (38)	62
5-nitrosalicilaldoxima (40)	58
1-metil-2-imidazoilaldoxima (34)	40
2-furfurilaldoxima (32)	38
<i>m</i> -aminobenzaldoxima (48)	38
2-piridinoaldoxima (28)	22
2-pirroilaldoxima (30)	21
4-metil-5-imidazoilaldoxima (36)	19
<i>o</i> -toluilaldoxima (44)	18
<i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima (46)	16
4-metoxi-benzaldoxima (42)	14

A oxima que obteve o resultado mais expressivo na reativação da AChE foi a 2-tiofenoaldoxima, o que motivou a fazer um estudo de suas interações e das

interações da pralidoxima com a AChE por técnicas de RMN (estes resultados foram apresentados no próximo item de discussões).

As oximas 3-nitro-salicilaldoxima e 5-nitro-salicilaldoxima também foram boas reativadoras mas não superaram a pralidoxima como a 2-tiofenoaldoxima.

A partir dos resultados da 3-nitro-salicilaldoxima e da 5-nitro-salicilaldoxima foi sintetizada a 4-nitro-benzaldoxima, com o objetivo de testar a sua capacidade reativadora na AChE inibida com o organofosforado e verificar se o grupo nitro-salicil é importante ou se somente o grupo nitro possui uma atividade potencial.

A 4-nitro-benzaldoxima quase não reativou a AChE inibida com etil-paraoxon e devido aos seus resultados terem sido muito próximo dos 100 % de inibição da AChE. Foi realizado um teste, variando-se estas concentrações, na perspectiva de que um aumento na concentração pudesse aumentar seu potencial como reativador da AChE (FIG. 4.7).

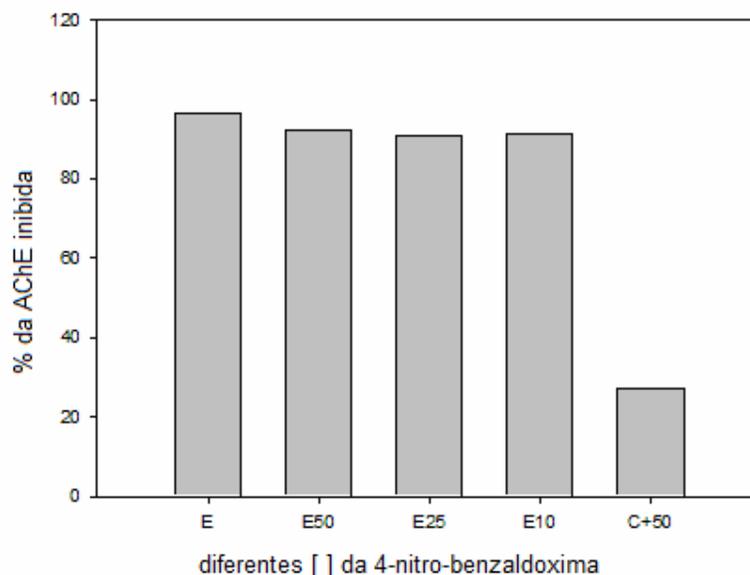


FIG. 4.7 – O efeito da concentração da 4-nitro-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

O gráfico da Figura 4.7 mostra uma comparação entre, a AChE totalmente inibida pelo etil-paraoxon (E); o tratamento da AChE inibida com a 4-nitro-benzaldoxima nas concentrações de 50 μM (E50), 25 μM (E25), 10 μM (E10); e a AChE controle (ou seja, sem inibição com o etil-paraoxon) com a 4-nitro-

benzaldoxima em uma concentração de 50 μM (C+50). Pelo gráfico, fica evidente o efeito inibidor da 4-nitro-benzaldoxima (31 % de inibição da AChE) e mostra também que o tratamento da AChE com a oxima não obteve um efeito relevante comparado com os resultados das outras oximas, descrito na Tabela 4.37.

Além da 4-nitro-benzaldoxima, foram testadas também outras oximas com grupamentos retiradores de elétrons: a 4-cloro-benzaldoxima e a 4-flúor-benzaldoxima mostrando-se como boas inibidoras da AChE e não reativadoras.

A 4-cloro-benzaldoxima também quase não reativou a AChE inibida com etil-paraoxon e devido aos seus resultados terem sido muito próximo dos 100 % de inibição da AChE, foi realizado um teste, variando-se estas concentrações, na perspectiva de que um aumento na concentração pudesse aumentar seu potencial como reativador da AChE (FIG. 4.8).

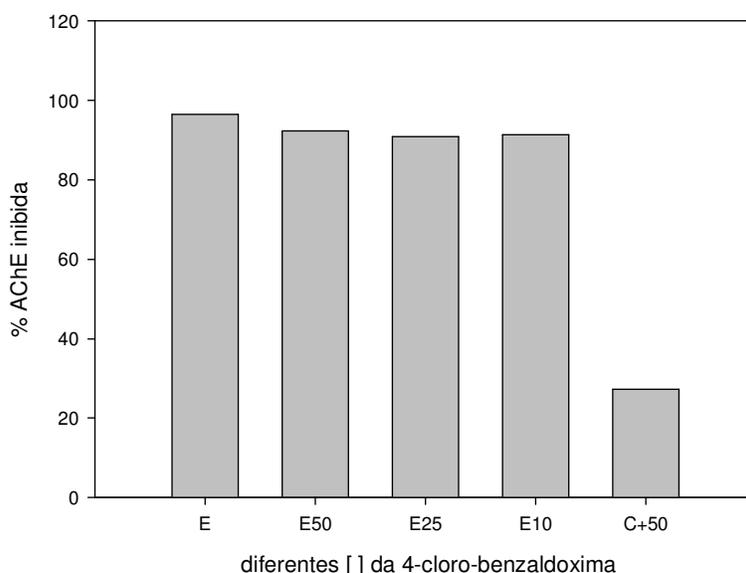


FIG. 4.8 – O efeito da concentração da 4-cloro-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

O gráfico da Figura 4.8 mostra uma comparação entre, a AChE totalmente inibida pelo etil-paraoxon (E); o tratamento da AChE inibida com a 4-cloro-benzaldoxima nas concentrações de 50 μM (E50), 25 μM (E25), 10 μM (E10); e a AChE controle (ou seja, sem inibição com o etil-paraoxon) com a 4-cloro-benzaldoxima em uma concentração de 50 μM (C+50). Pelo gráfico, fica evidente o

efeito inibidor da 4-cloro-benzaldoxima (29 % de inibição da AChE) e mostra também que o tratamento da AChE com a oxima não obteve um efeito relevante comparado com os resultados das outras oximas, descrito na Tabela 4.37.

A 4-flúor-benzaldoxima também quase não reativou a AChE inibida com etil-paraoxon e devido aos seus resultados terem sido muito próximo dos 100 % de inibição da AChE, foi realizado um teste, variando-se estas concentrações, na perspectiva de que um aumento na concentração pudesse aumentar seu potencial como reativador da AChE (FIG. 4.9).

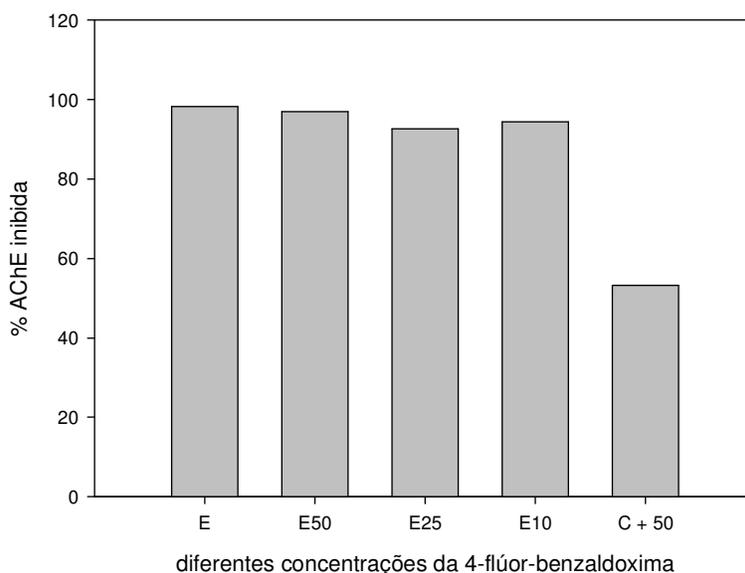


FIG. 4.9 - O efeito da concentração da 4-flúor-benzaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

O gráfico da Figura 4.9 mostra uma comparação entre, a AChE totalmente inibida pelo etil-paraoxon (E); o tratamento da AChE inibida com a 4-flúor-benzaldoxima nas concentrações de 50 μ M (E50), 25 μ M (E25), 10 μ M (E10); e a AChE controle (ou seja, sem inibição com o etil-paraoxon) com a 4-flúor-benzaldoxima em uma concentração de 50 μ M (C+50). Pelo gráfico, fica evidente o efeito inibidor da 4-flúor-benzaldoxima (53 % de inibição da AChE) sendo ainda maior que a da 4-cloro-benzaldoxima e mostra também que o tratamento da AChE com a oxima não obteve um efeito relevante comparado com os resultados das outras oximas, descrito na Tabela 4.37.

Pelos ensaios biológicos realizados com a 4-nitro-benzaldoxima, 4-cloro-benzaldoxima e 4-flúor-benzaldoxima, foi mostrado que este tipo de grupamentos eletroatratores na posição *para* em anéis aromáticos das benzaldoximas não são importantes para fazer a reativação da AChE, sendo, pelo contrário, inibidores desta enzima. Estes resultados não são completamente negativos, pois indicam que compostos deste tipo poderiam ser utilizados no tratamento de certas doenças onde a inibição parcial da AChE é importante, como o mal de Alzheimer, por exemplo. Ainda, inibidores fracos e reversíveis da AChE servem como protetores desta enzima na presença de organofosforados neurotóxicos, pois evitam ou diminuem o efeito desses compostos.

Por último, foram sintetizadas a tereftaldoxima e a isoftaldoxima, para fazer um estudo de comparação entre oximas neutras e dioximas neutras. Pelas curvas de concentração (FIG. 4.10 e FIG. 4.11) foi verificado que elas não possuem boa capacidade na reativação da AChE inibida por etil-paraoxon e quando testadas diretamente na AChE mostraram uma pequena capacidade de inibição.

O gráfico da Figura 4.10 mostra uma comparação entre, a AChE totalmente inibida pelo etil-paraoxon (E); o tratamento da AChE inibida com a isoftaldoxima nas concentrações de 50 μM (E50), 25 μM (E25), 10 μM (E10); e a AChE controle (ou seja, sem inibição com o etil-paraoxon) com isoftaldoxima em uma concentração de 50 μM (C+50). O gráfico mostra um pequeno efeito inibidor da isoftaldoxima (17 % de inibição da AChE) sendo menor comparado com a 4-nitro-benzaldoxima, 4-cloro-benzaldoxima e 4-flúor-benzaldoxima e mostra também que o tratamento da AChE com a oxima não obteve um efeito relevante comparado com os resultados das outras oximas, descrito na Tabela 4.37.

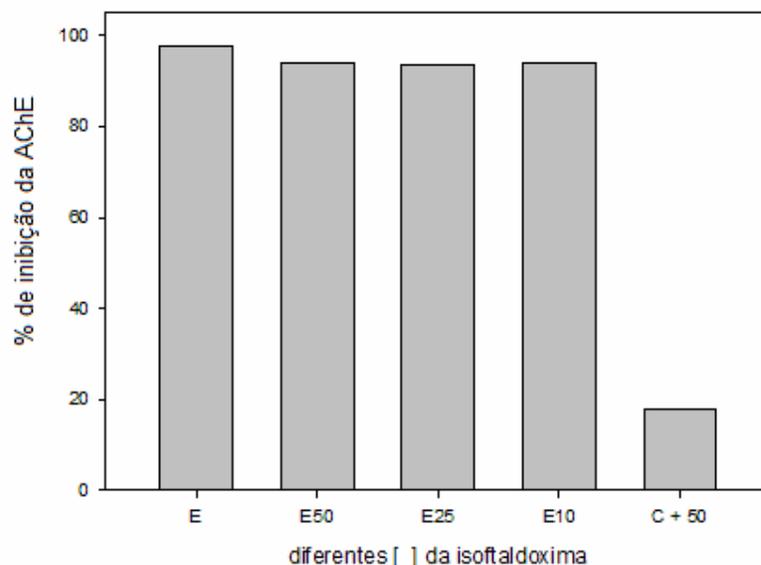


FIG. 4.10 – O efeito da concentração da isoftaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

O gráfico da Figura 4.11 mostra uma comparação entre, a AChE totalmente inibida pelo etil-paraoxon (E); o tratamento da AChE inibida com a tereftaldoxima nas concentrações de 50 μ M (E50), 25 μ M (E25), 10 μ M (E10); e a AChE controle (ou seja, sem inibição com o etil-paraoxon) com tereftaldoxima em uma concentração de 50 μ M (C+50). O gráfico mostra um pequeno efeito inibidor da tereftaldoxima (10 % de inibição da AChE) sendo o menor quando comparado com a isoftaldoxima, e não foi detectado nenhum efeito relevante de reativação da AChE inibida com etil-paraoxon quando comparado com os resultados das outras oximas descritos na Tabela 4.37.

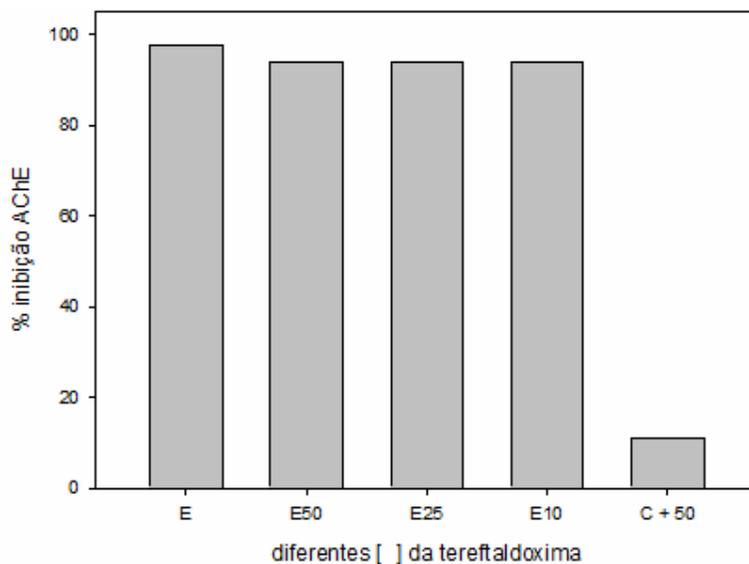


FIG. 4.11 - O efeito da concentração da tereftaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

Em paralelo foram realizadas também as variações das concentrações da 2-tiofenoaldoxima e da pralidoxima, por serem as duas oximas testadas que obtiveram os melhores resultados na reativação da AChE inibida por etil-paraoxon (FIG. 4.12 e FIG. 4.13).

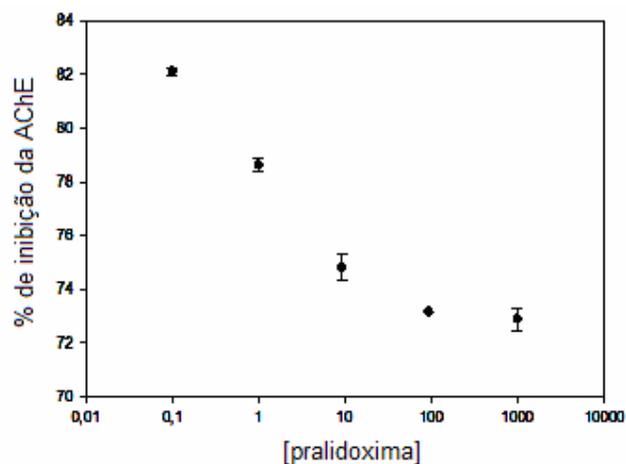


FIG. 4.12 – O efeito da concentração da pralidoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon.

O gráfico da Figura 4.12 mostra que a pralidoxima, em uma concentração de 1000 nM mantém a AChE inibida em 73%.

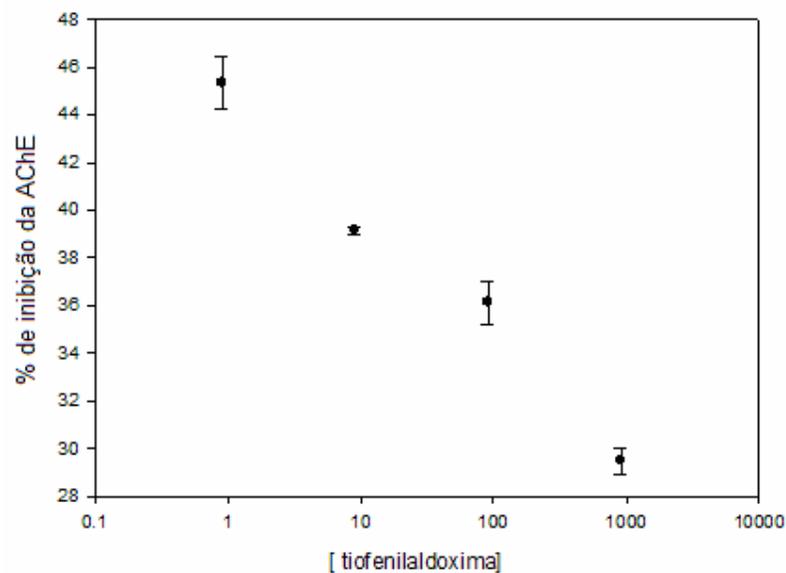


FIG. 4.13 – O efeito da concentração da 2-tiofenoaldoxima na reativação da AChE inibida com etil-paraoxon

O gráfico da Figura 4.13 mostra que a 2-tiofenoaldoxima, em uma concentração de 1000 nM, mantém a AChE inibida 29 %.

A partir destes resultados buscou-se fazer outras análises para poder explicar melhor como estas oximas sintetizadas interagem com a AChE e promovem a sua reativação.

Um das análises foi a predição *in silico* da barreira hematoencefálica (TAB. 4.38).

TAB. 4.38 – Predição *in silico* da permeação das oximas pela barreira hematoencefálica.

Oximas	$\log[\text{Oxima}_{\text{cérebro}}]/[\text{Oxima}_{\text{sangue}}]$ (+/- 0,031)
1-metil-2-imidazolialdoxima (34)	0,052
2-piridinoaldoxima (28)	-0,4
3-nitro-salicilaldoxima (38)	0,353
4-cloro-benzaldoxima (50)	0,557
4-fluor-benzaldoxima (52)	0,42
4-metil-5-imidazoilaldoxima (36)	-0,305
2-tiofenoaldoxima (26)	0,094
5-nitro-salicilaldoxima (40)	0,333
isoftaldoxima (56)	0,408
<i>m</i> -aminobenzaldoxima (48)	0,33
<i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -aminobenzaldoxima (46)	0,783
<i>o</i> -toluilaldoxima (44)	0,293
Pralidoxima (18)	-0,027
tereftaldoxima (54)	0,411
2-furfurilaldoxima (32)	0,027
2-pirroilaldoxima (30)	-0,357

Na tentativa de explicar a capacidade das oximas chegarem a AChE foram realizadas as análises *in silico* de permeabilidade da barreira hematoencefálica, que consiste na seguinte interpretação: Se for igual a zero quer dizer que 50% do composto pode estar concentrado no sangue e 50% no cérebro. Se o valor da predição for igual a 2 quer dizer que 100% do composto pode estar no cérebro e se for igual a -2, 100% pode estar no sangue (MODA, 2008).

Então os valores intermediários são interpretados da seguinte forma: 1 como boa capacidade de permear a barreira e -1 como baixa capacidade de permear a barreira hematoencefálica. O valor da tabela (+/- 0,031) é o erro associado à predição (MODA, 2008)

Um detalhe importante é que todos os valores presentes são para a permeabilidade em ratos. Não há dados quantitativos suficientes na literatura para a modelagem desta propriedade em humanos.

Segundo os resultados da predição, nenhuma oxima neutra sintetizada possui valor próximo de -1, o que indica que todos esses compostos têm uma boa capacidade de permeação da barreira hematoencefálica.

O programa de predição *in silico* da barreira hematoencefálica foi criado pelo aluno de Doutorado Tiago Moda do Grupo de Química Medicinal do Instituto de Física da USP de São Carlos coordenado pelo professor Adriano Andricopulo, e está para ser patenteadado, logo, não houve disponibilização para o acesso ao programa e explicação da sua forma de funcionamento.

Antes de fazer este experimento nós desenhamos e otimizamos todas as oximas pelo método semi-empírico, PM3 que foram salvos em arquivo de saída mol2. Estas otimizações foram feitas no programa GAUSSIAN (FRISCH, 1998) e foram utilizadas por Tiago Moda para a realização da predição *in silico* da permeação das oximas pela barreira hematoencefálica.

4.3 - INTERAÇÕES DAS OXIMAS COM BSA E AChE MEDIDAS POR EXPERIMENTOS DE RMN

4.3.1 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS TEMPOS DE RELAXAÇÃO T_1 POR RMN

Na literatura existem vários estudos que determinam a interação de pequenas moléculas com proteínas que são de extrema utilidade, principalmente no que diz respeito ao aperfeiçoamento do mecanismo de ação e transporte de fármacos (OLIVEIRA, 2002; GAGGELLI, 1994).

Os antídotos usados para intoxicação com organofosforados são as oximas, que atuam como reativadores da acetilcolinesterase (AChE) através da desfosforilação do resíduo Ser203 (DE CASTRO, 2002). Porém, não existe nenhuma oxima que seja eficiente como antídoto contra todos os organofosforados o que nos motivou a fazer um estudo de viabilidade de transporte como um fármaco.

Alguns dos compostos sintetizados neste trabalho mostraram boa atividade na reativação de AChE inibida com etil-paraoxon (TAB. 4.37, página 125), com valores próximos ao da pralidoxima. Para determinar a possibilidade de uso destes potenciais antídotos por administração intravenosa foi necessário determinar sua afinidade pelas proteínas plasmáticas, sendo esta informação importante para determinar a biodisponibilidade destes compostos.

A ligação de fármacos aos constituintes do soro envolve principalmente a interação com a albumina. A interação com albumina é importante, pois define se os compostos podem ser transportados por esta proteína, facilitando sua distribuição pelo organismo. Por outro lado, se a interação for muito forte, os compostos podem simplesmente permanecer ligados a albumina e ficarem indisponíveis para atuar como fármacos. Por este motivo, o estudo de interação de compostos com albumina é muito importante.

Barbituratos, benzodiazepínicos, penicilinas, fenilbutazonas, estreptomicinas, sulfonamidas e tetraciclina são exemplos de fármacos que se ligam favoravelmente à albumina.

A possibilidade de usar a RMN, como uma excelente ferramenta para determinar a afinidade dos compostos com biomoléculas e as posições de melhor interação

entre um determinado fármaco e as biomoléculas, está comprovada na literatura (OLIVEIRA, 2002). Para interação com proteínas plasmáticas este tipo de estudo é realizado com a albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin-BSA*) e albumina de soro humano (*Human Serum Albumin-HSA*) através da determinação de tempos de relaxação.

A albumina é a principal proteína do plasma sanguíneo (50%) e tem como principal função o transporte de proteínas específicas e compostos catiônicos (GARRET, 1995). Devido a grande facilidade com que estas proteínas reagem com fármacos elas têm sido utilizadas freqüentemente em modelos de investigação para ligação de fármacos e proteínas.

A BSA tem peso molecular de 69.000 g/mol e no seu ponto isoelétrico (pI 5), apresenta 100 cargas negativas e positivas. Em pH 7,4 apresenta um número um pouco maior de cargas negativas, mas ainda é capaz de formar ligações com cátions e ânions.



FIG. 4.14 – Estrutura da albumina humana.

As interações da albumina com os fármacos são através de processos eletrostáticos, lipofílicos e ligações hidrogênio. O número de sítios ligantes para as moléculas de fármaco na albumina é, geralmente, muito menor que o número total de grupos carregados. Sendo que a ligação depende fortemente da estrutura molecular do fármaco.

No processo de desenvolvimento de protótipos candidatos a fármacos é importante caracterizar a ligação destes compostos com albumina, pois uma ligação forte pode reduzir sua biodisponibilidade ou aumentar seu tempo de meia vida. A

albumina pode se ligar a muitos fármacos facilitando seu transporte através do sistema circulatório (KRAGH-HANSEN, 2002).

Primeiro foi feito o assinalamento dos espectros de RMN das oximas, seguido da determinação dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da oxima pura e na presença da BSA.

Os estudos das interações intermoleculares oxima-BSA mostraram que houve um decréscimo considerável nos tempos de relaxação T_1 em todos os hidrogênios de cada oxima, indicando que estas interagem com a BSA (TAB. 4.39 a 4.50). Em quase todas as oximas, as mudanças mais acentuadas para os valores de T_1 ocorreram principalmente no hidrogênio aldoxímico (H-C=NOH). Indicando que a interação com a BSA ocorre nesta região da molécula do ligante.

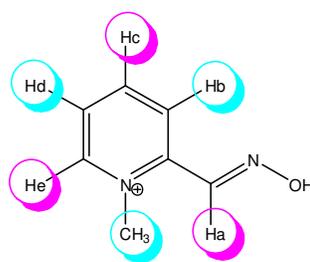
As oximas: 3-nitrosalicilaldoxima, 5-nitrosalicilaldoxima e a 2-tiofenoaldoxima forneceram os melhores resultados de ativação da AChE e também mostraram possuir uma menor afinidade pela BSA que a pralidoxima, o que indica que estes compostos possuem uma excelente disponibilidade para exercer sua atividade no plasma sanguíneo, sendo transportadas mas não retidas pela albumina.

A variação de T_1 foi determinada por diferença entre os valores de T_1 para a oxima com BSA e pura ($\Delta T_1 = T_{1\text{ligante+BSA}} - T_{1\text{ligante}}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em temperatura ambiente, e foram calculadas as médias dos valores de T_1 . Os valores mais acentuados de ΔT_1 dos hidrogênios de cada oxima estão marcados em rosa e os menores valores estão marcados em azul.

A pralidoxima, por ser uma molécula catiônica, apresentou uma grande interação com a BSA, que tem afinidade especial por moléculas protonadas ou com cargas positivas (TAB. 4.39). Os hidrogênios que indicaram maior intensidade foram Ha, Hc e He, porém o mais modificado foi Ha, confirmando que a interação mais importante com a BSA é via o grupo oxima. De qualquer forma é difícil explicar porque a maior interação de T_1 foi em três hidrogênios alternados.

TAB. 4.39 – Medidas de T_1 (s) por RMN da pralidoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	4,56	1,72	- 2,84
Hb	4,52	3,15	- 1,37
Hc	3,88	1,64	- 2,24
Hd	4,14	2,58	- 1,56
He	3,44	1,77	- 1,67
CH ₃	2,14	0,81	- 1,33

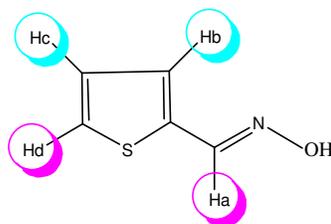


Pralidoxima

Inesperadamente na 2-tiofenoaldoxima o hidrogênio que mais interagiu com a BSA foi o Hd e não o hidrogênio vinílico do grupamento aldoxima (TAB. 4.40), diferentemente da pralidoxima. Este resultado parece sugerir que o átomo de enxofre está fortemente envolvido no processo de interação com a BSA. Fazendo uma comparação geral com todos os hidrogênios da pralidoxima (TAB. 4.39), os hidrogênios da 2-tiofenoaldoxima apresentam claramente menos afinidade sendo sugerido como uma oxima mais viável e com melhor disponibilidade para exercer sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.40 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 2-tiofenoaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	3,17	2,27	- 0,90
Hb	2,52	2,27	- 0,26
Hc	3,00	2,33	- 0,69
Hd	5,19	2,38	- 2,81

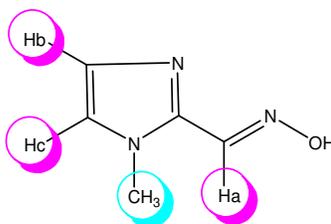


2-tiofenoaldoxima.

As maiores interações das medidas de T_1 da 1-metil-2-imidazoilaldoxima foram os hidrogênios Ha do grupamento aldoxima e os hidrogênios Hb e Hc que pertencem ao anel imidazol. Observou-se também uma diferença mínima entre o T_1 do hidrogênio Ha (-2,15) e o T_1 do hidrogênio Hb (-2,19) (TAB. 4.41). Analisando todas as interações dos hidrogênios desta molécula pode-se sugerir que ela interage fortemente com a BSA, não sendo muito viável, comparada com as interações dos hidrogênios da 2-tiofenoaldoxima.

TAB. 4.41 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 1-metil-2-imidazoilaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	2,73	0,58	- 2,15
Hb	2,63	0,43	- 2,19
Hc	2,57	0,74	- 1,83
CH ₃	1,09	1,21	0,12

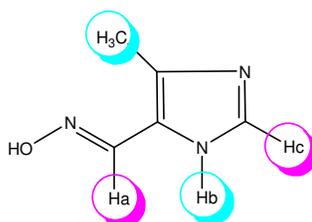


1-metil-2-imidazoilaldoxima

A 4-metil-5-imidazoilaldoxima obteve as maiores medidas de T_1 no hidrogênio Ha do grupamento aldoxima e no hidrogênio Hc que fica ligado no carbono entre os dois nitrogênios do anel imidazol (TAB. 4.42). Os seus hidrogênios interagiram menos com a BSA dos que os hidrogênios da 1-metil-2-imidazoilaldoxima, com exceção dos hidrogênios do grupo metílico, nestes, houve apenas uma diferença muito pequena no T_1 . Foi observado também que os hidrogênios das moléculas 1-metil-2-imidazoilaldoxima e 4-metil-5-imidazoilaldoxima possuem valores de medidas de T_1 consideravelmente maiores dos os hidrogênios da 2-tiofenoaldoxima o que sugere que o grupo imidazol interage mais com a BSA do que o grupo tiofeno.

TAB. 4.42 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 4-metil-5-imidazoilaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	2,71	1,24	- 1,47
Hb	2,12	1,85	- 0,27
Hc	2,84	1,61	- 1,24
CH3	1,20	0,93	- 0,27

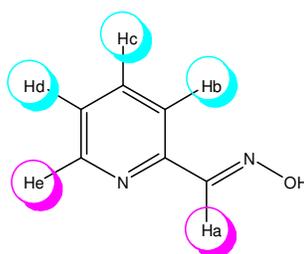


4-metil-5-imidazoilaldoxima

Na 2-piridinoaldoxima o hidrogênio que mais interagiu com a BSA foi o hidrogênio aldoxímico (Ha). Os outros hidrogênios da molécula mostraram interações muito fracas comparadas com Ha. O hidrogênio He teve uma interação um pouco maior que os outros hidrogênios ligados ao anel, que pode ser devido a ele estar mais próximo do nitrogênio (TAB. 4.43). As interações desta molécula, de uma forma geral, foram mais fracas que as interações das moléculas dos anéis imidazóis, porém mais fortes do que a 2-tiofenoaldoxima.

TAB. 4.43 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 2-piridinoaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	4,37	2,67	- 1,68
Hb	2,42	2,26	- 0,17
Hc	2,31	2,28	- 0,03
Hd	2,60	2,25	- 0,35
He	2,80	2,06	- 0,74

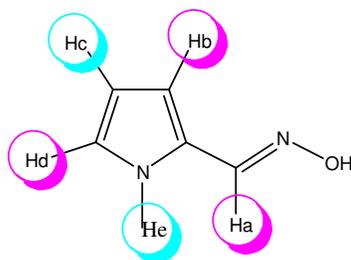


2-piridinoaldoxima

Na 2-piridinoaldoxima o hidrogênio aldoxímico Ha indicou uma interação com a BSA mais intensa do que os outros hidrogênios da molécula. Além dele, os hidrogênios Hd e He também indicaram mais interação comparados aos hidrogênios Hb e Hc (TAB. 4.44). De qualquer forma, assim como ocorreu com os hidrogênios da pralidoxima, é difícil explicar porque a maior interação de T_1 foi nos hidrogênios alternados.

TAB. 4.44 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 2-piridinoaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	4,65	2,25	- 2,40
Hb	2,13	1,87	- 0,26
Hc	1,16	0,75	- 0,44
Hd	2,77	1,40	- 1,37
He	2,62	1,37	- 1,25

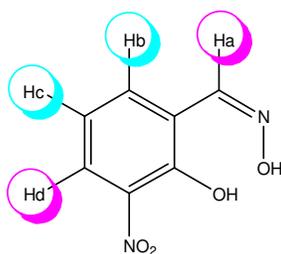


2-pirroilaldoxima

O hidrogênio aldoxímico (Ha) e o hidrogênio Hd da 3-nitro-salicilaldoxima indicaram maior interação comparados aos outros hidrogênios da molécula, mais em uma análise geral deste composto todos os hidrogênios interagiram fracamente com a BSA (TAB. 4.45). A interação maior do Hd em relação aos outros hidrogênios do anel aromático pode ser porque ele está mais próximo no grupamento nitro. Assim como a 2-tiofenoaldoxima, os hidrogênios da 3-nitro-salicilaldoxima apresentam claramente menos afinidade com a BSA, comparado aos resultados das outras oximas, sendo sugerido como uma oxima mais viável e com melhor disponibilidade para exercer sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.45 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 3-nitro-salicilaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	2,10	1,55	- 0,55
Hb	1,50	1,42	- 0,06
Hc	1,41	1,55	0,14
Hd	2,27	1,50	- 0,77

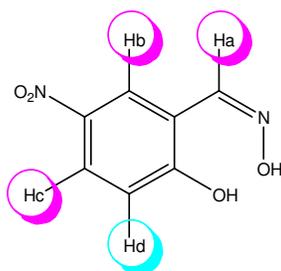


3-nitro-salicilaldoxima

Já os hidrogênios da 5-nitro-salicilaldoxima indicaram maiores interações, comparados aos da 3-nitro-salicilaldoxima, sendo o hidrogênio Hb do anel aromático e o hidrogênio aldoxímico (Ha) os que indicaram as maiores interações (TAB. 4.46). Da mesma forma que a 3-nitro-salicilaldoxima, o hidrogênio aromático que apresentou maior afinidade pela BSA foi o mais próximo do grupamento nitro (Hb). Inesperadamente o hidrogênio Hb interagiu mais com a BSA do que o Ha.

TAB. 4.46 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 5-nitro-salicilaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	2,17	0,85	-1,32
Hb	2,94	1,22	-1,72
Hc	1,97	0,84	-1,14
Hd	0,99	0,87	-0,12

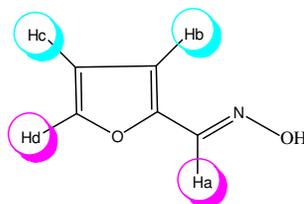


5-nitro-salicilaldoxima

De todas as oximas sintetizadas, a 2-furfurilaldoxima foi a que indicou a maior variação de T_1 , tanto em relação ao hidrogênio aldoxímico (Ha), quanto em relação ao hidrogênio aromático Hd (TAB. 4.47). Este resultado parece sugerir que o anel furfural está fortemente envolvido no processo de interação com a BSA, e sugere também que este tipo de composto, como oxima, não é viável e não possui uma boa disponibilidade para exercer a sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.47 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 2-furfuraldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	7,82	2,45	- 5,37
Hb	3,65	2,21	- 1,44
Hc	3,84	2,31	- 1,54
Hd	6,84	2,49	- 4,35

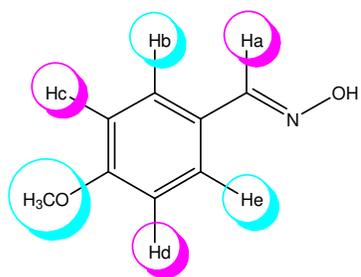


2-furfuraldoxima

Todos os hidrogênios da 4-metoxi-benzaldoxima indicaram fraca interação com a BSA (TAB. 4.48). O hidrogênio aldóxico (Ha) e os hidrogênios Hc e Hd indicaram maior variação de T_1 comparados com os hidrogênios Hb, He e OCH₃. De qualquer forma fica difícil explicar porque a maior interação de T_1 é em hidrogênios alternados no anel aromático. Como todos os hidrogênios deste composto apresentam interação fraca com a BSA, pode-se sugerir que a 4-metoxi-benzaldoxima possua uma boa disponibilidade para exercer a sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.48 – Medidas de T_1 (s) por RMN da 4-metoxi-benzaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	2,06	1,59	- 0,47
Hb	1,77	1,44	- 0,33
Hc	1,85	1,40	- 0,45
Hd	1,85	1,40	- 0,45
He	1,77	1,44	- 0,33
OCH ₃	1,37	0,97	- 0,40

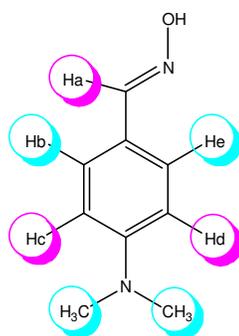


4-metoxi-benzaldoxima

Assim como a 4-metoxi-benzaldoxima, os hidrogênios da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima indicaram fraca interação com a BSA (TAB. 4.49). O hidrogênio aldoxímico (Ha) e os hidrogênios Hc e Hd indicaram maior variação de T_1 comparados com os hidrogênios Hb, He e as duas metilas ligadas ao nitrogênio. De qualquer forma é difícil explicar porque a maior interação de T_1 foi nos hidrogênios alternados no anel aromático. Como todos os hidrogênios deste composto apresentam interação fraca com a BSA, pode-se sugerir que a *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima possua uma boa disponibilidade para exercer a sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.49 – Medidas de T_1 (s) por RMN da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	1,60	1,25	- 0,35
Hb e He	0,83	0,93	0,11
Hc e Hd	1,32	0,95	- 0,37
2CH3	0,89	0,81	- 0,08

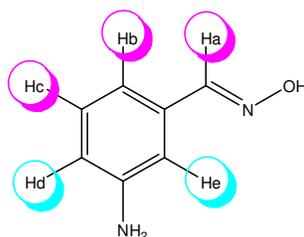


***N,N*-p-aminobenzaldoxima**

A *m*-aminobenzaldoxima indicou o hidrogênio aldoxímico (Ha) e os hidrogênios Hb e Hc como os que mais interagiram com a BSA (TAB. 4.50). Em uma análise geral deste composto, todos os hidrogênios apresentaram baixa variação de T_1 . Como todos os hidrogênios deste composto apresentam interação fraca com a BSA, pode-se sugerir que a *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima possua também uma boa disponibilidade para exercer a sua atividade no plasma sanguíneo.

TAB. 4.50 – Medidas de T_1 (s) por RMN da *m*-aminobenzaldoxima com BSA.

	T_1 -oxima	T_1 -oxima + BSA	ΔT_1
Ha	1,79	0,91	- 0,88
Hb	1,53	0,92	- 0,62
Hc	1,36	0,85	- 0,51
Hd	0,85	0,79	- 0,06
He	0,98	0,78	- 0,20



meta-aminobenzaldoxima

Não foram realizadas as medidas de T_1 das oximas: 4-cloro-benzaldoxima, 4-flúor-benzaldoxima, tereftaldoxima, isoftaldoxima e 4-nitro-benzaldoxima, estudos que deverão ser realizados no futuro próximo, quando os espectrômetros de RMN do IME sejam reativados.

4.3.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE DOSY (DIFFUSION-ORDERED SPECTROSCOPY) POR RMN

Paralelamente, a interação da pralidoxima e a 2-tiofenoaldoxima com a AChE foi estudada através da determinação dos valores de T_1 e dos coeficientes de difusão (TAB. 4.51, página 149), e foi indicado que a 2-tiofenoaldoxima tem uma maior afinidade pela AChE humana que a pralidoxima.

A variação de T_1 foi determinada pela diferença entre os valores de T_1 para a oxima com AChE e pura ($\Delta T_1 = T_{1\text{ligante+AChE}} - T_{1\text{ligante}}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em temperatura ambiente, e foram calculadas as médias dos valores de T_1 .

Foram calculados os valores das medidas de T_1 ligante-AChE por RMN, cujos ligantes foram a pralidoxima e a 2-tiofenoaldoxima. Os resultados indicaram expressivamente que a 2-tiofenoaldoxima obteve uma interação com a AChE mais forte que a pralidoxima (FIG. 4.15). Todos os hidrogênios da 2-tiofenoaldoxima indicaram valores de T_1 maiores, comparados aos hidrogênios da pralidoxima, merecendo destaque o hidrogênio vizinho ao enxofre do anel tiofeno. Podemos sugerir que, de alguma forma, a presença do anel com enxofre auxilia a interação oxima-AChE.

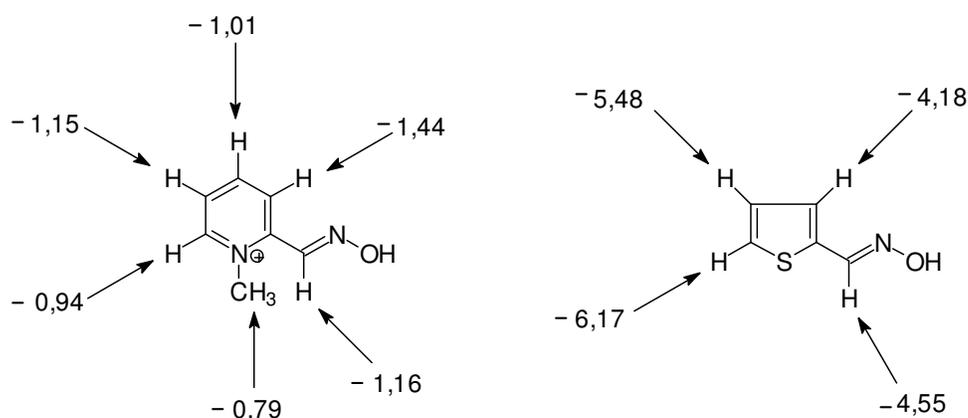


FIG. 4.15 – Medidas de T_1 da pralidoxima e da 2-tiofenoaldoxima com a AChE.

Os gráficos das Figuras 4.16 e 4.17 mostraram a variação da intensidade dos sinais da 2-PAM e da 2-tiofenoaldoxima em função do gradiente de campo magnético puras e na presença da AChE. Também são mostradas as variações da intensidade dos sinais da H₂O pura e H₂O com AChE em função do gradiente de campo magnético, dados estes que foram usados para encontrar os valores corrigidos do coeficiente de difusão.

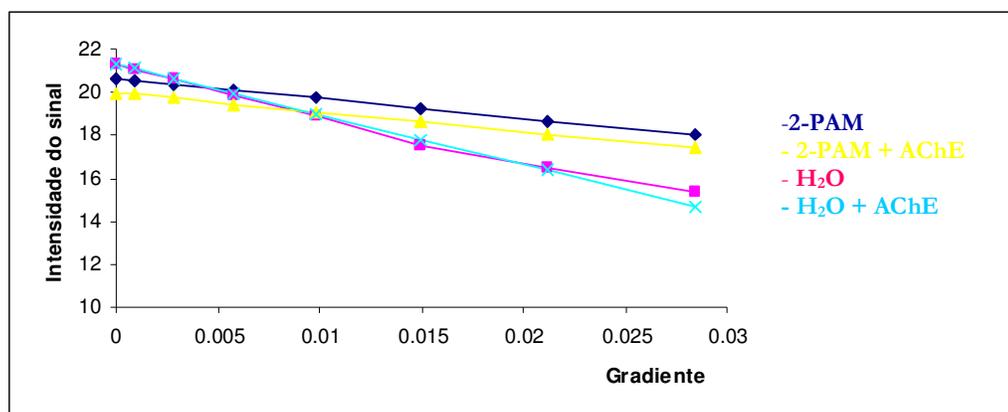


FIG. 4.16 – Curvas da determinação dos coeficientes de difusão da pralidoxima.

O gráfico da Figura 4.16 mostra a intensidade do sinal 2-PAM-AChE (linha amarela) próxima a 18, comparada a 2-PAM pura (linha azul) que está com a intensidade um pouco acima. O ligante (oxima) tende a diminuir a seu coeficiente de difusão ao estar ligado a uma proteína (AChE) e a intensidade do sinal tende a decrescer na medida em que se aumenta o gradiente do campo magnético. Quanto maior a interação entre o ligante e a proteína, menor é a intensidade do seu sinal em função da aplicação de um gradiente de campo magnético.

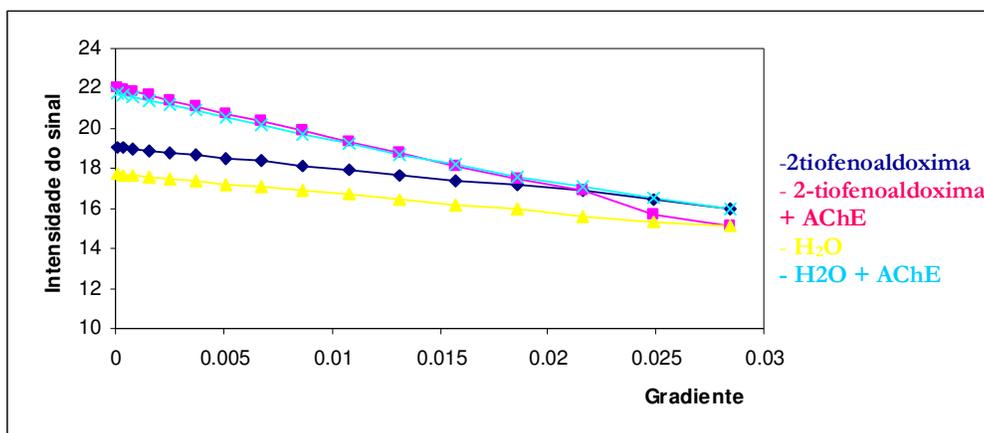


FIG. 4.17 – Curvas da determinação dos coeficientes de difusão da 2-tiofenoaldoxima.

O gráfico da Figura 4.17 mostra a intensidade do sinal 2-tiofenoaldoxima-AChE (linha rosa) entre 16 e 14, comparada a 2-tiofenoaldoxima pura (linha azul) que está com a intensidade um pouco acima. O ligante (oxima) tende a diminuir a sua velocidade translacional ao estar ligado a uma proteína (AChE) e a intensidade do sinal tende a decrescer na medida em que se aumenta o gradiente do campo magnético. Quanto maior a interação entre o ligante e a proteína, menor a intensidade do seu sinal em função da aplicação de um gradiente de campo magnético.

TAB. 4.51 - Resultados da variação de T_1 (s) e coeficiente de difusão na interação da pralidoxima e da 2-tiofenoaldoxima com AChE.

Item	pralidoxima	2-tiofenoaldoxima
ΔT_1	- 0,79 a - 1,44	- 4,18 a - 6,17
Dpura	$7,68 \times 10^{-10}$	$8,60 \times 10^{-10}$
D+AChE	$7,49 \times 10^{-10}$	$7,83 \times 10^{-10}$
ΔD	$0,19 \times 10^{-10}$	$0,77 \times 10^{-10}$
ΔD_{corr}	$0,19 \times 10^{-10}$	$0,45 \times 10^{-10}$

Na Tabela 4.51 é mostrada a diferença dos valores de T_1 , que indicam claramente uma maior afinidade da 2-tiofenoaldoxima pela AChE (-4,18 a -6,17) comparada com a pralidoxima (-0,79 a -1,44) e também experimento DOSY que mede a diferença dos valores do coeficiente de difusão confirmou a maior interação da 2-tiofenoaldoxima ($0,77 \times 10^{-10}$) comparada a pralidoxima ($0,19 \times 10^{-10}$).

Estes resultados estão plenamente de acordo com os resultados de reativação da AChE, onde a 2-tiofenoaldoxima é mais eficiente que a pralidoxima, que é o antídoto comumente usado da atualidade. Esses resultados também estão de acordo com os estudos de T_1 , onde a 2-tiofenoaldoxima interage mais fortemente com a AChE.

4.3.3 - EFEITO DAS INTERAÇÕES ENTRE A 2-TIOFENILALDOXIMA E PRALIDOXIMA SOBRE A AChE HUMANA POR RELAXAÇÃO SPIN-SPIN (T_2).

Neste experimento foram monitorados de forma qualitativa os alargamentos dos sinais e os deslocamentos químicos da pralidoxima (FIG. 4.18) e da 2-tiofenoaldoxima (FIG. 4.19) em presença da AChE.

O espectro de RMN ^1H da pralidoxima na presença da AChE mostra que houve um leve alargamento dos sinais e uma maior variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 3, 4 e 5 mostrando que eles interagem mais com a AChE (FIG. 4.18).

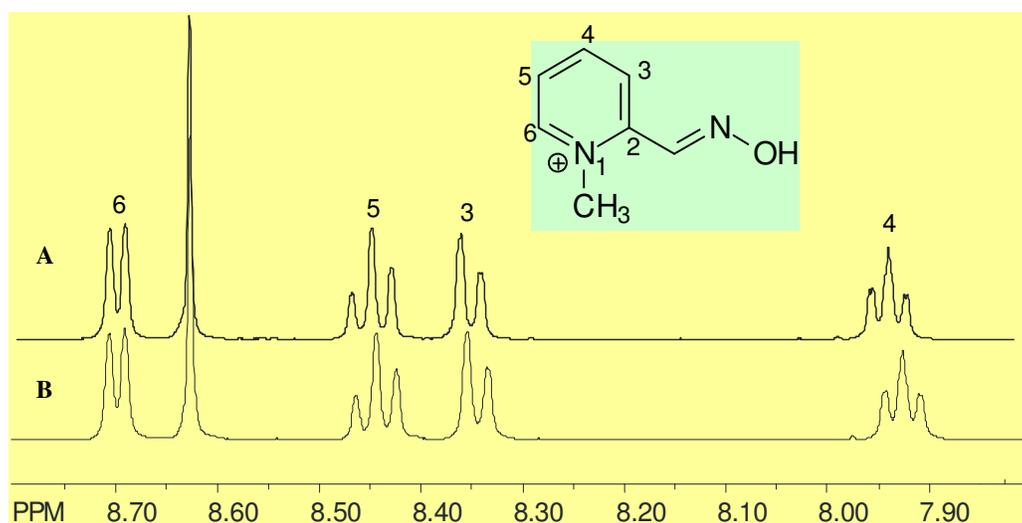


FIG. 4.18 – Espectro de RMN da relaxação spin-spin (T_2) da pralidoxima sem (A) e com (B) AChE.

Os alargamentos dos sinais de deslocamentos químicos do espectro de RMN da 2-tiofenoaldoxima são muito mais expressivos que os da pralidoxima, mostrando mais interações com a AChE humana. Todos os hidrogênios tiveram maior alargamento dos seus sinais e houve variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 3, 4 e 5 mostrando que estes hidrogênios interagem mais com a AChE (FIG. 4.19).

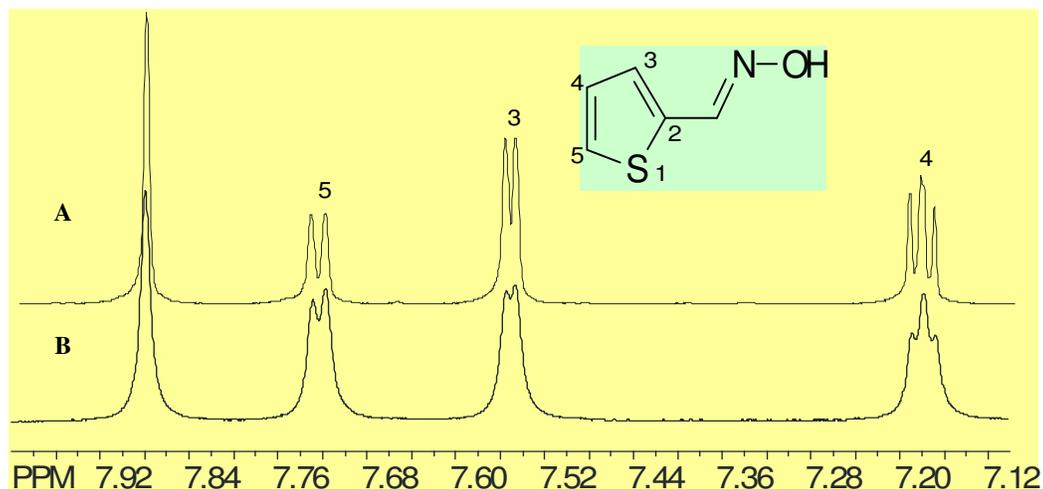


FIG. 4.19 – Espectro de RMN da relaxação spin-spin (T_2) da 2-tiofenoaldoxima sem (A) e com (B) AChE.

4.4 -RESULTADOS DE ANCORAGEM POR MODELAGEM MOLECULAR

Foram realizados os cálculos das energias de ancoragem das oximas que obtiveram os melhores resultados *in vitro* na reativação da AChE inibida por etilparaoxon. As oximas foram ancoradas na HuAChE inibida por tabun (GONÇALVES, 2006) usando-se o programa AUTODOCK IV.

As oximas foram desenhadas e otimizadas com o programa PRODRG (SCHUTTELKOPF, 2004). Para usar as oximas otimizadas no AUTODOCK IV foi preciso gerar um arquivo de extensão *.pdbq.

O AUTODOCK IV permite escolher os resíduos flexíveis da enzima. Foram escolhidos os resíduos His447, Glu334, Trp86 e Trp286. A próxima etapa foi criar um “grid”, região para ancoragem dos ligantes, que engloba os resíduos do sítio ativo da AChE. O volume do “grid” foi definido como $(48 \times 70 \times 60) \text{ \AA}^3$. Ao final deste processo, chamado de Auto-Grid, foi obtido um arquivo saída com extensão *.gpf

que foi utilizado pelo AUTODOCK IV para a execução da etapa de ancoragem molecular.

Para a definição dos parâmetros de ancoragem foi utilizado o Algoritmo Genético de Lamarchiano (*Lamarckian Genetic Algorithm* ou LGA) (MORRIS, 1998). Ao final desse processo foi criado o arquivo de extensão *.dpf que foi utilizado como arquivo entrada para esse processo pelo AUTODOCK IV.

As energias de ancoragem sugerem a pralidoxima como o melhor ligante, contudo, comparando-se com os resultados experimentais e teóricos usando inibidores diferentes, foram obtidos resultados diferentes para as respectivas oximas. Os valores das energias de ancoragem para elas foram muito similares não havendo uma diferença potencial entre estes ligantes (TAB. 4.52).

Pela ancoragem, a 2-tiofenoaldoxima possui mais conformações estáveis (6) dentro da garganta do sítio ativo da HuAChE (FIG. 4.20).

TAB. 4.52 - Cálculo das energias de ancoragem das oximas na HuAChE inibida por tabun.

Ligantes	Computacional	Biológico
	$E_{\text{ancoragem}}$ (kcal/mol)	% de reativação da AChE
Pralidoxima (18)	-13,49	83
2-tiofenoaldoxima (26)	-12,51	93
3-nitro-salicilaldoxima (38)	-11,03	62
5-nitro-salicilaldoxima (40)	-12,29	58
2-furfurilaldoxima (32)	-12,49	38
1-metil-2-imidazolaldoxima (34)	-12,61	40

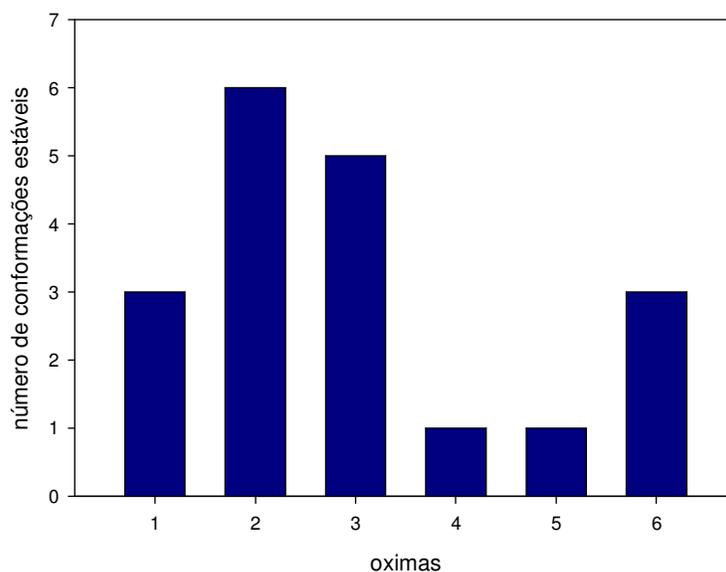


FIG. 4.20 - Número de conformações estáveis para cada oxima dentro do sítio ativo da HuAChE inibida por tabun.
 (legenda do gráfico: pralidoxima-1; 2-tiofenoaldoxima-2; 3-nitro-salicilaldoxima-3; 5-nitro-salicilaldoxima-4; 1-metil-2-imidazoilaldoxima-6).

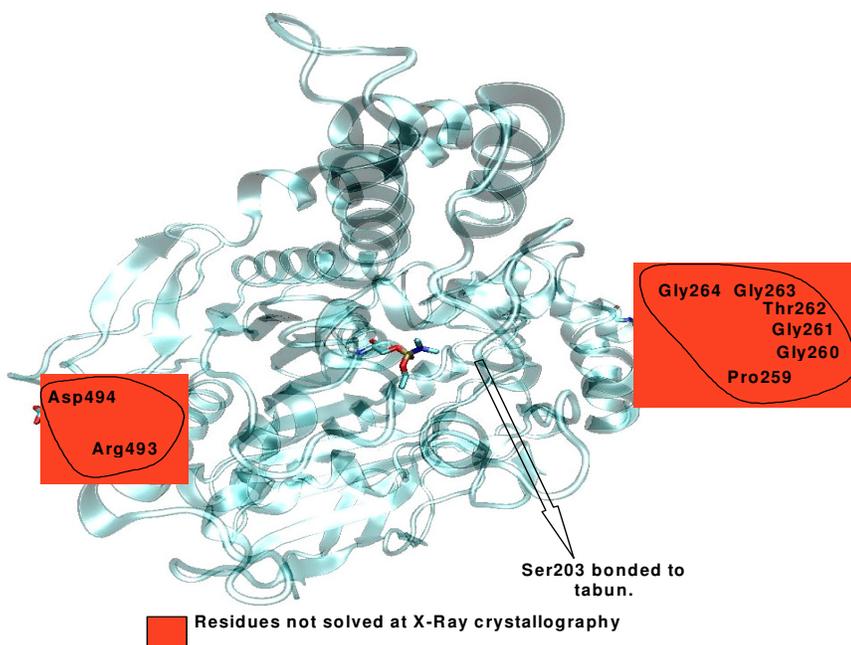


FIG. 4.21 - Modelo da HuAChE definido por homologia e usado para fazer as ancoragens (GONÇALVES, 2006).

A Figura 4.20 mostra que, apesar das energias de ancoragem serem muito semelhantes (TAB. 4.52), o número de conformações estáveis da 2-tiofenoaldoxima (6 conformações) é muito maior do que a da pralidoxima (3 conformações) sugerindo que a 2-tiofenoaldoxima fique mais estável na HuAChE. Ao se comparar com os ensaios biológicos, a 2-tiofenoaldoxima apresenta maior capacidade de reativação (93%) que a pralidoxima (83%). O *docking* ou ancoragem molecular é uma boa ferramenta que pode identificar oximas mais ativas, além de servir para fazer a comparação com os ensaios biológicos. Porém, neste experimento, os resultados de energia de ancoragem não permitiram fazer uma diferenciação entre as diversas oximas e não foram compatíveis com os resultados biológicos.

4.4.1 - ANCORAGEM DE ALGUMAS OXIMAS SINTETIZADAS NA HuAChE INIBIDA PELO AGENTE NEUROTÓXICO TABUN.

A pralidoxima ancorada no complexo HuAChE-tabun ficou um número menor de vezes mais próxima do organofosforado comparada com a 2-tiofenoaldoxima e com maior distância de ligação (4,1 Å) entre o oxigênio oxima (em vermelho) e o fósforo do tabun (em dourado) e apresentou energia de ancoragem de $-13,49 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (FIG. 4.22).

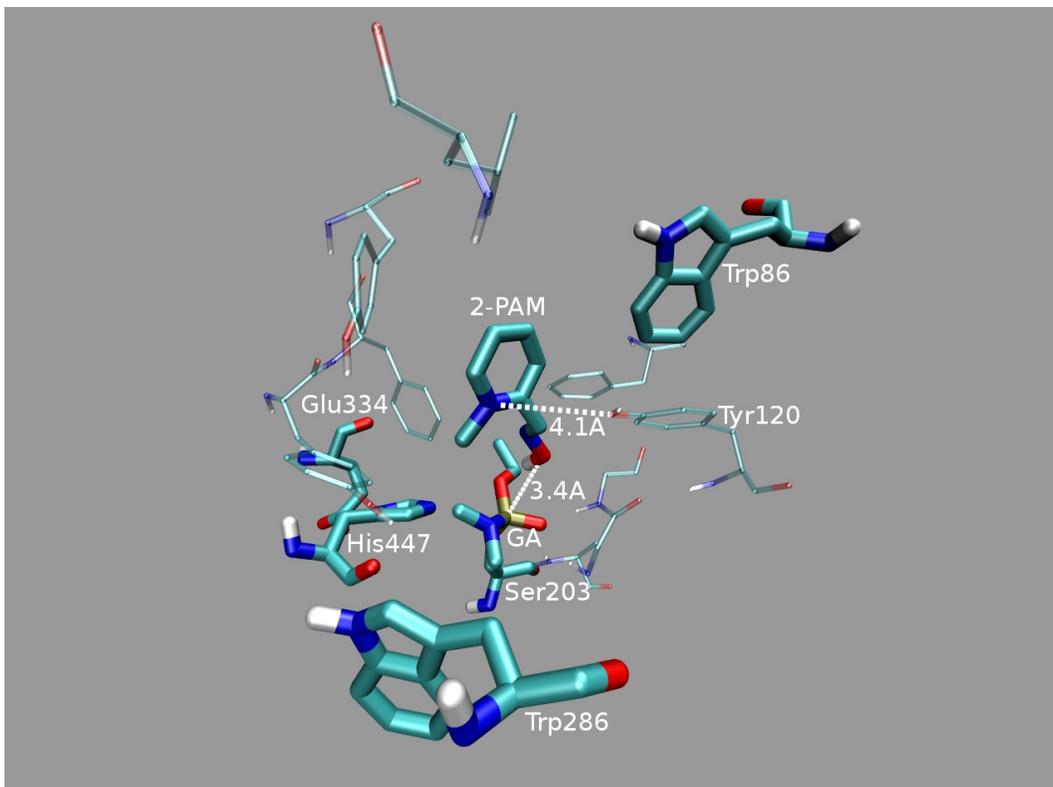


FIG. 4.22 - Ancoragem da pralidoxima em HuAChE-tabun.

A 2-tiofenoaldoxima ancorada no complexo HuAChE-tabun ficou um número maior de vezes mais próxima do organofosforado e com menor distância de ligação (3,3 Å) entre o oxigênio oxima (em vermelho) e o fósforo do tabun (em dourado) e apresentou energia de ancoragem de $-12,51 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (FIG. 4.23).

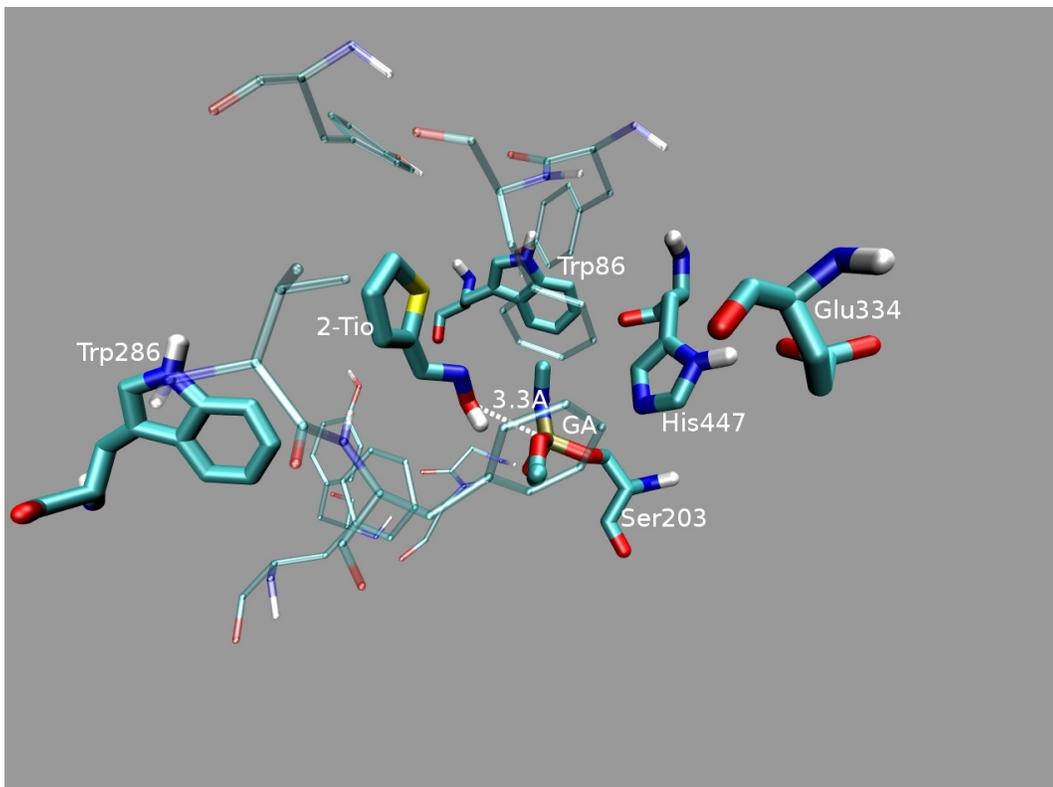


FIG. 4.23 - Ancoragem da 2-tiofenoaldoxima em HuAChE-tabun.

Ao comparar os resultados de ancoragem molecular de ambas as oximas, a 2-tiofenoaldoxima ficou um maior número de vezes mais próxima do organofosforado e com menor distância de ligação entre o oxigênio da oxima e o fósforo do tabun (FIG. 4.23) que sugere uma maior probabilidade de reação de desforilação da AChE, mesmo a 2-tiofenoaldoxima possuindo maior energia de ancoragem ($-12,51 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) comparada com a pralidoxima ($-13,49 \text{ Kcal.mol}^{-1}$), estes valores são muito similares.

5 - CONCLUSÕES DA TESE

A síntese de potenciais oximas como reativadoras da AChE inibida por etil-paraoxon obtiveram rendimentos maiores (90- 95% em 10 minutos) pelo método do micro-ondas, desenvolvido nesta tese, comparado ao método convencional (80-85%, 24 horas).

A 2-tiofenoaldoxima, sintetizada em laboratório, reativou a AChE inibida por etil-paraoxon de maneira mais expressiva (93 % de reativação) que a 2-PAM (83 %) (antídoto usado como referência).

Nem todas as oximas sintetizadas conseguiram reverter a inibição da AChE humana por etil-paraoxon, mas algumas outras tiveram uma performance aceitável, que indica que oximas neutras podem funcionar como antídotos para intoxicação com organofosforados neurotóxicos.

Os estudos de interação oxima-AChE por RMN (T_1 , T_2 e DOSY) indicaram claramente que a 2-tiofenoaldoxima interagiu com mais afinidade com a AChE que a pralidoxima, estando de acordo com os resultados *in vitro* de atividade biológica.

As oximas mais ativas também mostraram baixa afinidade pela BSA e este estudo sugere que elas podem ser transportadas pela albumina mas sem ficarem retidas no sangue, tendo assim capacidade para atingir os seus alvos (AChE).

O resultado mais importante deste trabalho foi demonstrar que as oximas neutras podem funcionar como reativadores da AChE, onde a 2-tiofenoaldoxima é 12% mais eficiente que a pralidoxima, que é o antídoto mas usado na atualidade.

Os estudos de ancoragem molecular das oximas com AChE mostraram que a 2-tiofenoaldoxima obteve mais conformações estáveis e energia de ancoragem com a AChE inibida com tabun levemente maior que a pralidoxima.

Estes resultados darão continuidade ao Projeto de Defesa Química para o planejamento e síntese de novas séries de oximas bioativas, visando a obtenção de antídotos mais eficientes para intoxicação com os organofosforados neurotóxicos.

6 – PERSPECTIVAS E SUGESTÕES

Como perspectivas do presente trabalho seria interessante fazer as dinâmicas moleculares para complementar o estudo preliminar de *docking* das oximas ancoradas no complexo HuAChE-tabun e fazer uma sugestão de síntese de oximas a partir destes resultados.

Uma outra perspectiva é dar continuidade à tentativa de fazer a cinética de estudo de desfosforilação da HuAChE com as oximas sintetizadas.

Para dar continuidade a este trabalho seria interessante também sintetizar uma série de novas oximas projetadas em função dos resultados experimentais obtidos neste trabalho e testá-las seguindo o protocolo de ensaios biológicos que foi confeccionado nesta Tese.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTALEK, B. **Using Pulsed Gradient Spin Eco NMR for Chemical Mixture Analysis: How to obtain Optimum Results.** *Concepts Magn Reson.*; 14; 225-258, 2002.
- ASHANI, Y., RADIC', Z., TSIGELNY, I., VELLOM, D. C., PICKERING, N., QUINN, D. M., DOCTOR, B. P., AND TAYLOR, P. **Amino acid residues controlling reactivation of organophosphonyl conjugates of acetylcholinesterase by mono- and bisquaternary oximes.** *J. Biol. Chem.*; 270; 6370–6380, 1995.
- BADRI, RASHID; SHUSHIZADEH, MOHAMMAD REZA. **An efficient tandem oxidative-protection reaction of benzylic alcohols to corresponding arylhydrazones and oximes.** Chemistry Department, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*; 182(3); 601-605, 2007.
- BARDIN, P.G.**Organophosphate and Carbamate. Poisoning.** *Arch. Intern. Med.*; 154; 1433-1441, 1994.
- BENCURA, A., ENYEDY, I., AND KOVACH, I. M. **Origins and diversity of the aging reaction in phosphate adducts of serine hydrolase enzymes: what characteristics of the active site do they probe?** *Biochemistry*; 34; 8989–8999, 1995.
- BENSCHOP, H. P.; De JONG, L. P. A. **Nerve Agent Stereoisomers: Analysis, Isolation, and Toxicology.** *Acc. Chem. Res.*; 21; 368-374, 1988.
- BLACK, R. M.; HARRISON, J. M. **The Chemistry of Organophosphorus Chemical Warfare Agents.** In Hartley, Frank R. (ed); *The Chemistry of Organophosphorus Compounds Vol.4 –Ter- and Quinque-valent Phosphorus Acids and Their Derivatives*; John Wiley & Sons; 781-840, 1996.
- CALIC, M.; VRDOLJAK, A. L.; RADIC, B.; JELIC, D.; JUN, D.; KUKA, K.; KOVARIK, Z. **In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman- poisoned mice and their cytotoxicity.** *Toxicology*; 219; 85-96, 2006.

- CANNARD, K. **The acute treatment of nerve agent exposure.** *Journal of Neurological Sciences*; 249; 86-94, 2006.
- CARLTON, F. B.; SIMPSON, W. M. & HADDAD, L. M. **The Organophosphate and Other Insecticides.** In: Haddad, L. M.; Shannon, M. W.; Winchester, J. F. *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*, Philadelphia, Pennsylvania, USA. WB Saunders Company; 3rd; 836-850, 1998.
- DE CASTRO, A. T. **Estudos por Modelagem Molecular da Reativação da Acetilcolinesterase Inibida por Agentes Químicos Neurotóxicos.** Dissertação de Mestrado (IME), 2002.
- DE CASTRO, A. T.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Molecular structure, conformational analysis and charge distribution of pralidoxime: Ab initio and DFT studies.** *Int. J. Quantum Chem*; 89 (3); 135-146, 2002.
- DE LA HOZ, A.; DÍAZ-ORTIZ, A.; MORENO, A. **Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects.** *Chemical Society Reviews*; 34; 164-178, 2005.
- CHAUDHURI, P.; WEYHERMUELLER, T.; WAGNER, R.; KHANRA, S.; BISWAS, B.; BOTHE, E.; BILL, E. **Tridentate Facial Ligation of Tris(pyridine-2-aldoximato)nickel(II) and Tris(imidazole-2-aldoximato)nickel(II) To Generate NiIIFeIIINiII, MnIIINiII, NiIIINiII, and ZnIIINiII and the Electrooxidized MnIVNiII, NiIIINiII, and ZnIIINiII Species: A Magnetostructural, Electrochemical, and EPR Spectroscopic Study.** Max-Planck-Institut fuer Bioanorganische Chemie, Muelheim an der Ruhr, Germany. *Inorganic Chemistry (Washington, DC, United States)*; 46(21); 9003-9018, 2007.
- DOCTOR, B. P.; SAXENA, A. **Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity.** *Chemico-Biological Interactions*; 157-158; 167-171, 2005.
- CORBRIDGE, D. E. C. **Phosphorus: An Outline of its Chemistry, Biochemistry and Uses**, 5th, Cap. 16, 503-611, 1995.
- DAMLJANOVIC, I.; VUKICEVIC, M.; VUKICEVIC, R. D. **A Simple Synthesis of Oximes.** *Monatshefte für Chemie*; 137; 301-305, 2005.

DOS SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C.L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. **Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicações como Inseticidas e Agentes Antitumorais.** *Química Nova*; 30 (1); 159-170, 2007.

EDDLESTON, M.; SZINICZ, L.; EYER, P.; BUCKLEY, N. **Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials.** *QJ Méd*; 95; 275-283, 2002.

ECKERT, S.; EYER, P.; MUCKTER, H.; WOREK, F. **Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds.** *Biochemical Pharmacology*; 72; 344-357, 2006.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.; ANDRES, JR. A.; FEATHERSTONE, R. A.; **New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology*; 7; 89-95, 1971.

FOURNARI, P.; TIROUFLET, J. **Heterocyclic series. V. Synthesis of substituted nitropyrroles. Application of polarographic analysis to the separation of the isomers and to the structure determination.** *Fac. Sci., Dijon, Bulletin de la Societe Chimique de France*; 484-7, 1963.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKREWSKI, V. G.; MONTGOMERY, J. A.; STRATMAN, R.E.; VURANT, J.C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, J. M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRAIN, M.C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENNUCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; MALICK, D. K.; RABUCH, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; CIOSLOWSHI, J.; ORTIZ, J. V.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERTS, R.; MARTIN, R. L.; FOZ, D. J.; ALLAHAM, T. M.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; GONZALEZ, C.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P.M.W.; JONSON, B.; CHEN, W.; WONG, M.W.; ANDRES, J. L.; GONZALEZ, C.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGE, E.S.; POPLE, J.A.; **Gaussian 98, revision A.6, Gaussian, Inc., Pittsburg, PA. 1998.**

GARRETT, R. H. & GRISHAM, C. H. *Biochemistry, International Edition*, Sanders College Publishing, New York, 1995.

- GIL; VITOR M. S.; GERALDES; CARLOS, F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear. Fundamentos, Métodos e Aplicações.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987, p. 1011.
- GONÇALVES, A. S. **Estudo por Dinâmica Molecular das Interações da Pralidoxima e da Deazapralidoxima com a Acetilcolinesterase Humana Inibida pelo Agente Neurotóxico Tabun.** Dissertação de Mestrado (IME), 2005.
- GONÇALVES, A. S., FRANÇA, T. C. C., DA SILVA, A. W. S., FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun.** *J. Braz. Chem. Soc.*; 17(5); 968-975, 2006.
- GROSFELD, H., BARAK, D., ORDENTLICH, A., VELAN, B., AND SHAFFERMAN, A. **Interactions of oxime reactivators with diethylphosphoryl adducts of human acetylcholinesterases and its mutant derivatives.** *Mol Pharmacol*; 50; 639-649, 1996.
- GRUNANGER, P.; FINZI, P. V. **Transposition of 2-isoxazoline esters to 4-arylideneisoxazolones.** *Gazzetta Chimica Italiana*; 89; 1771-83, 1959.
- GUPTA, R. C. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C. 1st Ed. Elsevier Academic Press: London, 2006, p. 5-24.
- HARPER, A. **Review of Physiological Chemistry**, Lange Medical Publications, 15th Ed., Califórnia, 1975.
- <http://www.sindag.gov.br>, acessada em Outubro de 2008.
- JOKANOVIC, M. **Biotransformation of organophosphorus compounds.** *Toxicology*; 166; 139-160, 2001.
- JUN, D.; KUKA, K.; PICHA, J.; KOLECKAR, V.; MAREK, J. **Potency of Novel Oximes to Reactivate Sarin Inhibited Human Cholinesterases.** *Drug and Chemical Toxicology*; 31(1); 1-9, 2008.

- LI, JI-TAI; CHEN, YAN-XUE; LI, XIAO-LIANG; DENG, HAI-JIAN. **An efficient procedure for synthesis of oximes by grinding.** *Asian Journal of Chemistry*; 19(3); 2236-2240, 2007.
- MUSILEK, K.; HOLAS, O.; JUN, D.; DOHNAL, V.; GUNN-MOORE, F.; OPLETALOVA, V.; DOLEZAL, M.; KUKA, K. **Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker – Preparation and reactivation of tabun-and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 15; 6733-6741, 2007.
- JAIN, N.; KUMAR, A.; CHAUHAN, S. M. S. **Metalloporphyrin and heteropoly acid catalyzed oxidation of CNOH bonds in an ionic liquid: biomimetic models of nitric oxide synthase.** *Tetrahedron Letters*; 46(15); 2599-2602, 2005.
- KAPURIYA, NAVAL; KAPURIYA, KALPANA; DODIA, NARSINH M.; LIN, YI-WEN; KAKADIYA, RAJESH; WU, CHAO-TING; CHEN, CHING-HUANG; NALIAPARA, YOGESH; SU, TSANN-LONG. **Novel oxidative nitrogen to carbon rearrangement found in the conversion of anilines to benzaldoximes by treating with HCHO/H₂O₂.** *Tetrahedron Letters*; 49(18), 2886-2890, 2008.
- KASSA, J.; KARASOVA, J.; MUSILEK, K.; KUKA, K. **An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice.** *Toxicology*; 243; 311-316, 2008.
- KASSA, J.; KARASOVA, J. **A Comparison of the potency of newly developed oximes (K074, K075) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) to counteract tabun induced neurotoxicity in rats.** *Toxicology*; 229; 136-144, 2007.
- KIM, T. H.; KUCA, K.; JUN, D.; JUNG, Y. S. **Design and synthesis of the new bis-pyridinium oxime reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorous nerve agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 15; 2914-2917, 2005.
- KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J (Eds). **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 5th ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.

- KNAPP, D. R. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions.** A Wiley-Interscience Publication; John Wiley & Sons; New York-Chichester-Brisbane-Toronto; p.342-343, 1979.
- KUKA, K.; JUN, D.; CABAL, J.; MUSILOVA, L. **Bisquaternary Oximes as Reactivators of Tabun-Inhibited Human Brain Cholinesterases: An *in vitro* Study.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*; 101; 25–28, 2007.
- KUKA, K.; JUN, D.; KIM, T. H.; CABAL, J.; JUNG, Y. S. ***In vitro* Evaluation of New Acetylcholinesterase Reactivators as Casual Antidotes against Tabun and Cyclosarin.** *Bull. Korean Chem. Soc.*; 27 (3); 395-398, 2006.
- KUKA, K.; CABAL, J.; JUN, D.; KASSA, J.; BARTOSOVÁ, L.; KUNESOVÁ, G.; DOHNAL, V. **Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve agent poisonings.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; 149(2); 429–31, 2005.
- KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. **Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin.** *Biol. Pharm. Bull.*; 25 (6); 695-704, 2002.
- KUKA, K.; JUN, D. **Reactivation of Sarin-inhibited Pig Brain Acetylcholinesterase using Oxime Antidotes.** *Journal of Medical Toxicology*; 2 (4); 141-146, 2006.
- LARINI, L. **Inseticidas.** In: Larine, L. *Toxicologia*, 2^a ed. São Paulo; Editora Manole Ltda; 136-163, 1993.
- LEJEUNE, K. E.; DRAVIS, B. C.; YANG, F.; HETRO, A. D.; DOCTOR, B. P.; RUSSELL, A. J. **Fighting nerve agent chemical weapons with enzyme technology.** *Ann. Acad. Sci*; 864; 153-170, 1998.
- LI J. T.; LI, X. L.; LI, T. S. **Synthesis of oximes under ultrasound irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry*; 13; 200-202, 2006.
- LUCIC, A.; RADIC, B.; PERAICA, M.; MESIC, M.; PRIMOZIC, M.; BINENFELD, Z. **Antidotal efficacy of quinuclidinium oximes against soman poisoning .** *Arch. Toxicol*; 71; 467-470, 1997.

- LUO, C., ASHANI, Y., BHUPENDRA, P. **Acceleration of Oxime-Induced Reactivation of Organophosphate-Inhibited Fetal Bovine Serum Acetylcholinesterase by Monoquaternary and Bisquaternary Ligands.** *Molecular Pharmacology*; 53; 718–726, 1998.
- MARRS, T. C. **In Chemical Warfare Agents – Toxicology and Treatment**; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 191-221, 2007.
- MASSON, P., FROMENT, M .T., BARTELS, C. F., AND LOCKRIDGE, O. **Importance of aspartate 70 in organophosphate inhibition, oxime reactivation and aging of human butyrylcholinesterase.** *Biochem J.*, 325; 53–61, 1997.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BOM ,S.; KREJCI, E. **Molecular and cellular biology of cholinesterase.** *Progress in Neurobiology*, v. 41, p. 31-41, 1993.
- MEHLERT, A.; VARON, L.; SILMAN, I.; HOMANS, S. W.; FERGUSON, M. A. J. **Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo californica*.** *Biochem. J.*; 296; 473-479, 1993.
- MEHTA, B. H.; GUPTA, T. **Synthesis, spectral and thermal studies of Ni(II) and Pd(II) complexes with p-(N,N'-dimethylaminobenzaloxime).** *Asian Journal of Chemistry*; 17(3), 1539-1544, 2005.
- MODA, T. L.; TORRES, L. G.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. **PK/DB: database for pharmacokinetic properties and predictive *in silico* ADME models.** *Bioinformatics (Oxford)*; 24; 2270-2271, 2008.
- MORAES, ANA CLAUDIA LOPES DE. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro.** [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; p.111, 1999.
- MORRIS, G.M.; GOODSSELL, D.S.; HALLIDAY, R.S.; HUEY, R.; HART, W.E.; BELEW, R.K.; OLSON, A.J. **Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function.** *J. Computational Chemistry*, 19: 1639-1662, 1998.

- MURATA, K.; KIRIYAMA, N. **Antiseptic and antifungous power of furfuraldoxime and its sweetening effect.** *Rept. Osaka Municipal Research Inst. Domestic Sci.*; 17(Nº. 1); 195-198, 1946.
- NAGAO, M.; TAKATORI, T.; MATSUDA, Y.; NAKAJIMA, M.; IWASE, H.; IWADATE, K. **Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway.** *Toxicology and Applied Pharmacology*; 144; 198-203, 1997.
- NUNES-TAVARES, N.; MATTA, A. N.; BATISTA E SILVA, C. M.; ARAÚJO, G. M. N.; LOURO, S. R. W.; HASSON-VOLOCH. **A Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, p. 1071-1079, 2002.
- ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; SOD-MORIAH, G.; KAPLAN, D.; MIZHARI, D.; SEGALL, Y.; KRONMAN, C.; KARTON, Y.; LAZAR, A.; MARCUS, D.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A.; **Stereoselectivity toward VX is determined by interactions with residues of the acyl pocket as well as of the peripheral anionic site of AChE.** *Biochemistry* ; 43; 11255, 2004.
- OLIVEIRA, S. C. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **¹H NMR Spectroscopy Study of the Interaction between Pyrimethamine Hydrochloride and Bovine Serum Albumin.** *¹H NMR Spectroscopy Study*; 1; 28-31, 2002.
- OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INACIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C.; FERREIRA, M.; CUNHA, J. C.; MOREIRA, J. C. **Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries.** *Human & Experimental Toxicology*; 19; 173-177, 2000.
- PALM, A.; WERBIN, H. **Infrared study of the N-OH group in alpha and beta oximes.** *Canadian Journal of Chemistry*; 32 858-63, 1954.
- PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry.** 2nd, Ed. Oxford, p 432-482, 2001.
- PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R. **Purification of laboratory chemicals.** *Pergamon Press*, 1966.
- PHALGUNI, C.; WEYHERMUELLER, T.; WAGNER, R.; KHANRA, S.; BISWAS, B.; BOTHE, E.; ECKHARD, B. **Tridentate Facial Ligation of Tris(pyridine-2-**

aldoximato)nickel(II) and Tris(imidazole-2-aldoximato)nickel(II) To Generate NiIIFeIIINiII, MnIIINiII, NiIIINiII, and ZnIIINiII and the Electrooxidized MnIVNiII, NiIIINiII, and ZnIIINiII Species: A Magnetostructural, Electrochemical, and EPR Spectroscopic Study. Max-Planck-Institut fuer Bioanorganische Chemie, Muelheim an der Ruhr, Germany. *Inorganic Chemistry* (Washington, DC, United States); 46(21); 9003-9018, 2007.

PICHA, J.; CIBULKA, R.; HAMPL, F.; LISKA, F.; PARIK, P.; PYTELA, O. **Reactivity of p-substituted benzaldoximes in the cleavage of p-nitrophenyl acetate: Kinetics and mechanism.** *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*; 69(2); 397-413, 2004.

POZIOMEK, E. J.; HACKLEY, B. E. Jr; STEINBERG, G. M. **Pyridinium aldoximes.** *Journal of Organic Chemistry*; 23; 714-17, 1958.

QIAN, N.; KOVACH, I. M. **Key active site residues in the inhibition of acetylcholinesterase by soman.** *Federation of European Biochemical Societies*; 336 (2); 263-266, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Drogas que inibem a colinesterase.** 4^a ed. Guanabara Koogan; p.110-115, 2001.

ROSATI, J. L.; DUTRA, A. A. M.; MORAES, A. C. L.; FERREIRA, M. C. L.; ROCHA, L. F. R. **Intoxicação por Carbamatos e Organofosforados.** *JMB*; 69 (3); 73-96, 1995.

SANSEVERINO, A. M. **MICROONDAS EM SÍNTESE ORGÂNICA.** *Química Nova*; 25 (4); 660-667, 2002.

SANSEVERINO, A. M. **CLEAN ORGANIC SYNTHESIS.** An introduction to the fundamental concepts and main aspects of organic clean synthesis is given, and relevant industrial examples which have implemented the philosophy of cleaner synthesis are also presented. Recent trends in organic synthesis which are environmentally friendly are also discussed. *Química Nova*; 23 (1); 102-107, 2000.

SAXENA, A.; VIRAGH, C.; FRAZIER, D. S.; KOVACH, I. M.; MAXWELL, D. M.; LOCKRIDGE, O.; DOCTOR, B. P. **The pH Dependence of Dealkylation in Soman-Inhibited Cholinesterases and Their Mutants: Further Evidence for a Push- Pull Mechanism.** *Biochemistry*; 37; 15086- 15096, 1998.

- SAXENA, A., DOCTOR, B. P., MAXWELL, D. M., LENZ, D. E., RADIC, Z., AND TAYLOR, P. **The role of glutamate-199 in the aging of cholinesterase.** *Biochem Biophys Res Commun*;197; 343–349, 1993.
- SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K; TAYLOR, S. S.; FRIEDMANN, T; TAYLOR, P; **Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence.** *Nature*; 319, 407, 1986.
- SCHUTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F. **PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes.** *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY*; 60; 1355-1363, 2004.
- SCHWARZ, I. M., LOEWENSTEIN, Y., GLICK, D., LIAO, J., NORGAARD-PEDERSON, B., AND SOREQ, H. **Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants.** *Mol Brain Res.*; 31;101–110, 1972.
- SIDELL, F. R.; BORAK, J. J. **Chemical Warfare Agents: II. Nerve Agents.** *Annals of Emergency Medicine*; 21; 865-871, 1992.
- SIDELL, F. R. Nerve Agents. In: Sidell, F. R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R. (ed). **Medicinal Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine.** Office of Surgeon General, US Army, Washington D. C.; p.129-179, 1997.
- SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293-302, 2005.
- SILVA, G. R. **Estudo da Reativação da Acetilcolinestrerase Inibida por Organofosforados: Análise Conformacional da Molécula de HI-6 e Simulação da Reação de Desfosforilação.** Dissertação de Mestrado (IME), 2005.
- SILVA, G. R.; JÚNIOR, I. B.; VILLAR, J. D. F. **DFT Conformational Studies of the HI-6 Molecule.** *International Journal of Quantum Chemistry*; 105; 260-269, 2005.

- SOGORB, M. A.; VILANOVA, E.; CARRERA, V. **Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings.** *Toxicology Letters*; 151; 219-233, 2004.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. **Acetylcholinesterase – new roles for an old actor.** *Nature Reviews in Neuroscience*, v. 2, p. 294-302, 2001.
- SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. **Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo Californica: A prototypic acetylcholine-binding protein.** *Science*, v. 253, p. 872-879, 1991.
- TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R.W.; Molinoff, P. B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.
- TAYLOR, P.; RADIC, Z.; **The cholinesterases: from gene to proteins.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 34, p. 281-320, 1994.
- TAYLOR, R. F. **Biotechnology-based Methods for the Detection of Chemical and Biological Warfare Agents.** Proc. 4th Int. Symp. Protection Against Chemical Warfare Agents; Estocolmo; Suécia; 8-12, 1992.
- THIERMANN, H., SZINICZ, L., EYER, P., FELGENHAUER, N., ZILKER, T., **Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning.** *Toxicol. Lett.* 107; 233-239, 1999.
- TOY, D. F. **Phosphorus Chemistry in Everyday Living;** American Chemical Society; Washington; D. C., 1976.
- VIRAGH, C.; AKHMETSHIN, R.; KOVACH, I. M. **Unique Push-Pull Mechanism of Dealkylation in Soman Inhibited Cholinesterases.** *Biochemistry*; 36; 8243-8252, 1997.
- VOGEL'S **Oximes, investigation and characterisation of organic compounds.** Textbook of Practical Organic Chemistry; 5th; Ed. Longman; p.1259, 1989.

VOLANS, A.P. **Sarin: guidelines on the management of victims of a nerve gas attack.** *J. Accid. Emerg. Med.* 13; 202–206, 1996.

WINK, D. J. **Spin-Lattice Relaxation Times in ^1H NMR Spectroscopy.** *J. Chem. Educ.*; 66(10); 810-813, 1989.

WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L. **Reactivation and aging Kinetics of human acetylcholinesterase inhibited by organophosphonylcholines.** *Archives of Toxicology*, v. 78, p. 212-217, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A – Espectros de Infravermelho (IV)

Apêndice B – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C)

Apêndice C – Arquivo do diretório para sequência de T_1

Apêndice D – Artigo publicado

APÊNDICE A – Espectros de Infravermelho

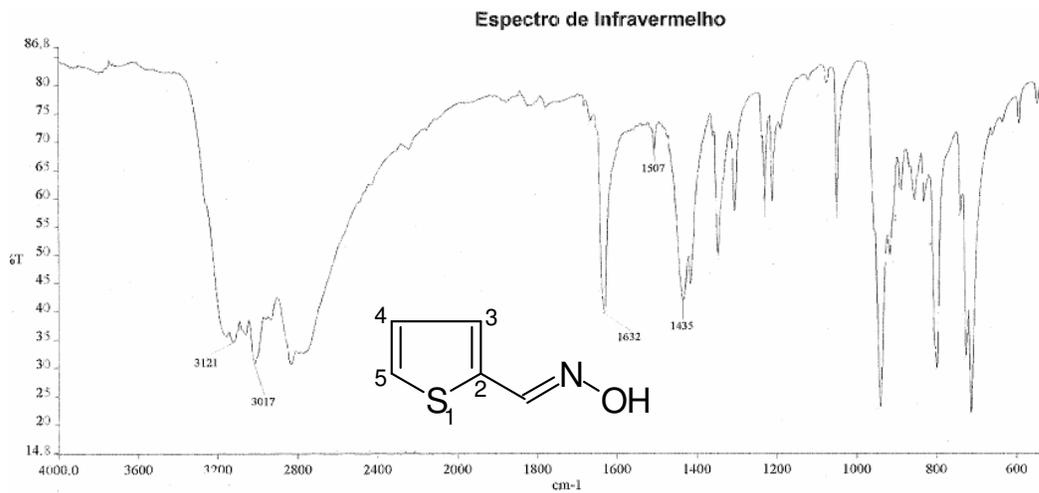


FIG. 8.1 – Espectro de IV da 2-tiofenoaldoxima.

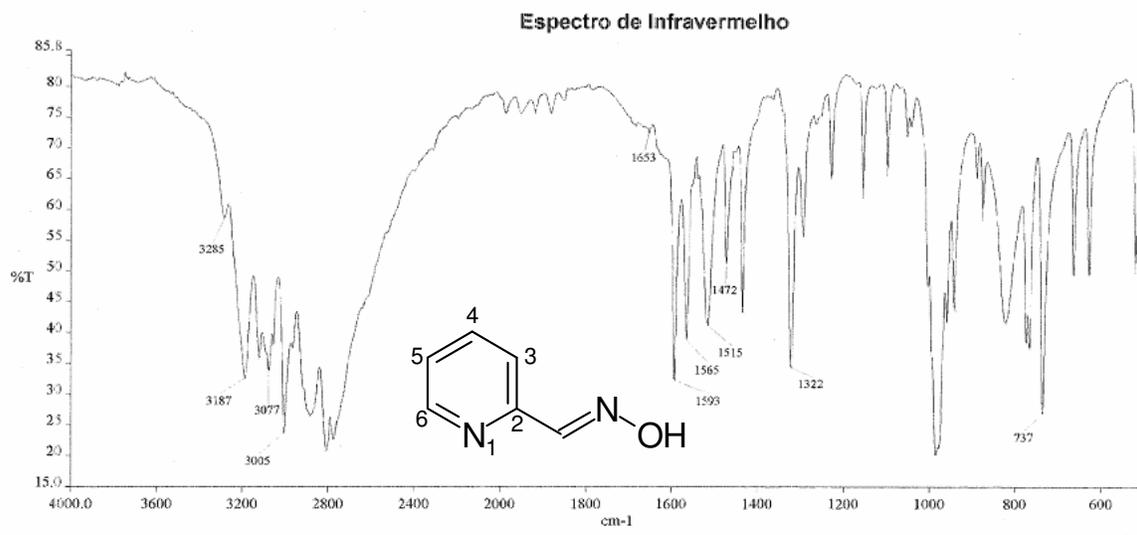


FIG. 8.2 - Espectro de IV da 2-piridinoaldoxima.

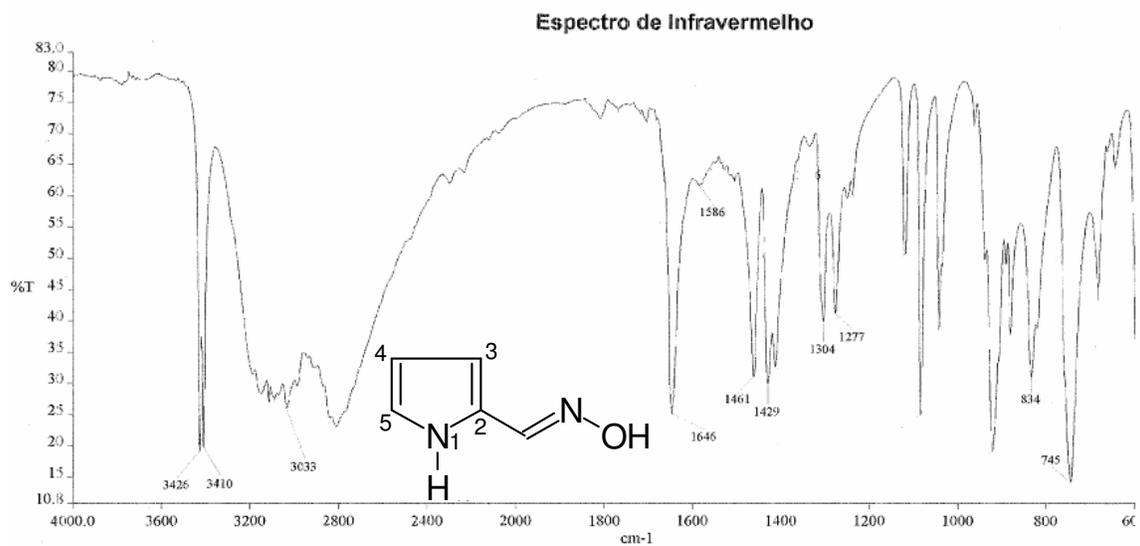


FIG. 8.3 - Espectro de IV da 2-pirroilaldoxima.

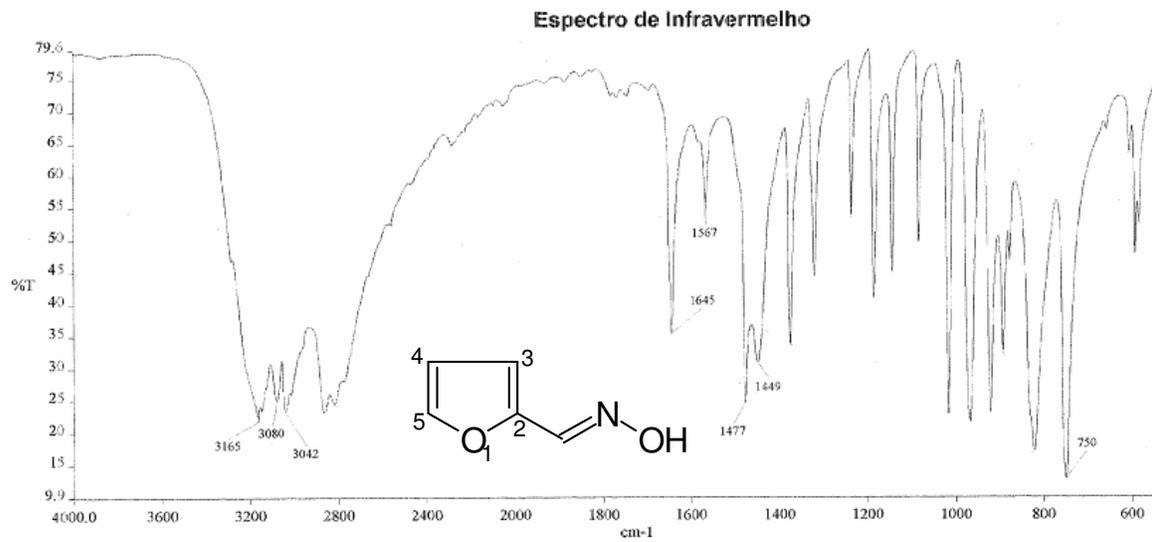


FIG. 8.4 - Espectro de IV da 2-furfurillaldoxima.

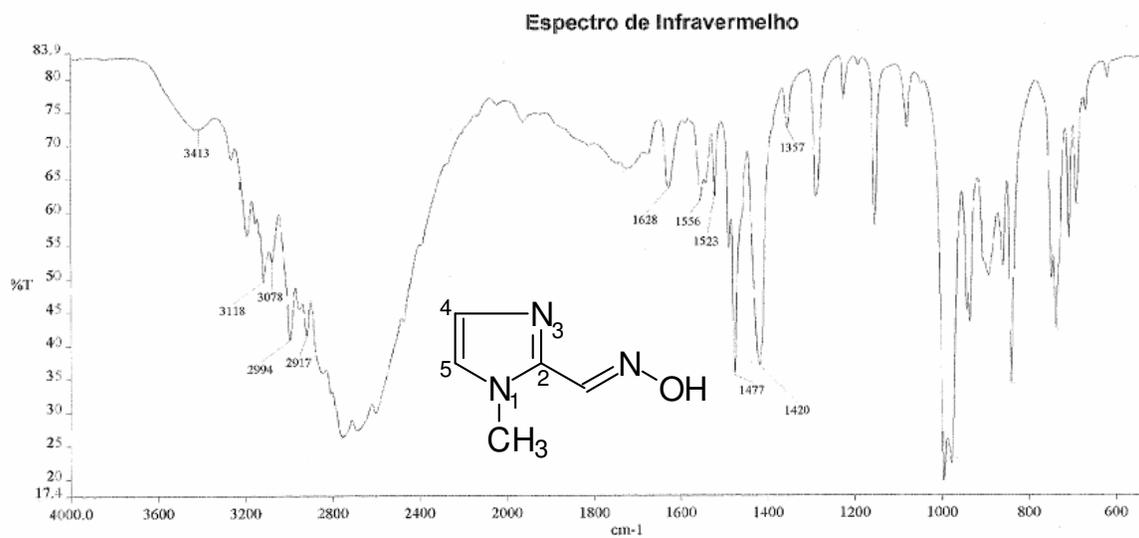


FIG. 8.5 - Espectro de IV 1-metil-2-imidazoilaloxima.

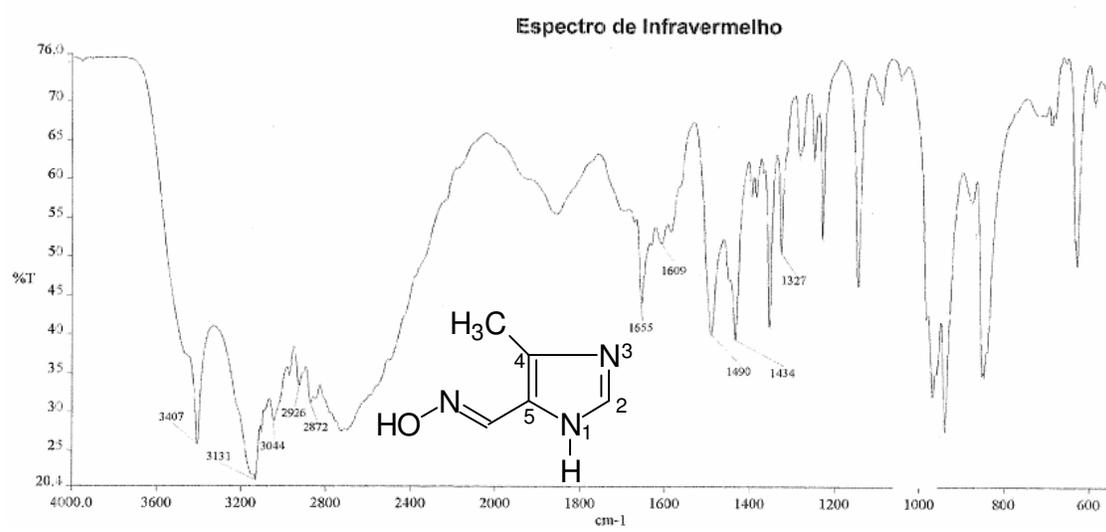


FIG. 8.6 - Espectro de IV 4-metil-5-imidazoilaloxima.

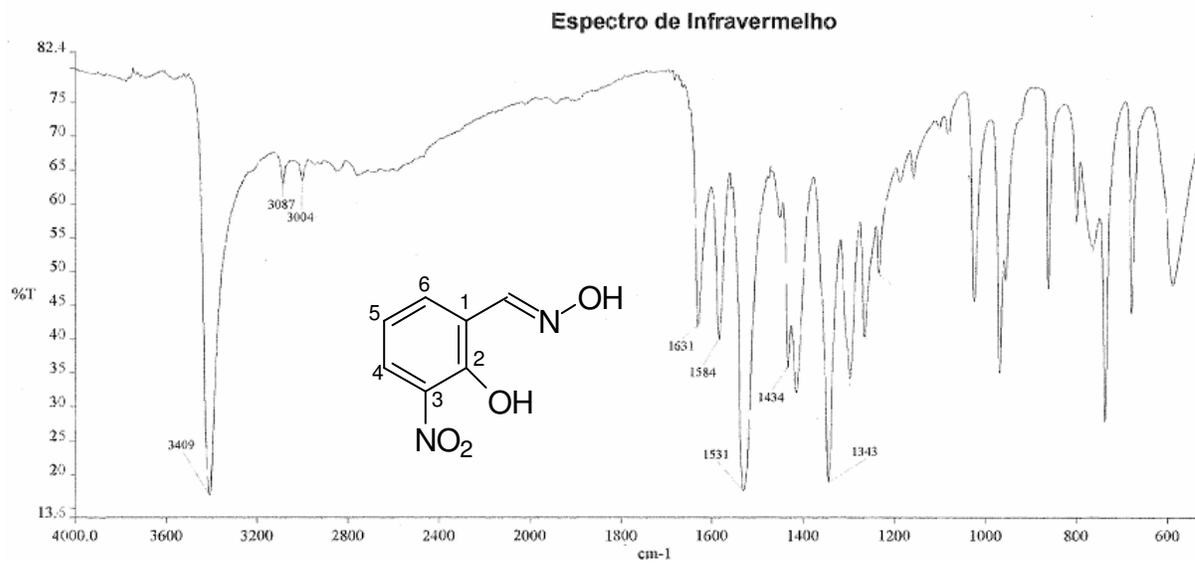


FIG. 8.7 - Espectro de IV da 3-nitro-salicilaldoxima.

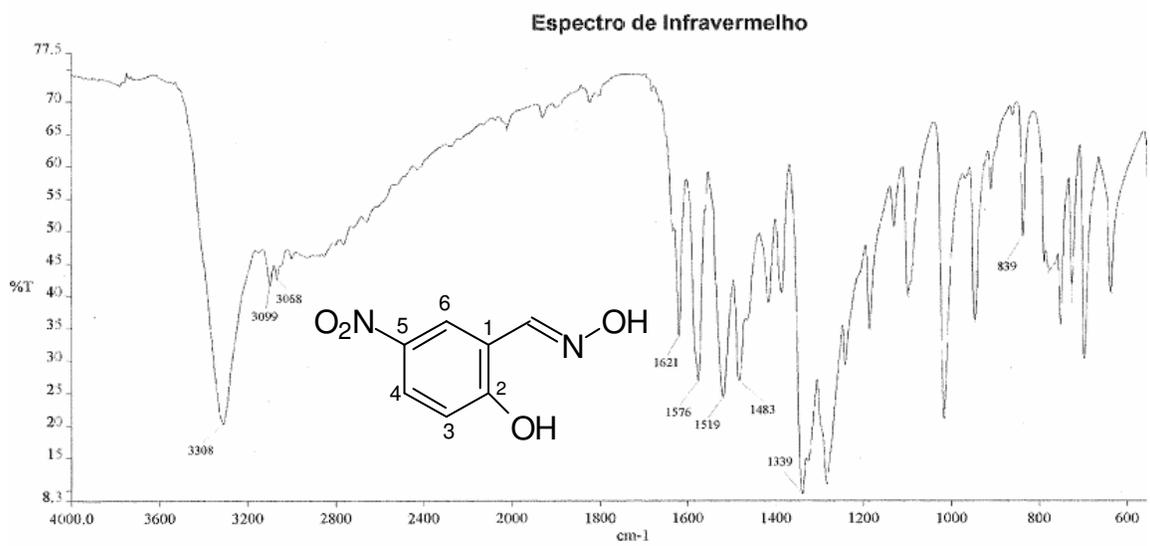


FIG. 8.8 - Espectro de IV da 5-nitro-salicilaldoxima.

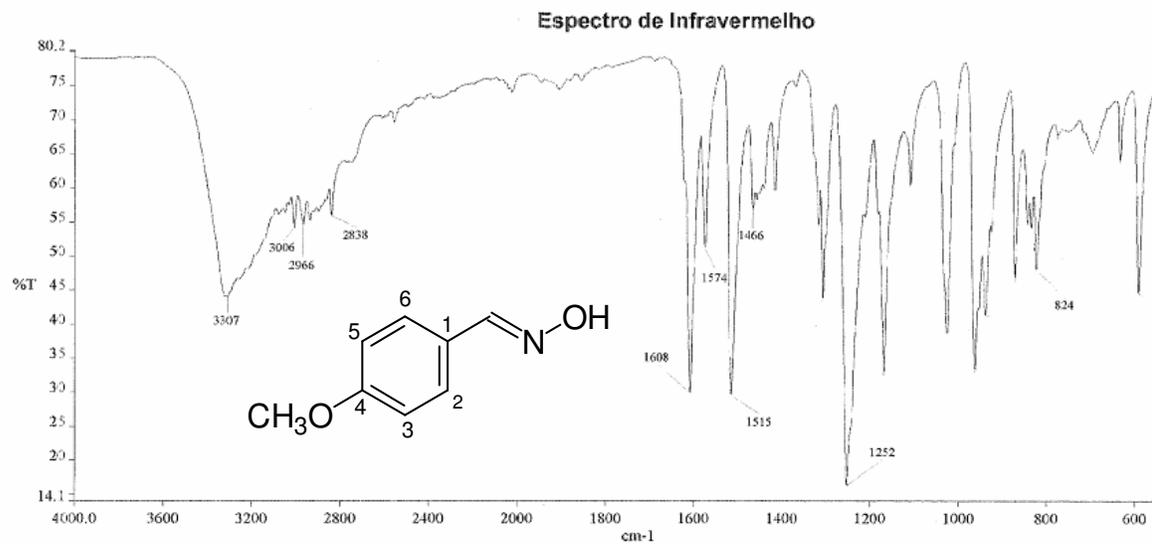


FIG. 8.9 - Espectro de IV da 4-metoxi-benzaldoxima.

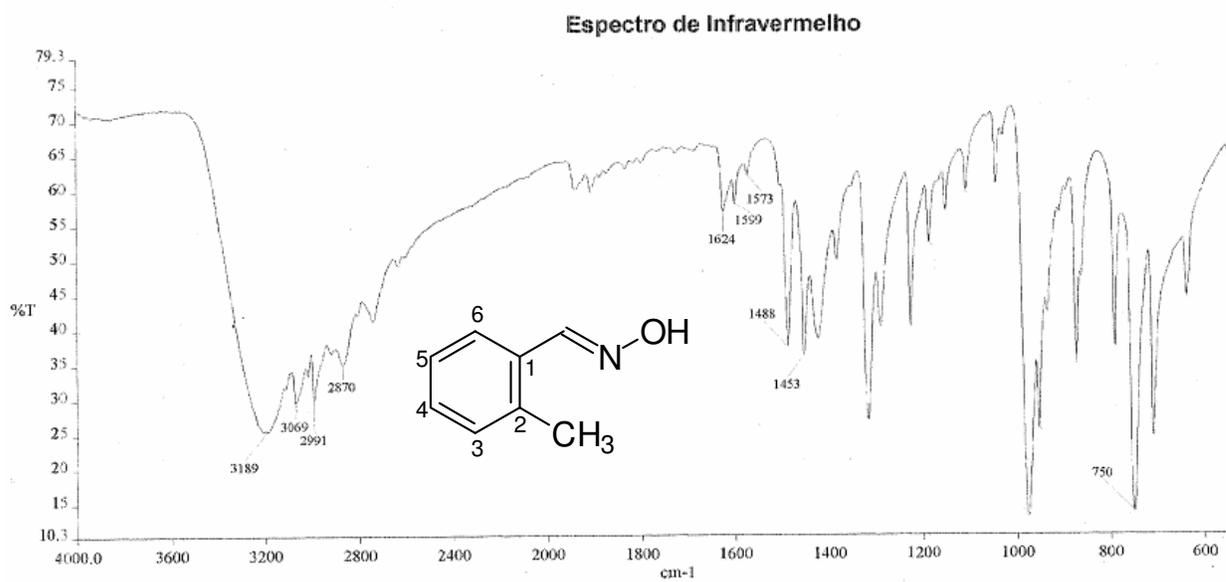


FIG. 8.10 - Espectro de IV da *o*-toluillaldoxima.

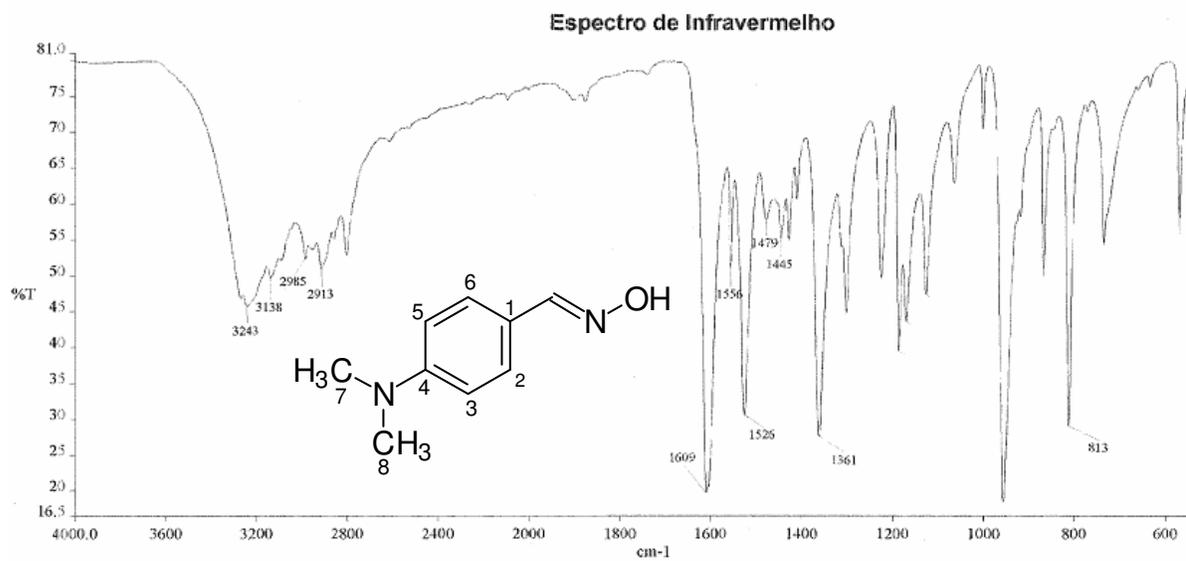


FIG. 8.11 - Espectro de IV da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima.

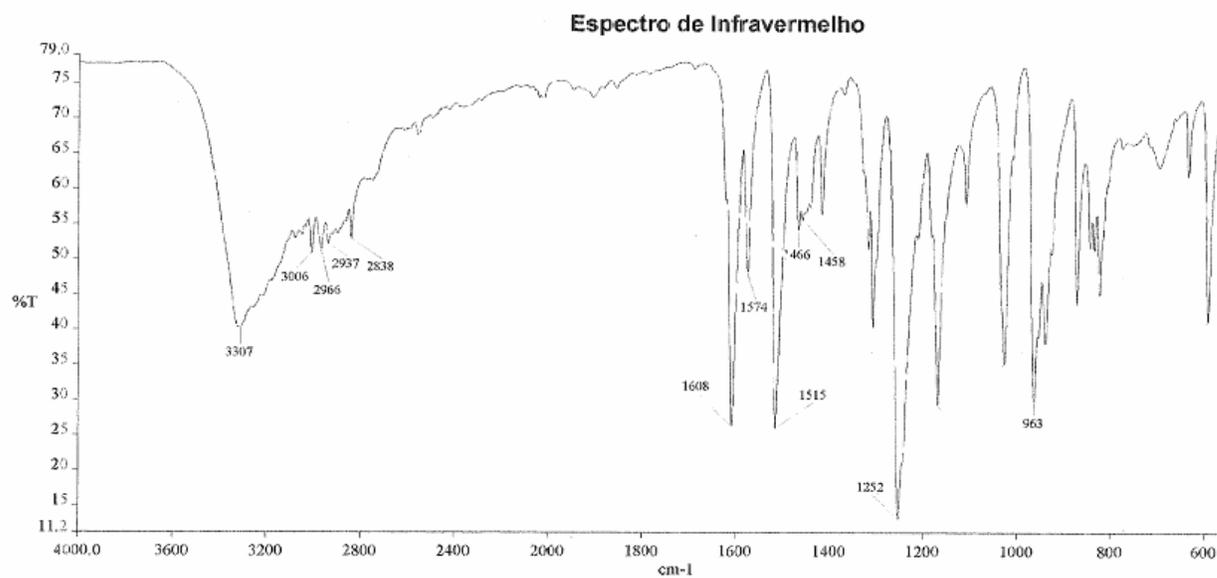


FIG. 8.12 - Espectro de IV da *m*-aminobenzaldoxima.

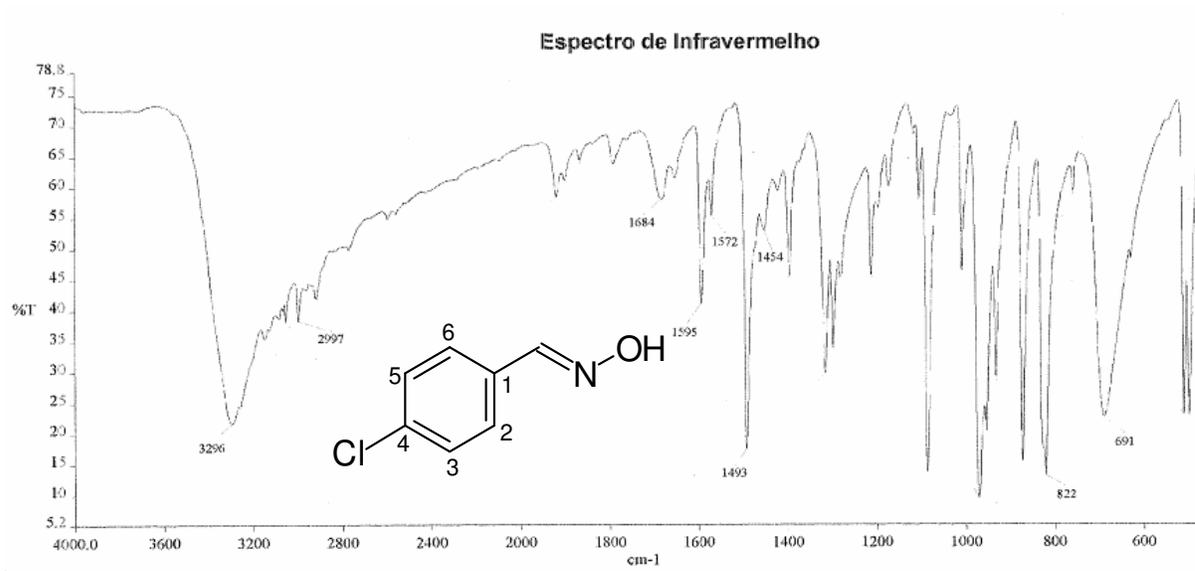


FIG. 8.13 - Espectro de IV da 4-cloro-benzaldoxima.

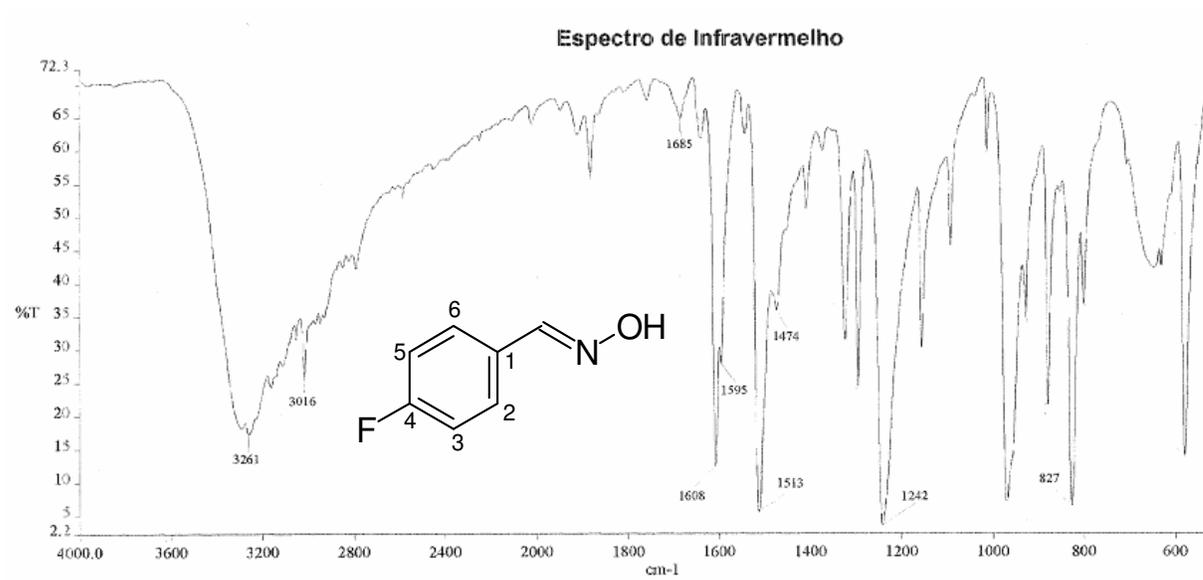


FIG. 8.14 - Espectro de IV da 4-flúor-benzaldoxima.

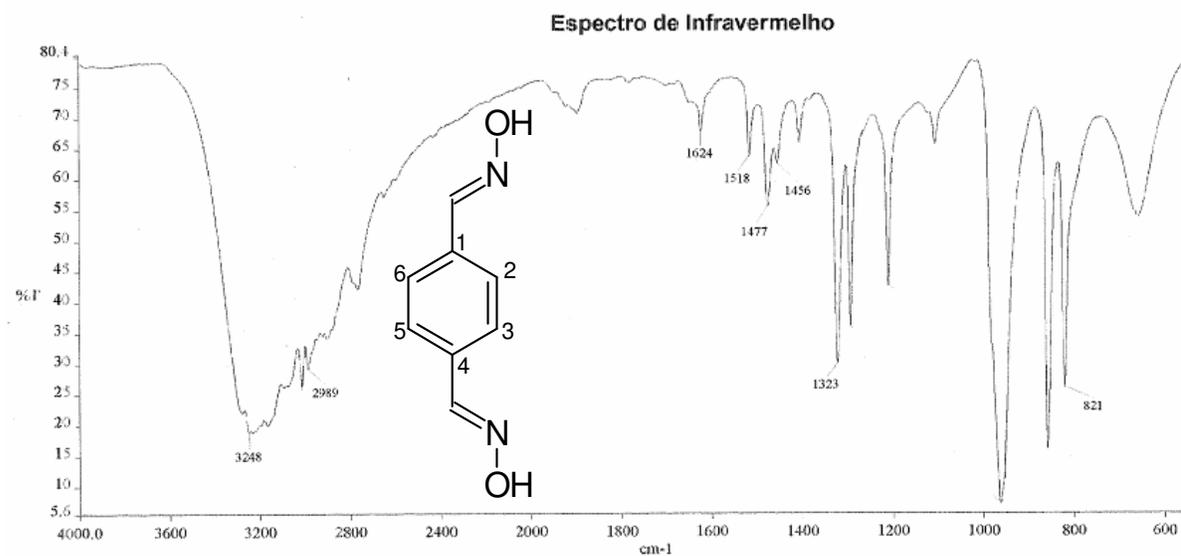


FIG. 8.15 - Espectro de IV da tereftaldoxima.

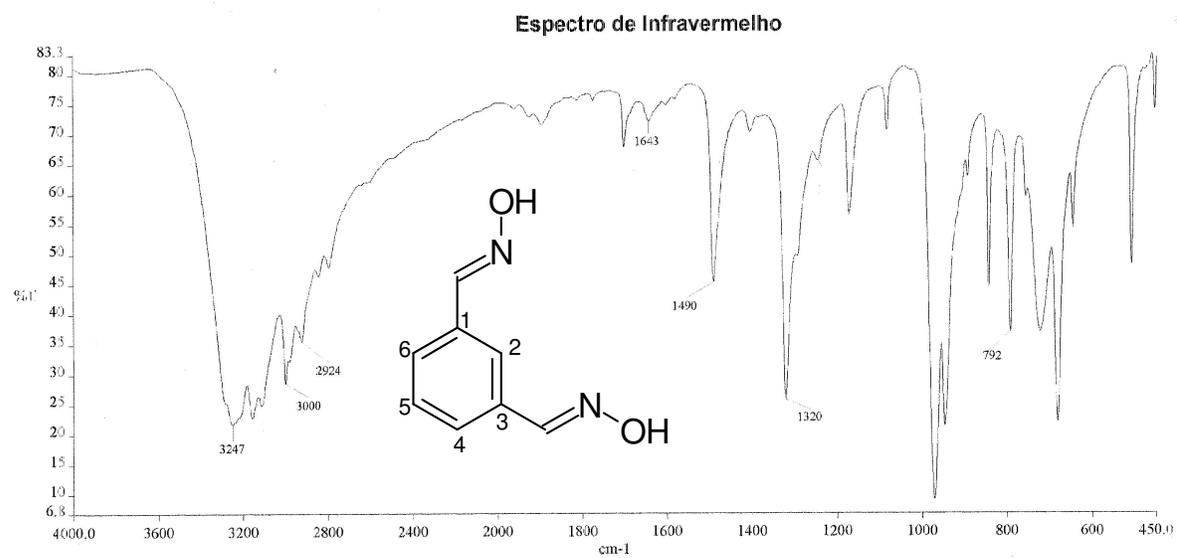


FIG. 8.16 - Espectro de IV da isoftaldoxima.

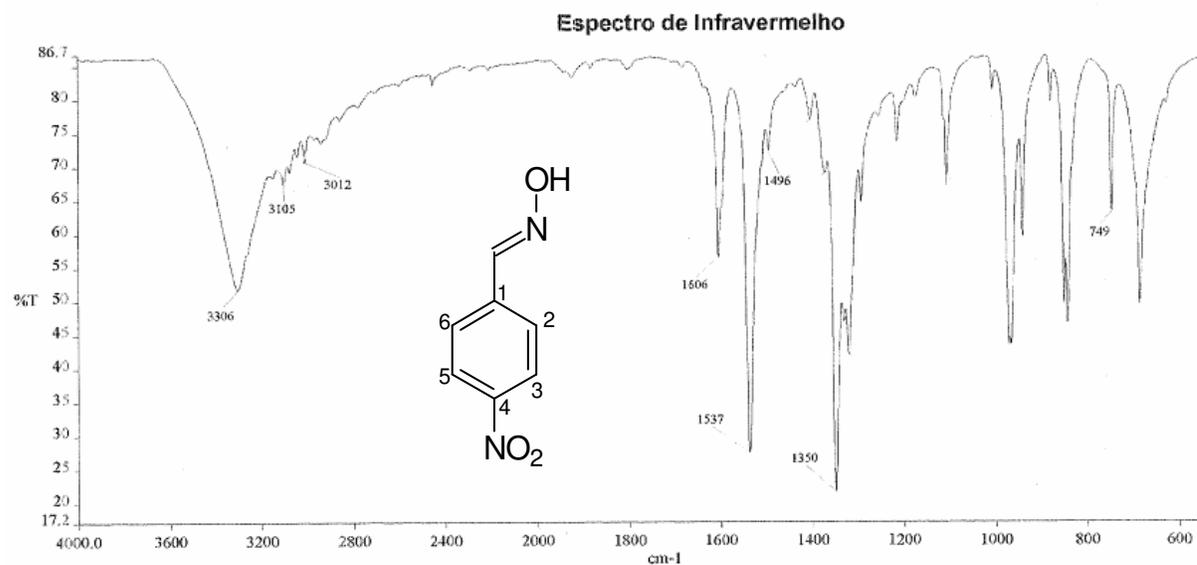


FIG. 8.17 - Espectro de IV da 4-nitro-benzaldoxima.

APÊNDICE B – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

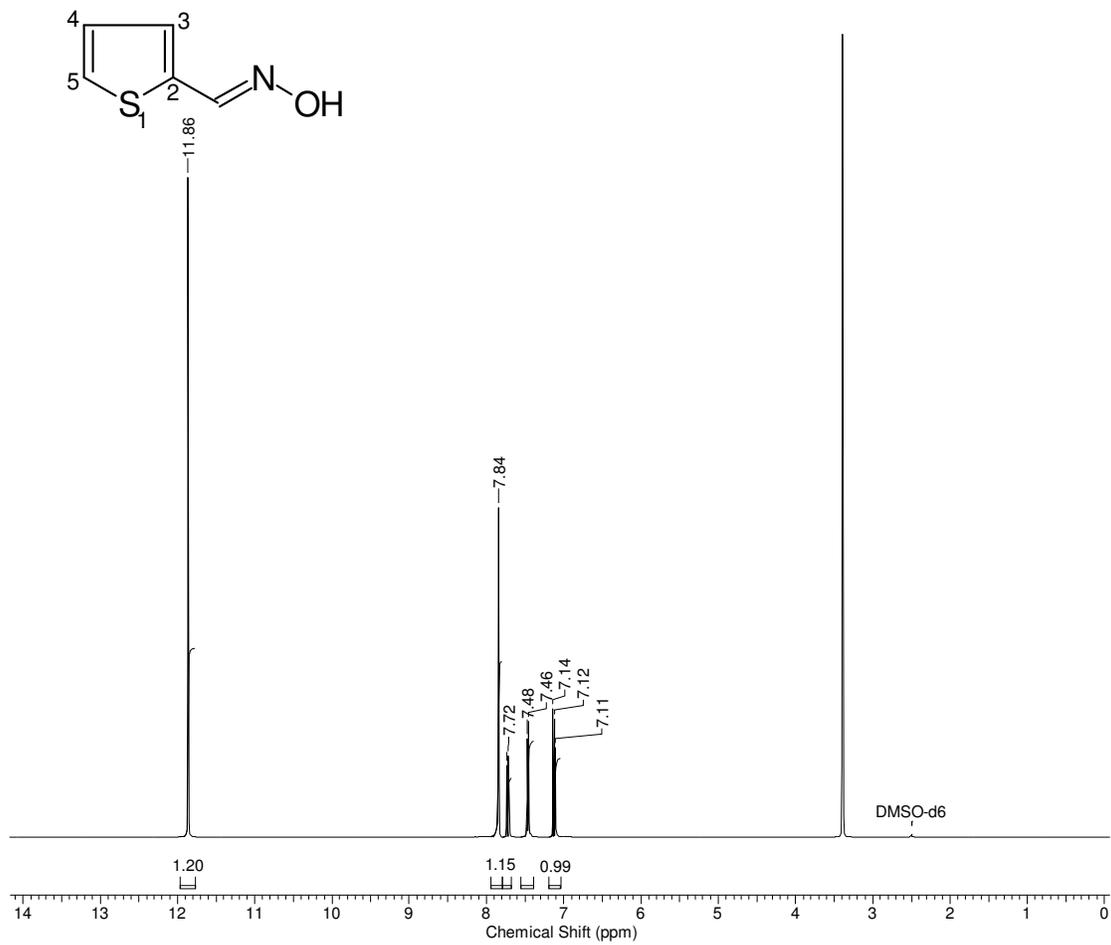


FIG. 8.18 - Espectro de RMN ^1H da 2-tiofenoaldoxima.

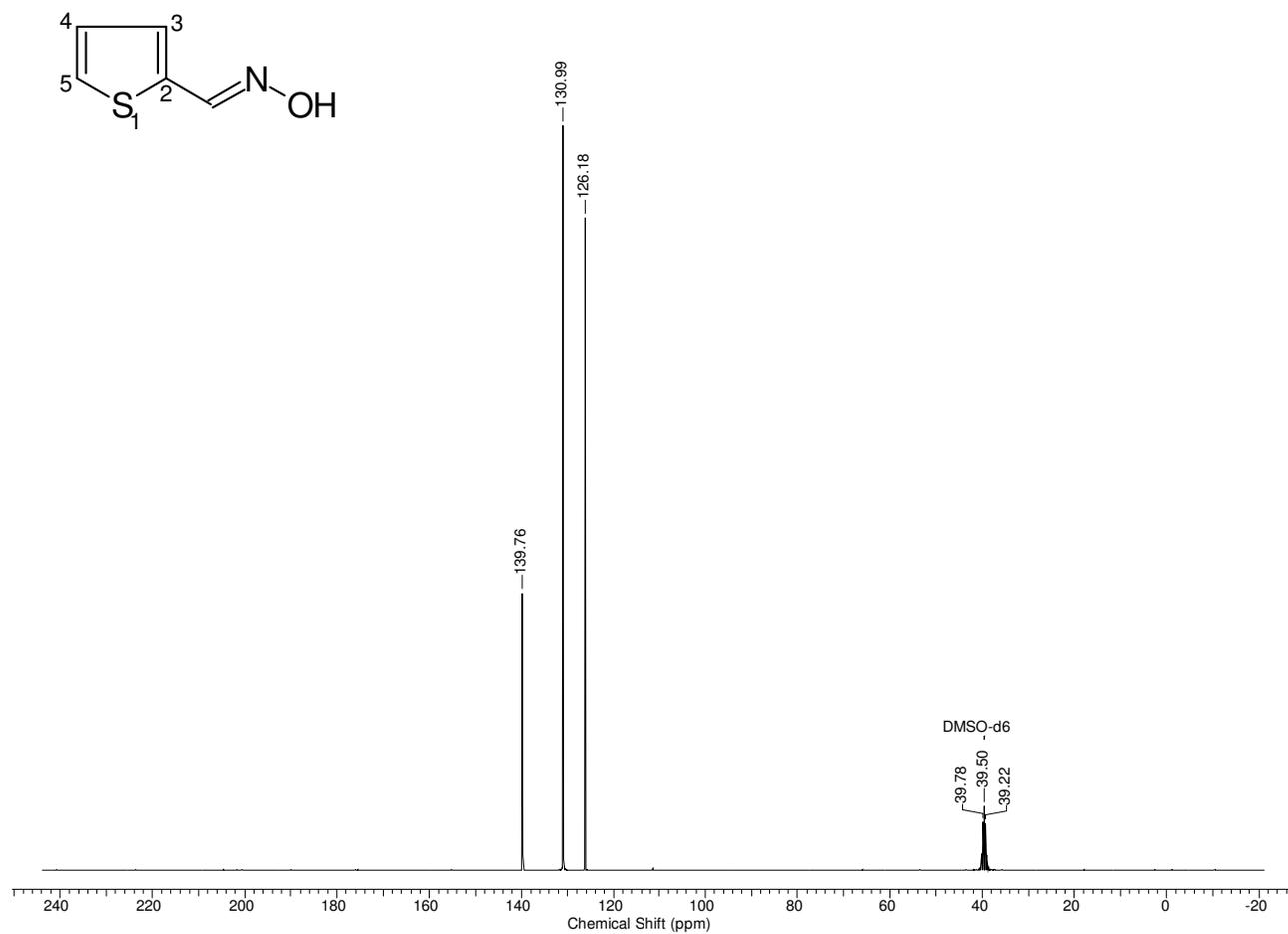


FIG. 8.19 - Espectro de RMN ^{13}C da 2-tiophenaldoxima.

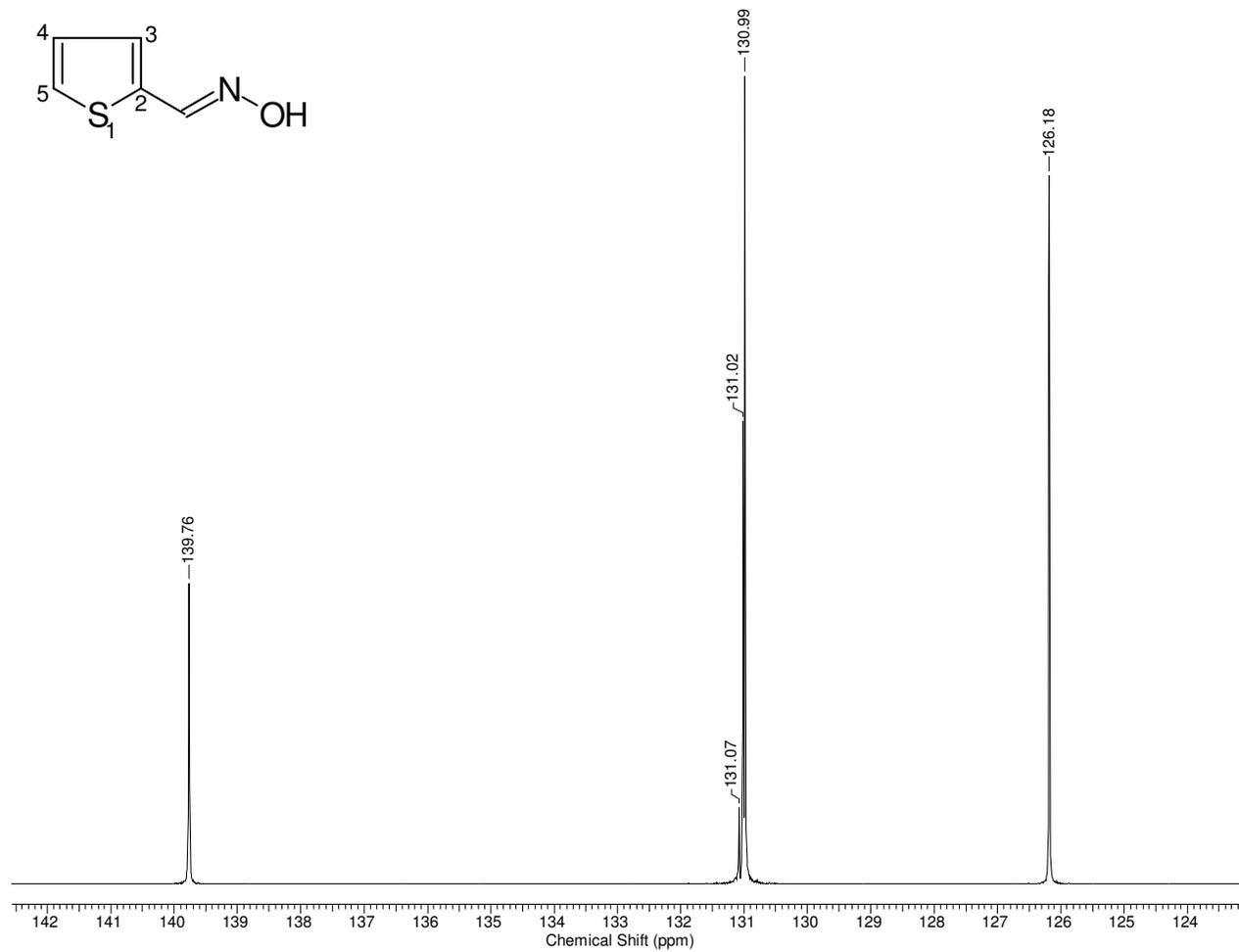


FIG. 8.20 - Espectro de RMN ^{13}C da 2-ti-fenoaldoxima expandido.

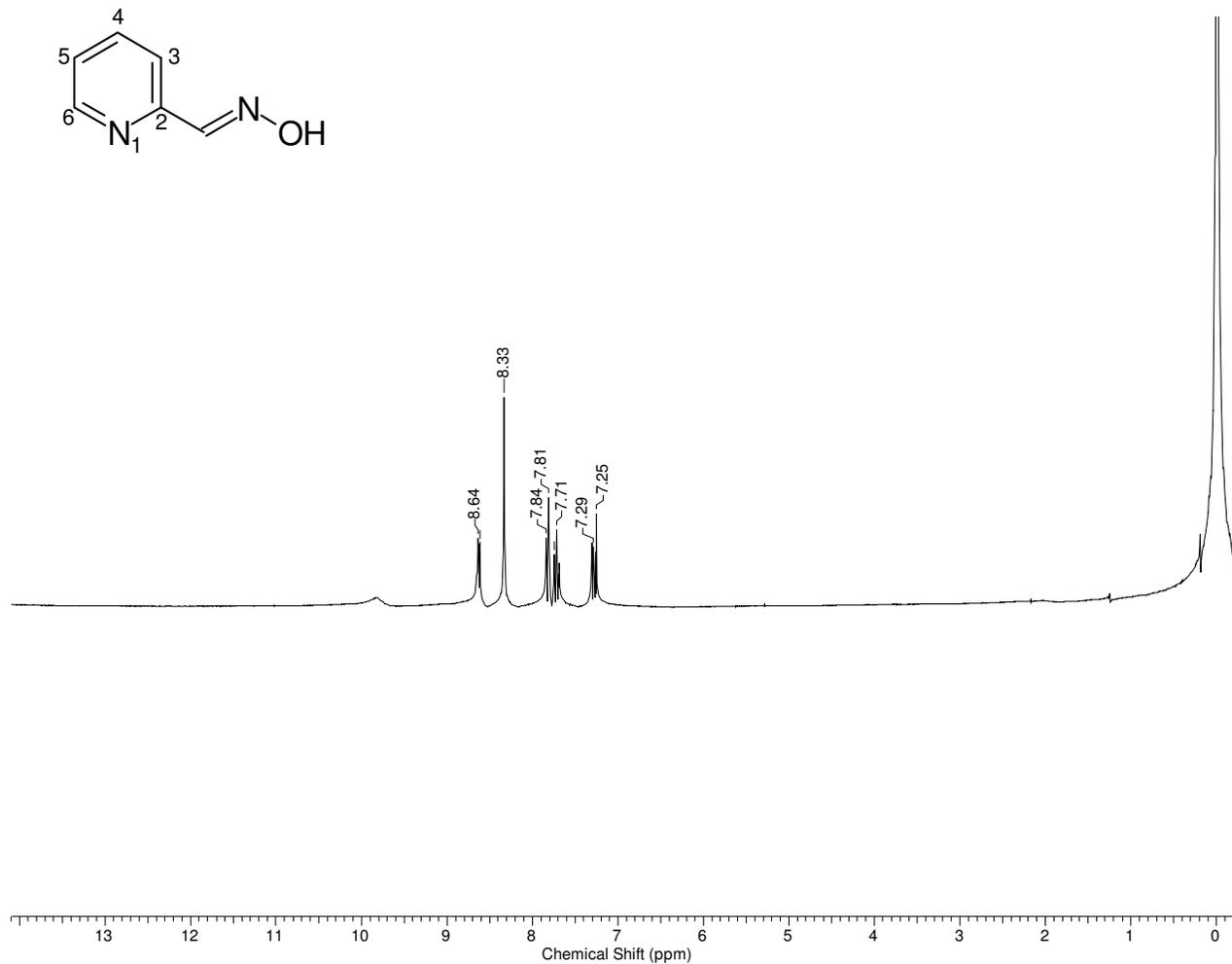


FIG. 8.21 - Espectro de RMN ¹H da 2-piridinoaldoxima.

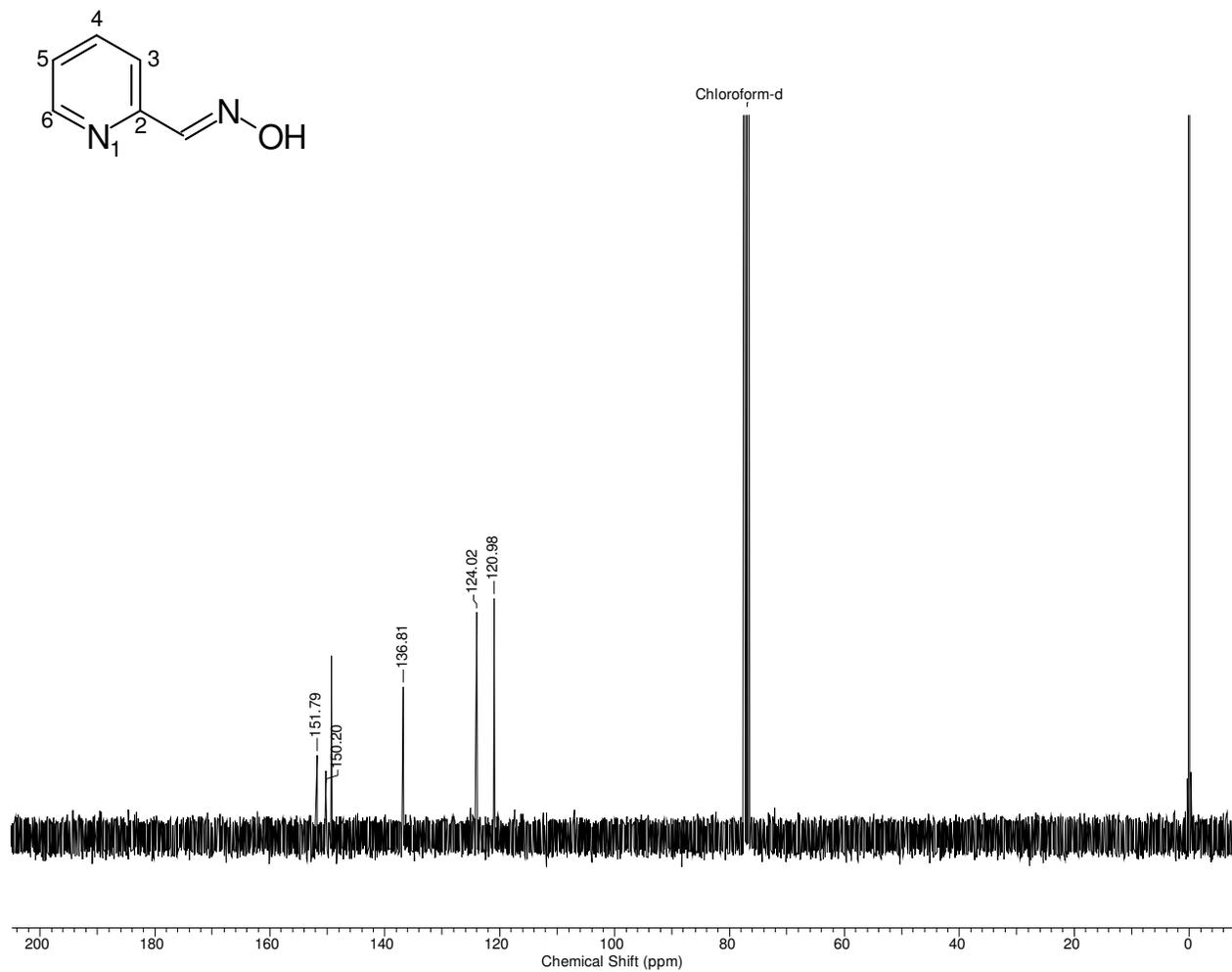


FIG. 8.22 - Espectro de RMN ¹³C da 2-piridinoaldoxima.

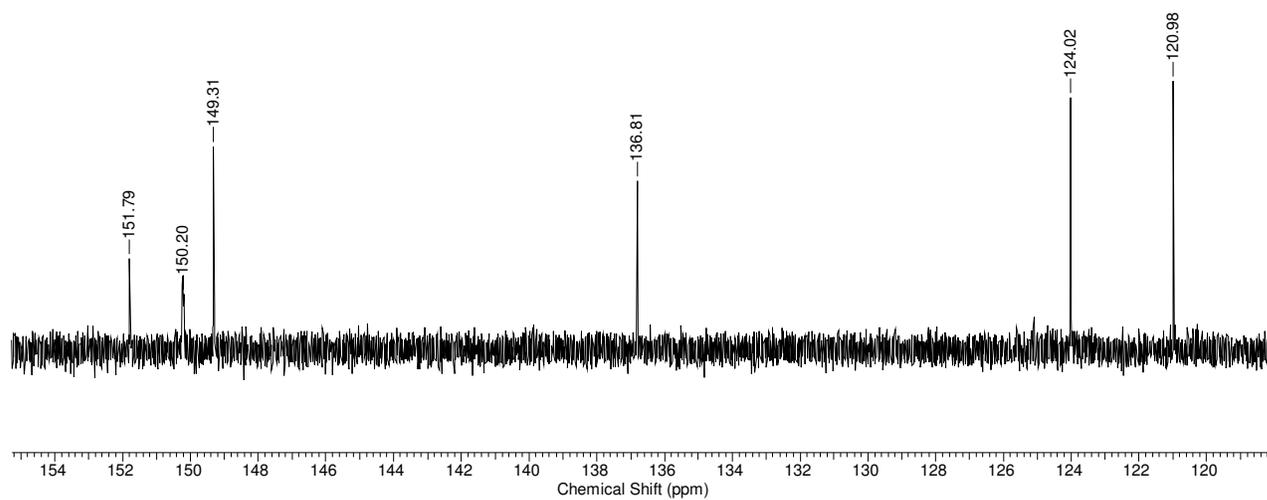
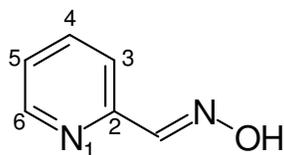


FIG. 8.23 - Espectro de RMN ^{13}C da 2-piridinoaldoxima expandido.

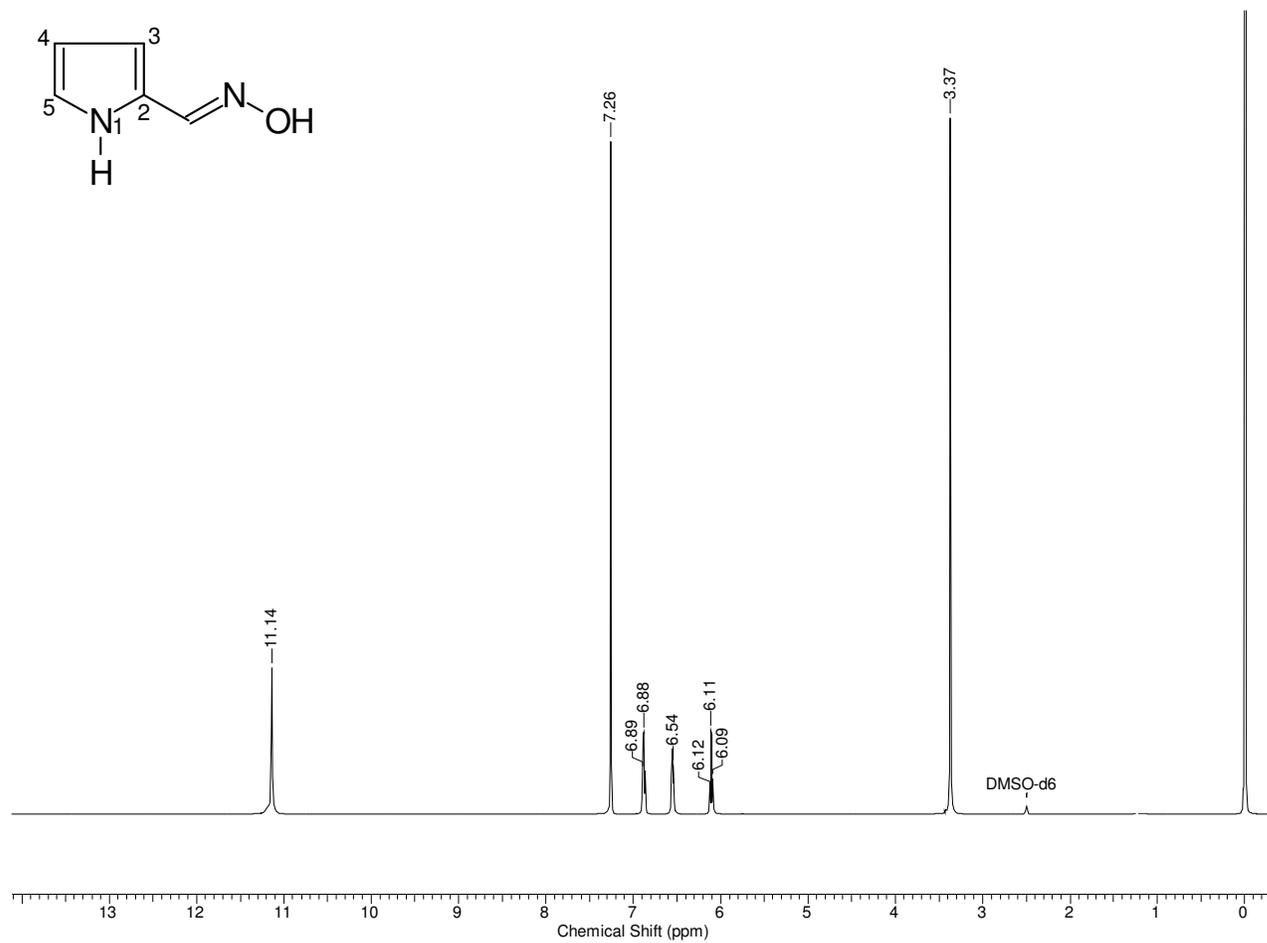


FIG. 8.24 - Espectro de RMN ¹H da 2-pirroilaloxima.

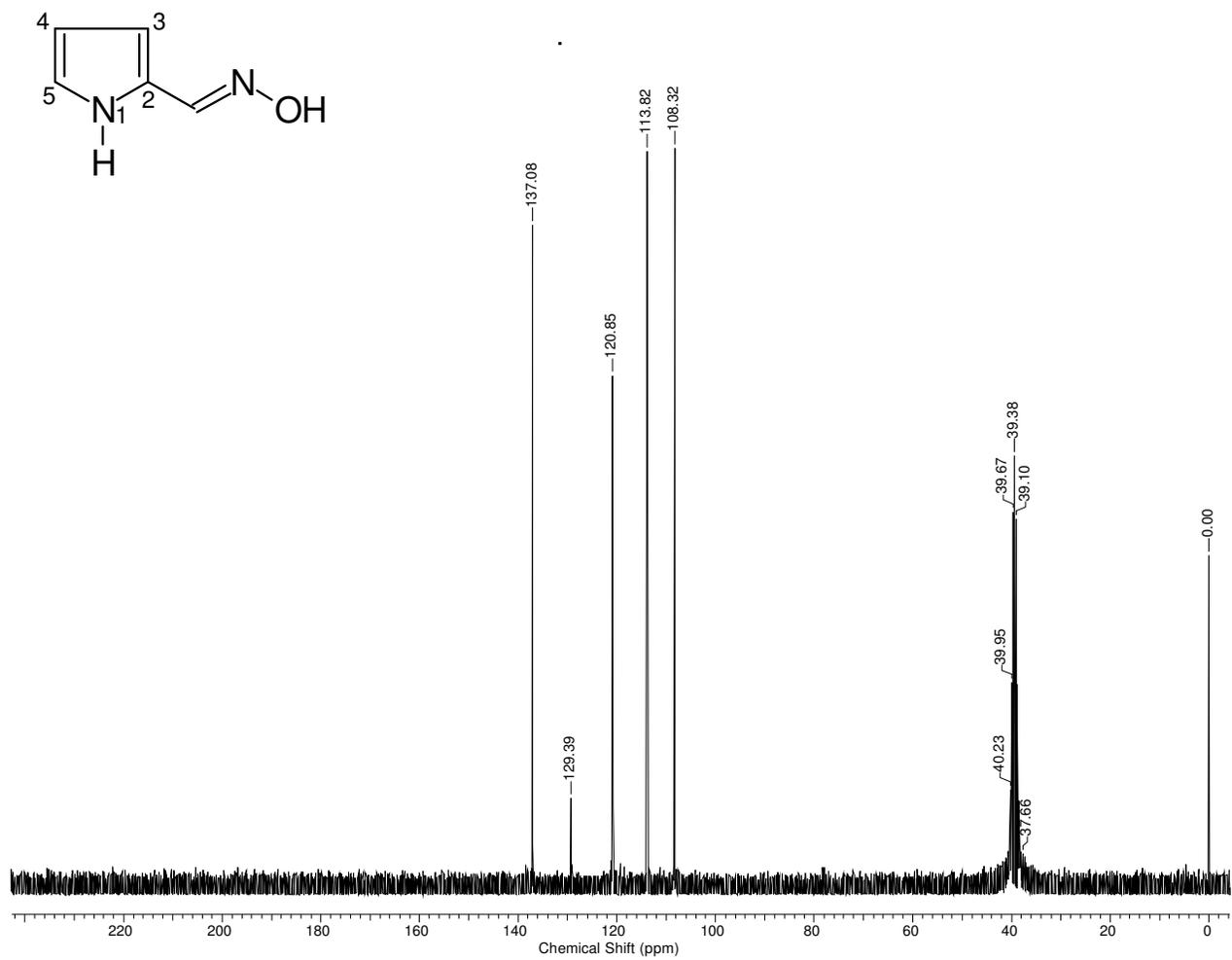


FIG. 8.25 - Espectro de RMN ^{13}C da 2-pirroilaldoxima.

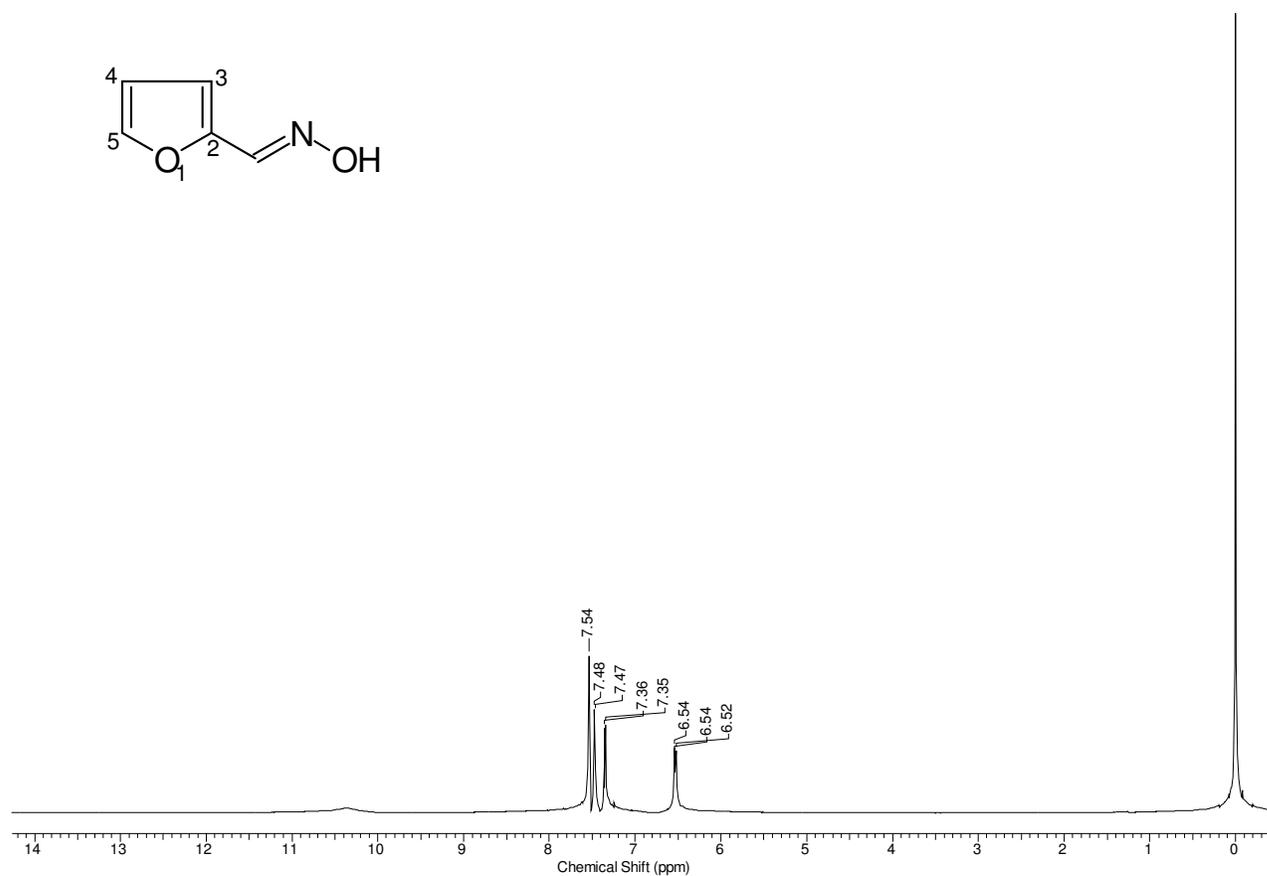


FIG. 8.26 – Espectro de RMN ¹H da 2-furfuraldoxima.

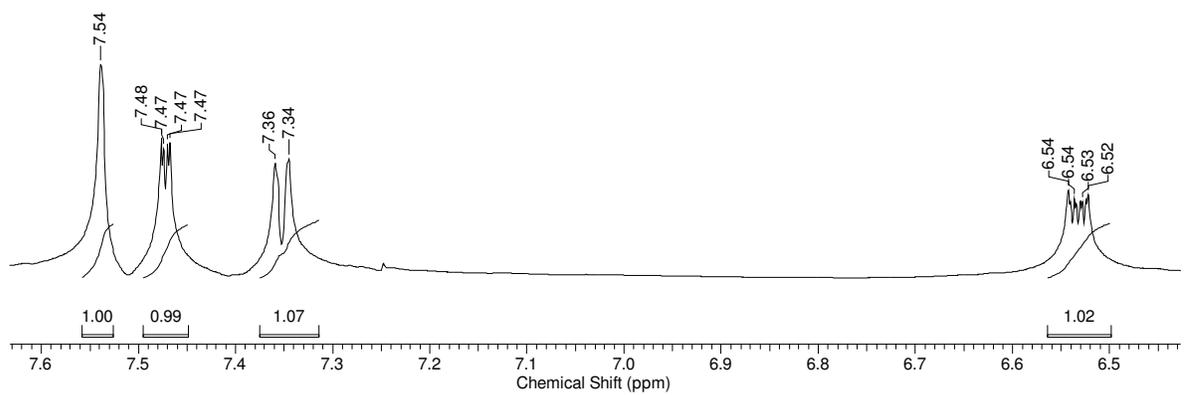
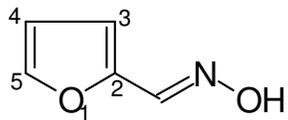


FIG. 8.27- Espectro de RMN ^1H da 2-fururaldoxima expandido.

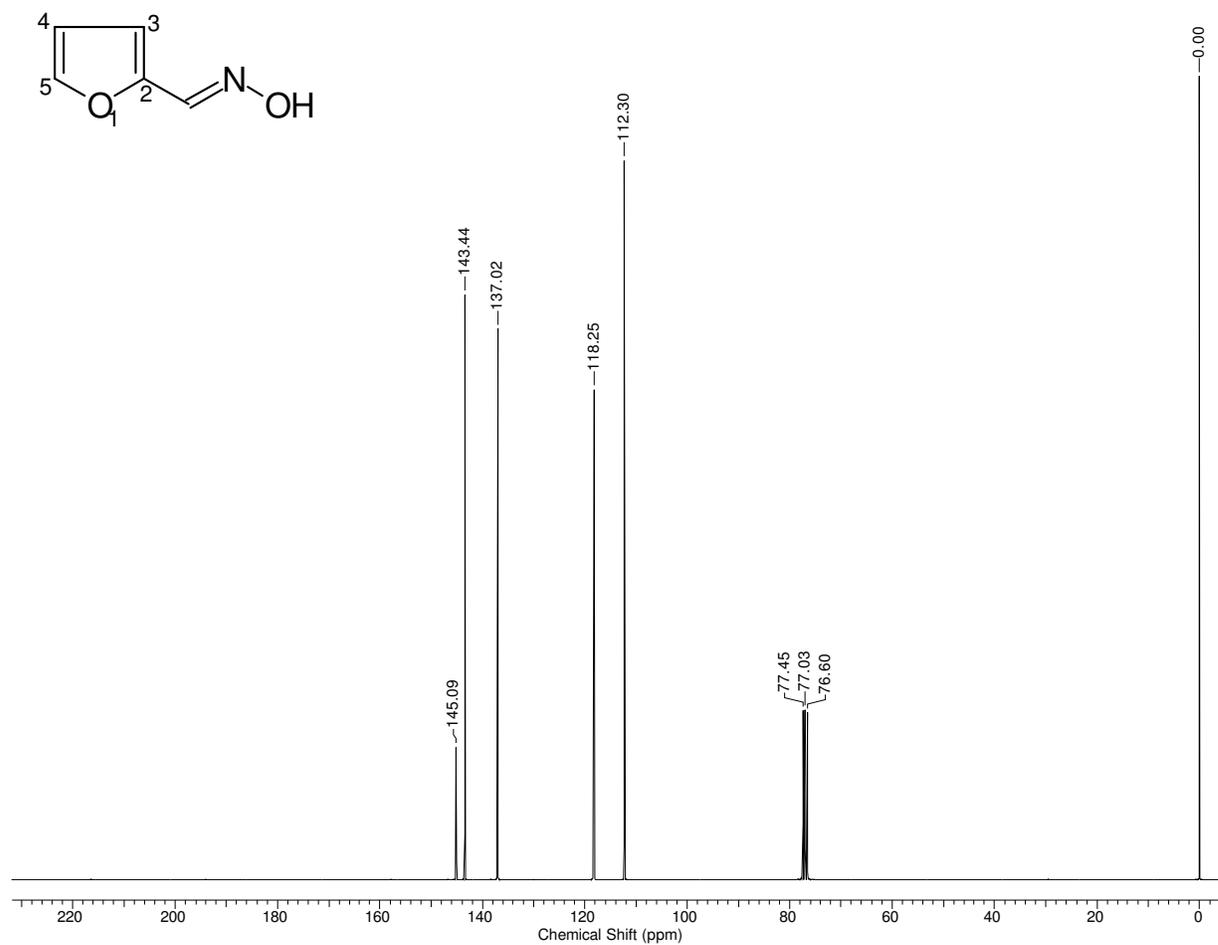


FIG. 8.28 - Espectro de RMN ^{13}C da 2-furfuraldoxima.

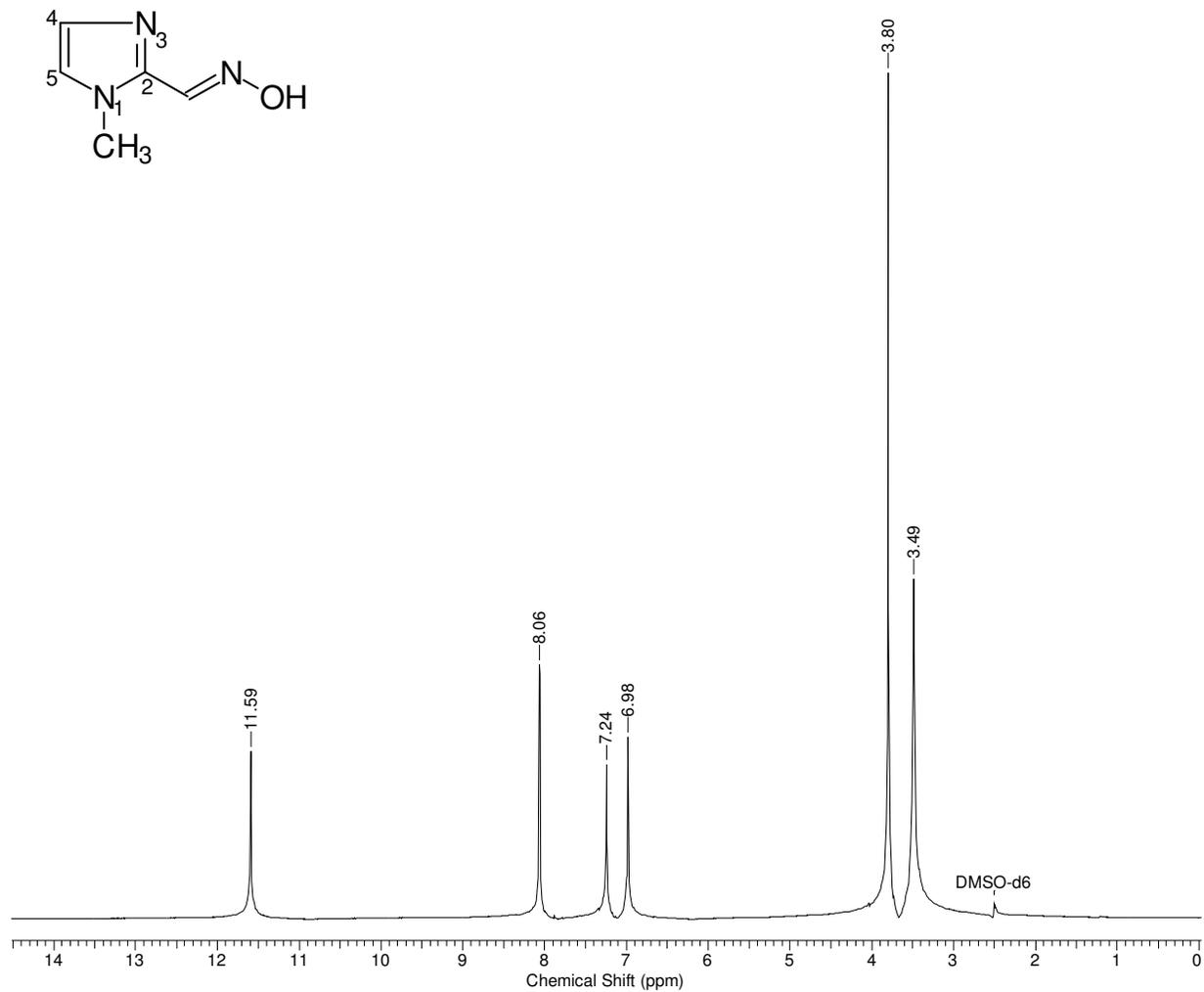


FIG. 8. 29 - Espectro de RMN ¹H da 1-metil-2-imidazoilaloxima.

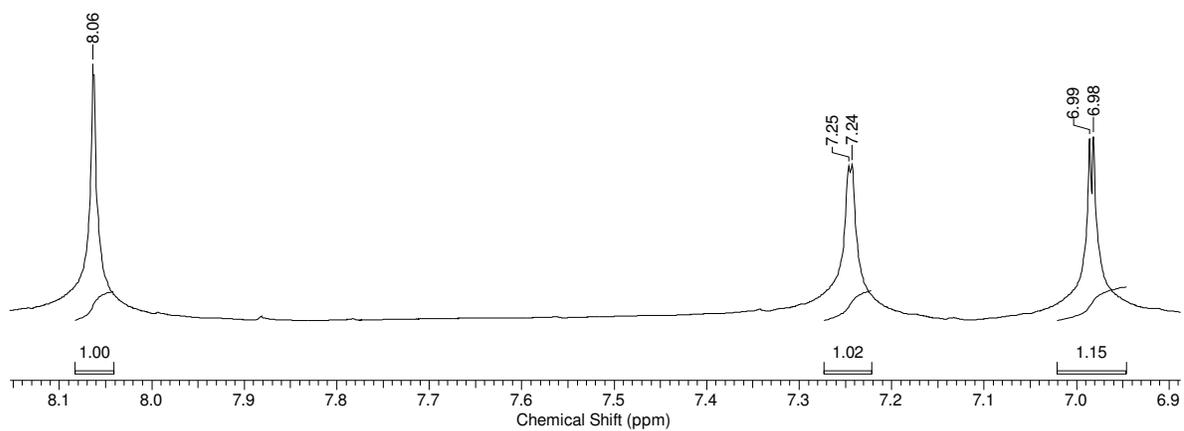
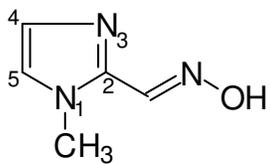


FIG. 8.30 - Espectro de RMN ^1H da 1-metil-2-imidazoilaloxima expandido.

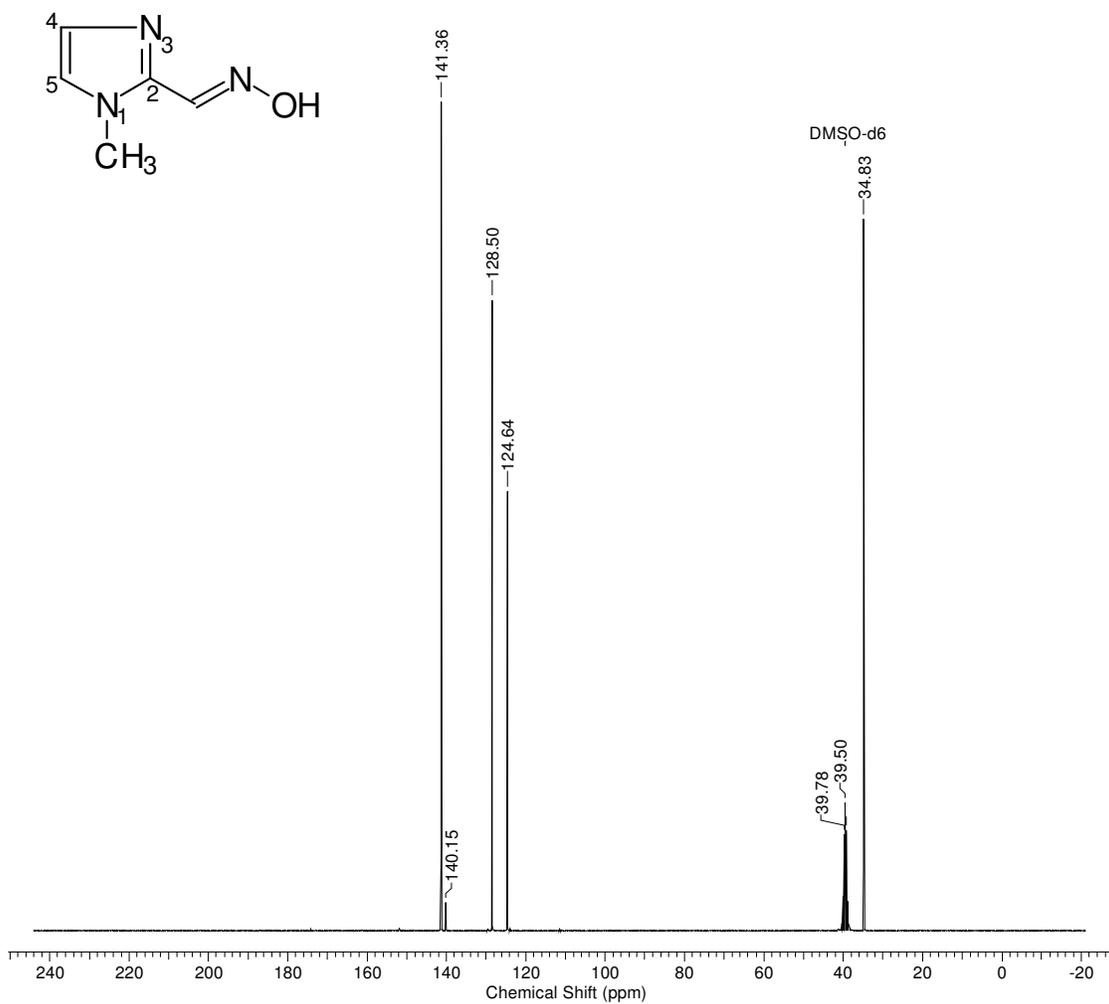


FIG. 8.31 - Espectro de RMN ^{13}C da 1-metil-2-imidazoilaloxima.

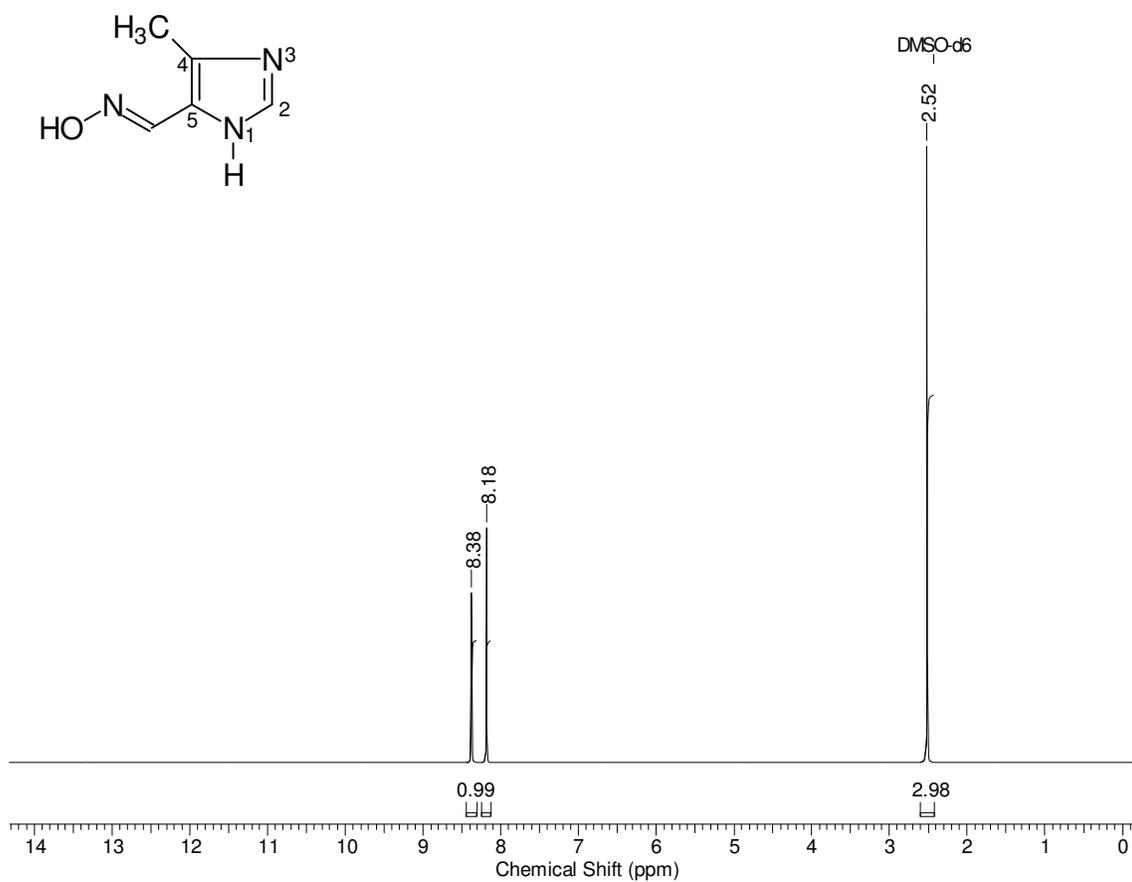


FIG. 8.32 - Espectro de RMN ^1H da 4-metil-5-imidazoilaloxima.

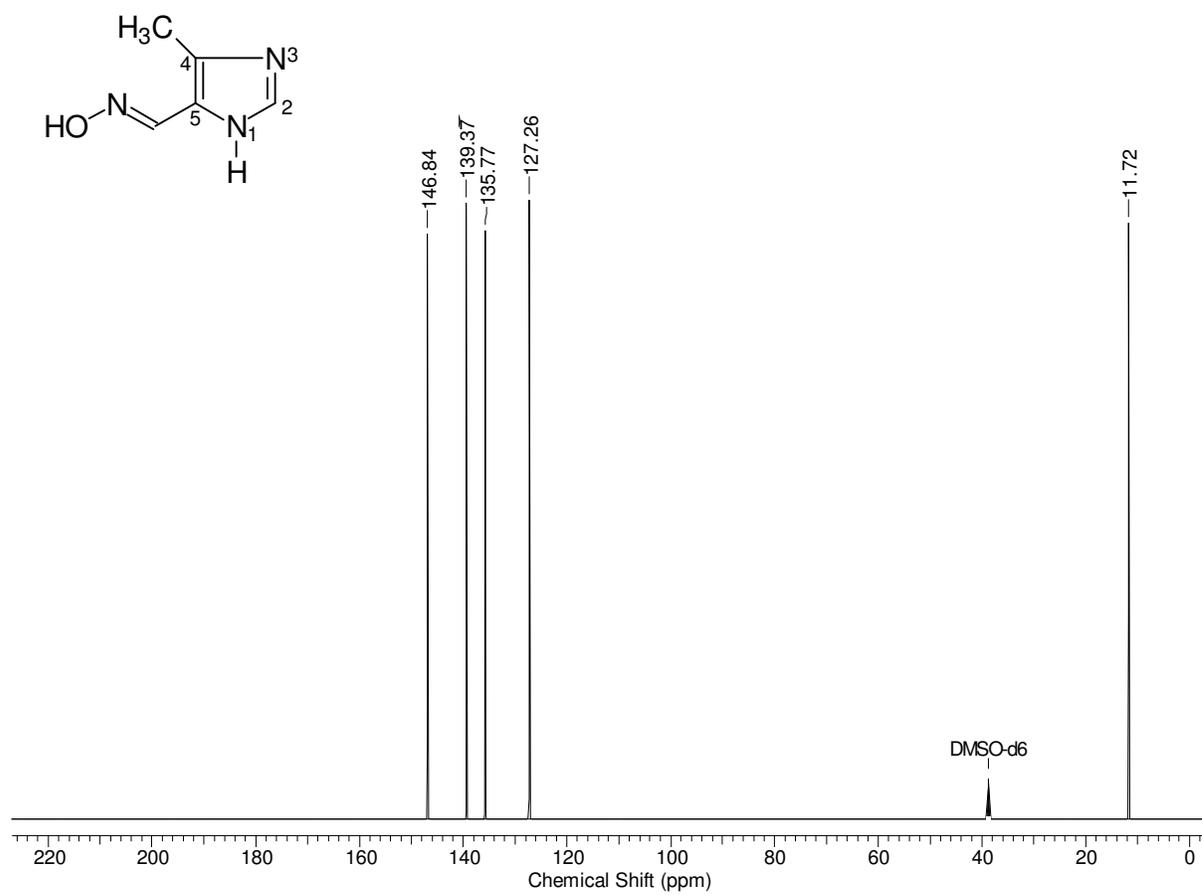


FIG. 8.33 - Espectro de RMN ^{13}C da 4-metil-5-imidazoilaloxima.

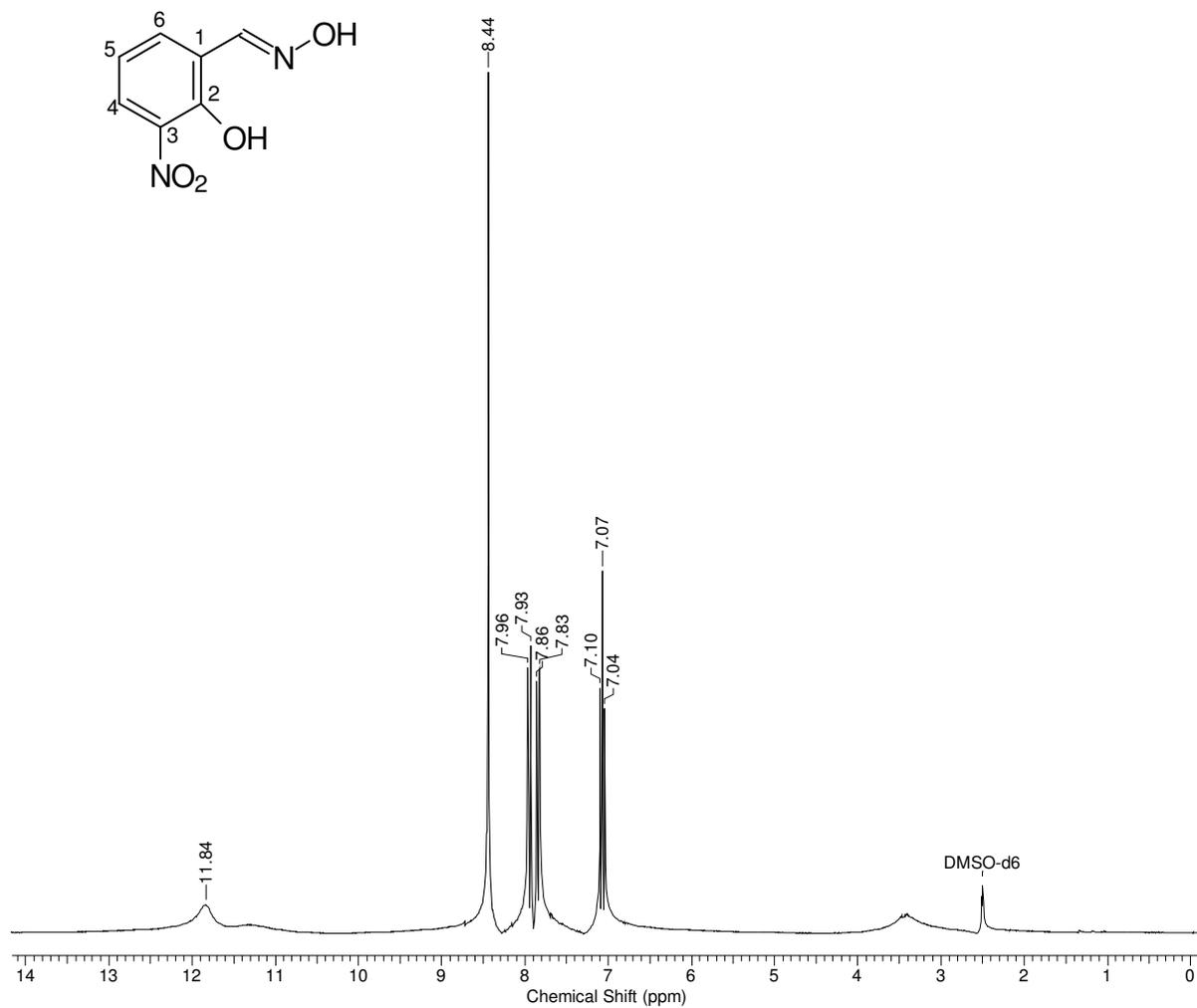


FIG. 8.34 - Espectro de RMN ¹H da 3-nitro-salicilaldoxima.

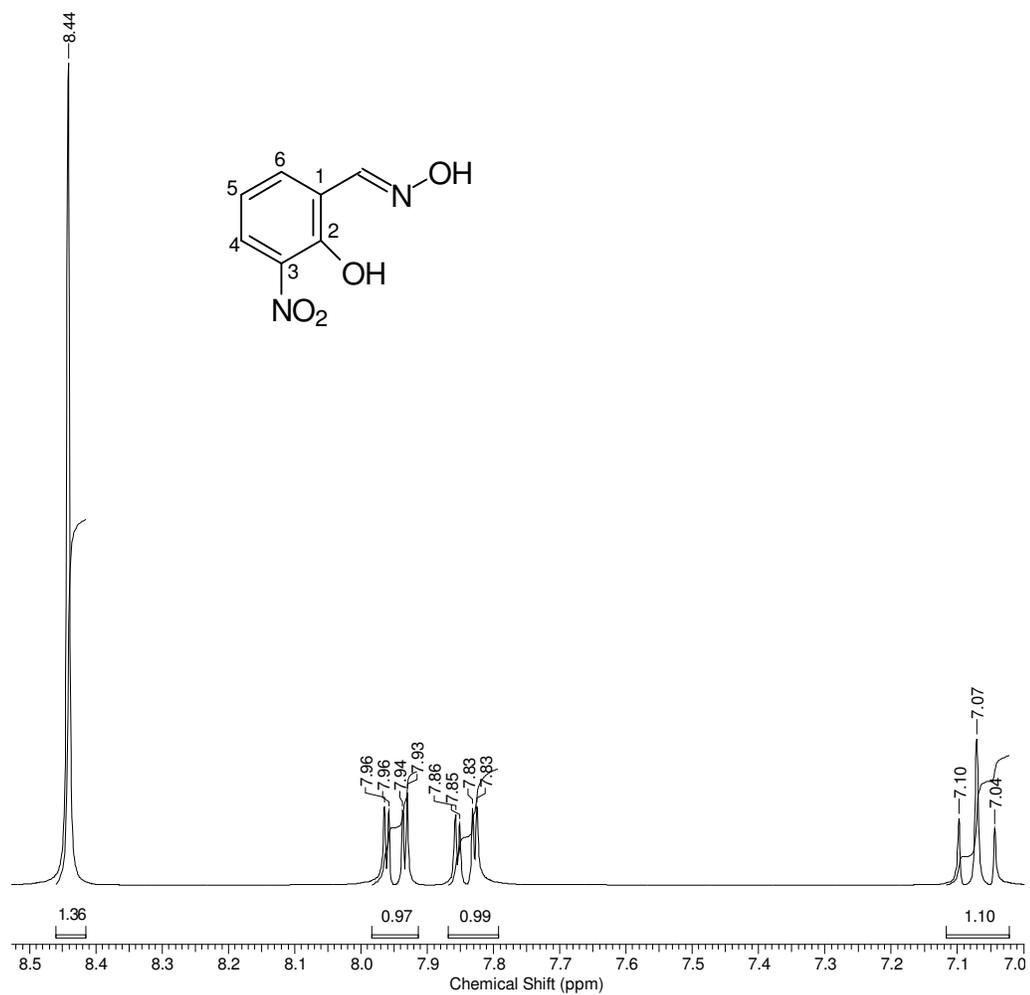


FIG. 8.35 - Espectro de RMN ¹H da 3-nitro-salicilaldoxima expandido.

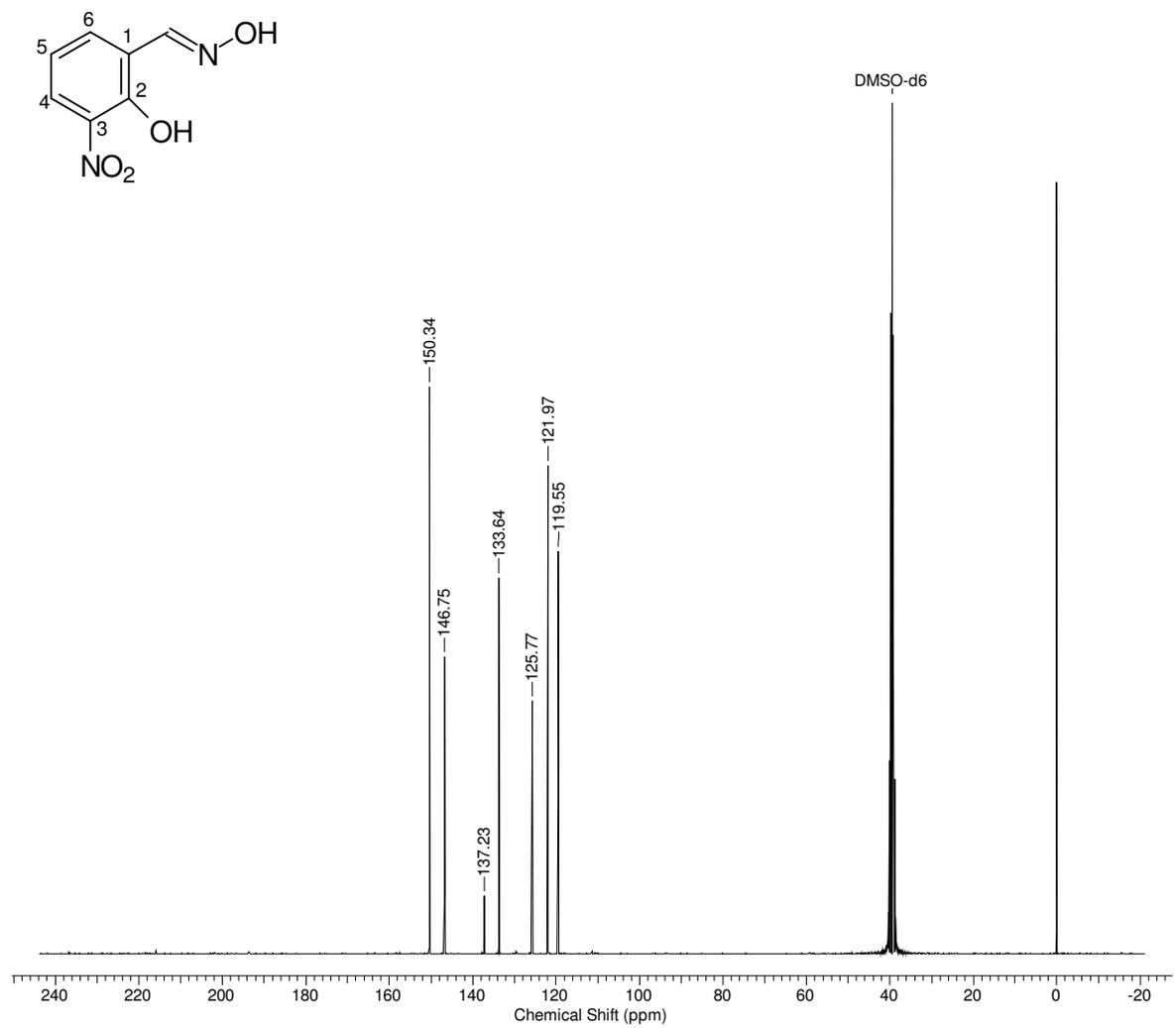


FIG. 8.36 - Espectro de RMN ¹³C da 3-nitro-salicilaldoxima.

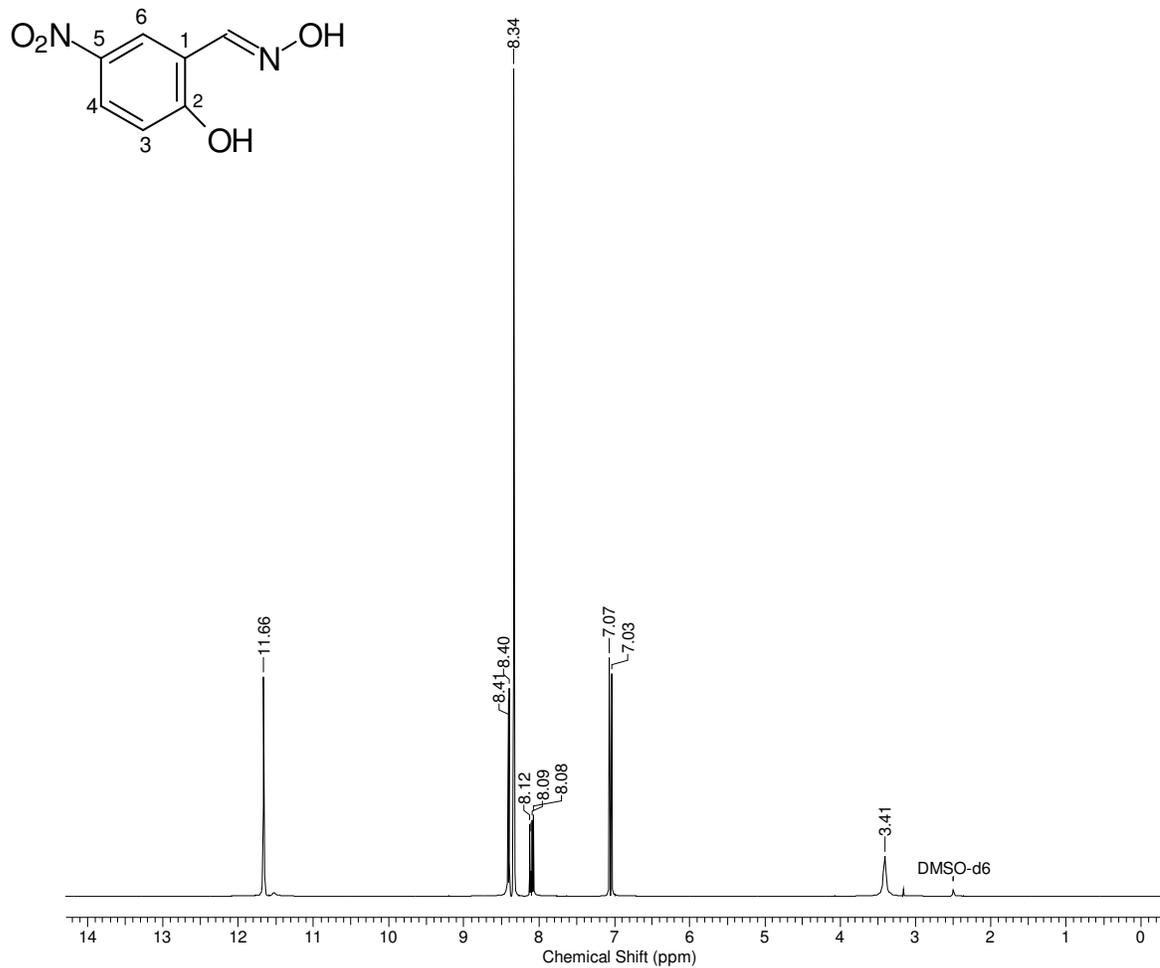


FIG. 8.37 - Espectro de RMN ¹H da 5-nitro-salicilaldoxima.

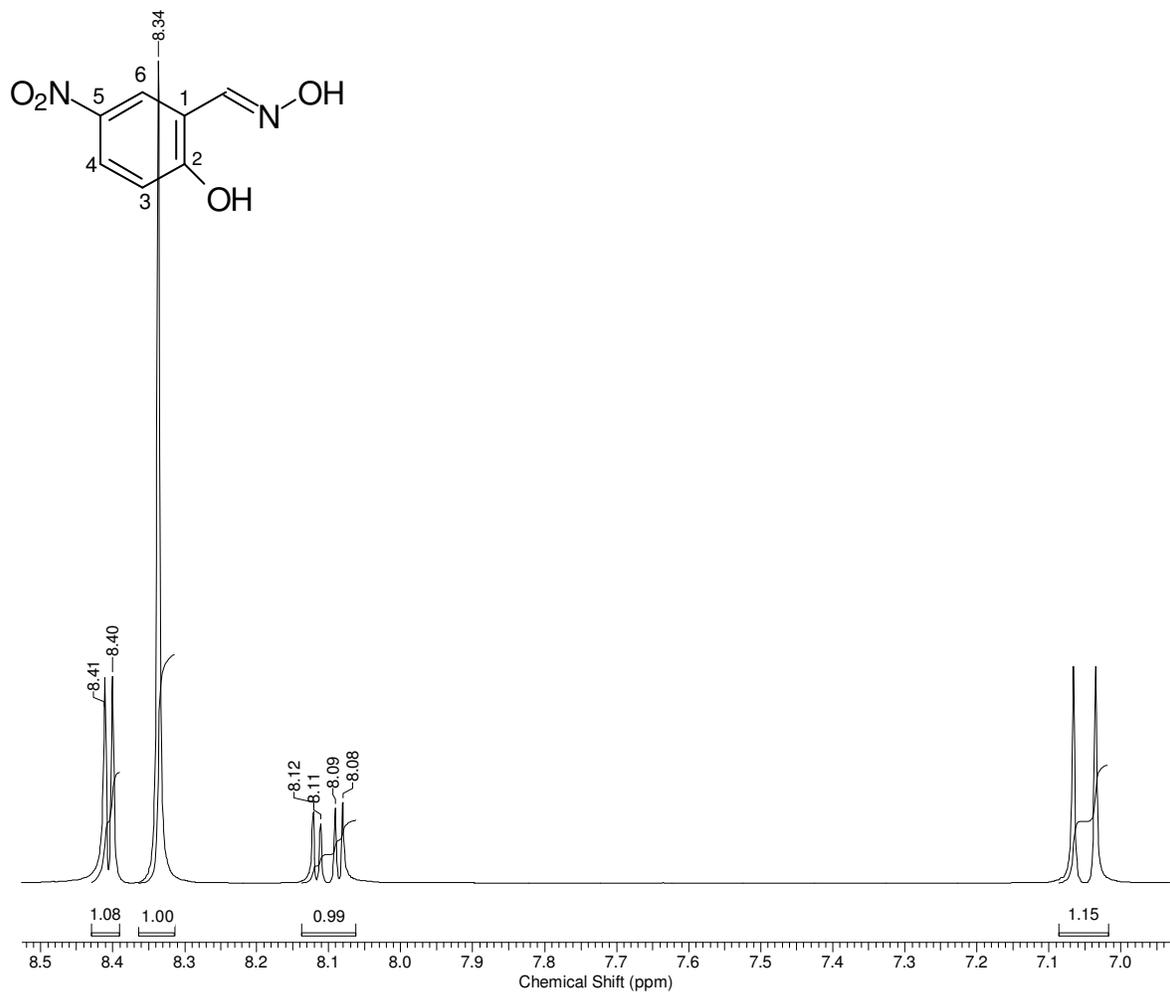


FIG. 8.38 - Espectro de RMN ^1H da 5-nitro-salicilaldoxima expandido.

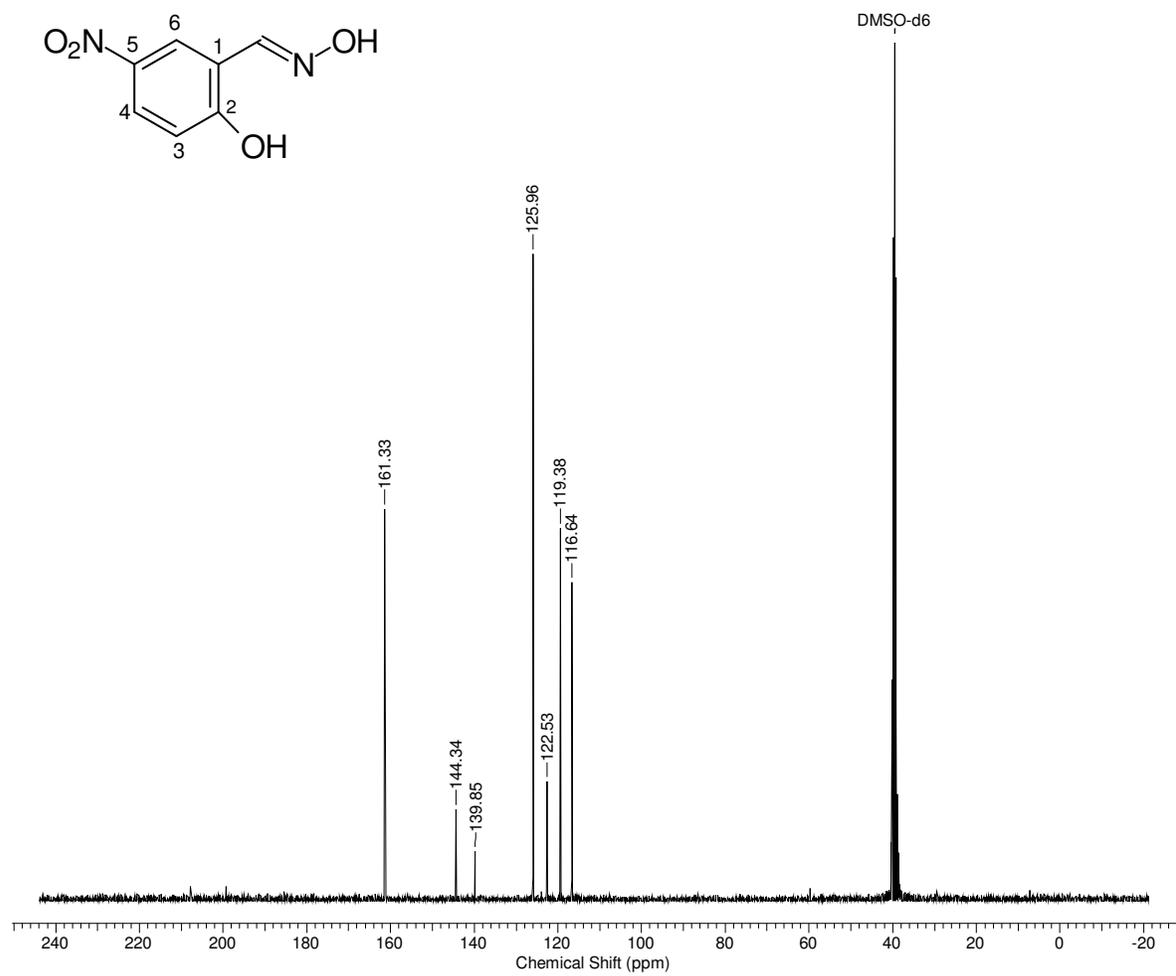


FIG. 8.39 - Espectro de RMN ^{13}C da 5-nitro-salicilaldoxima.

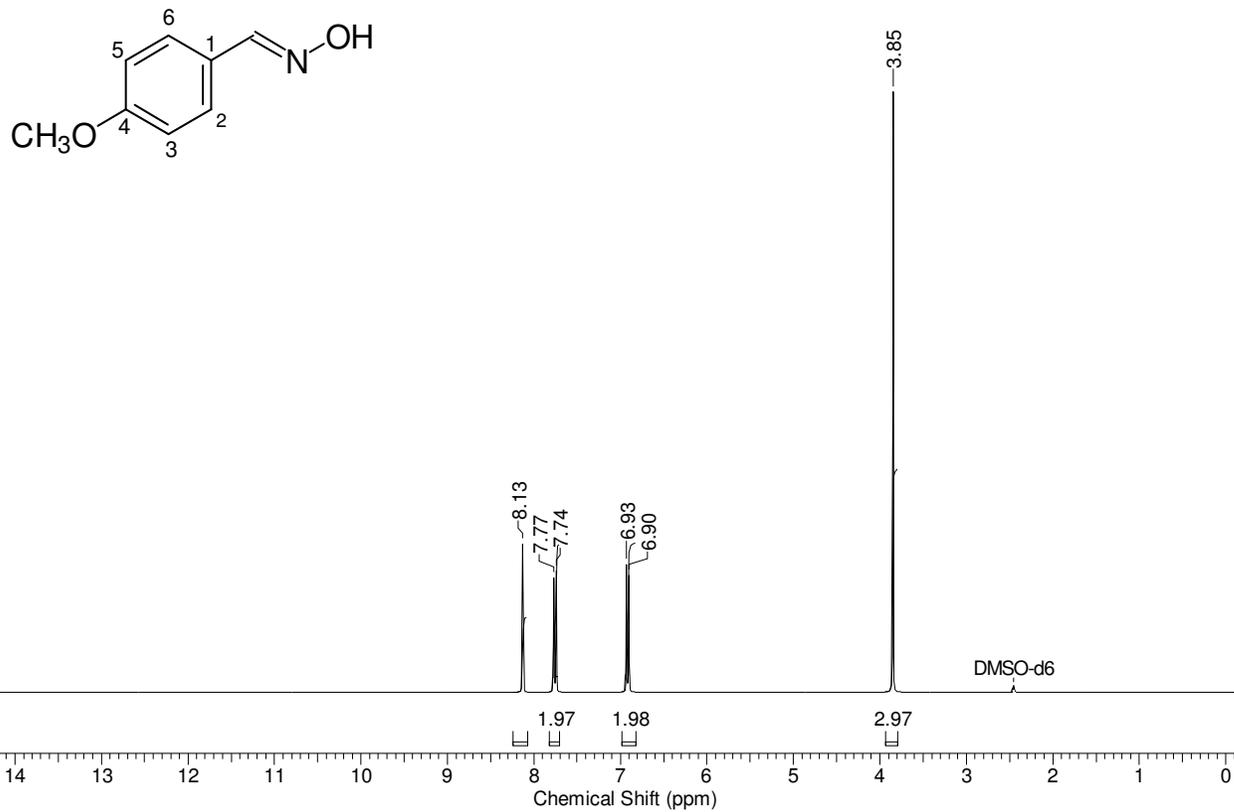


FIG. 8.40 - Espectro de RMN ^1H da 4-metoxi-benzaldoxima.

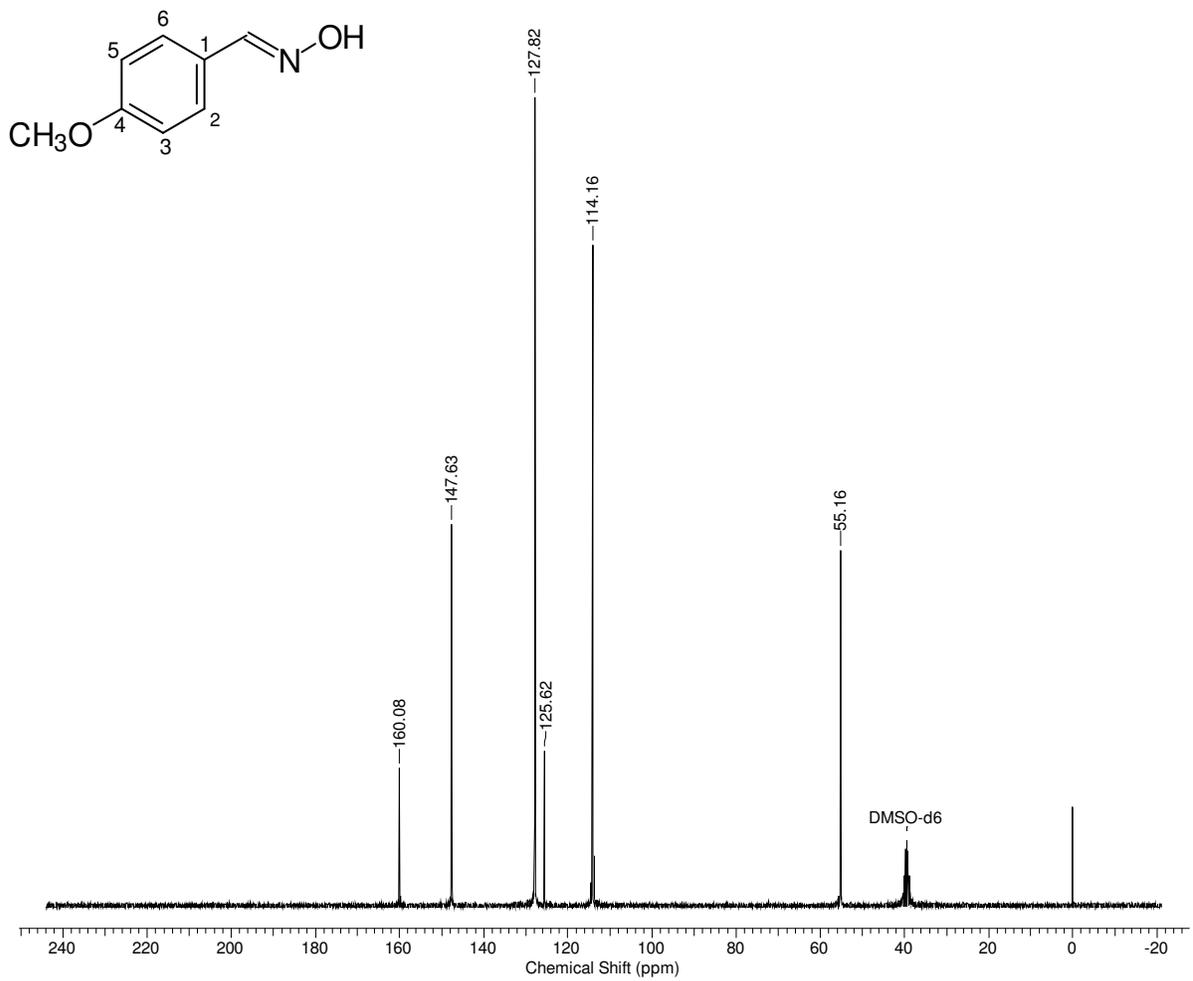


FIG. 8.41 - Espectro de RMN ¹³C da 4-metoxi-benzaldoxima.

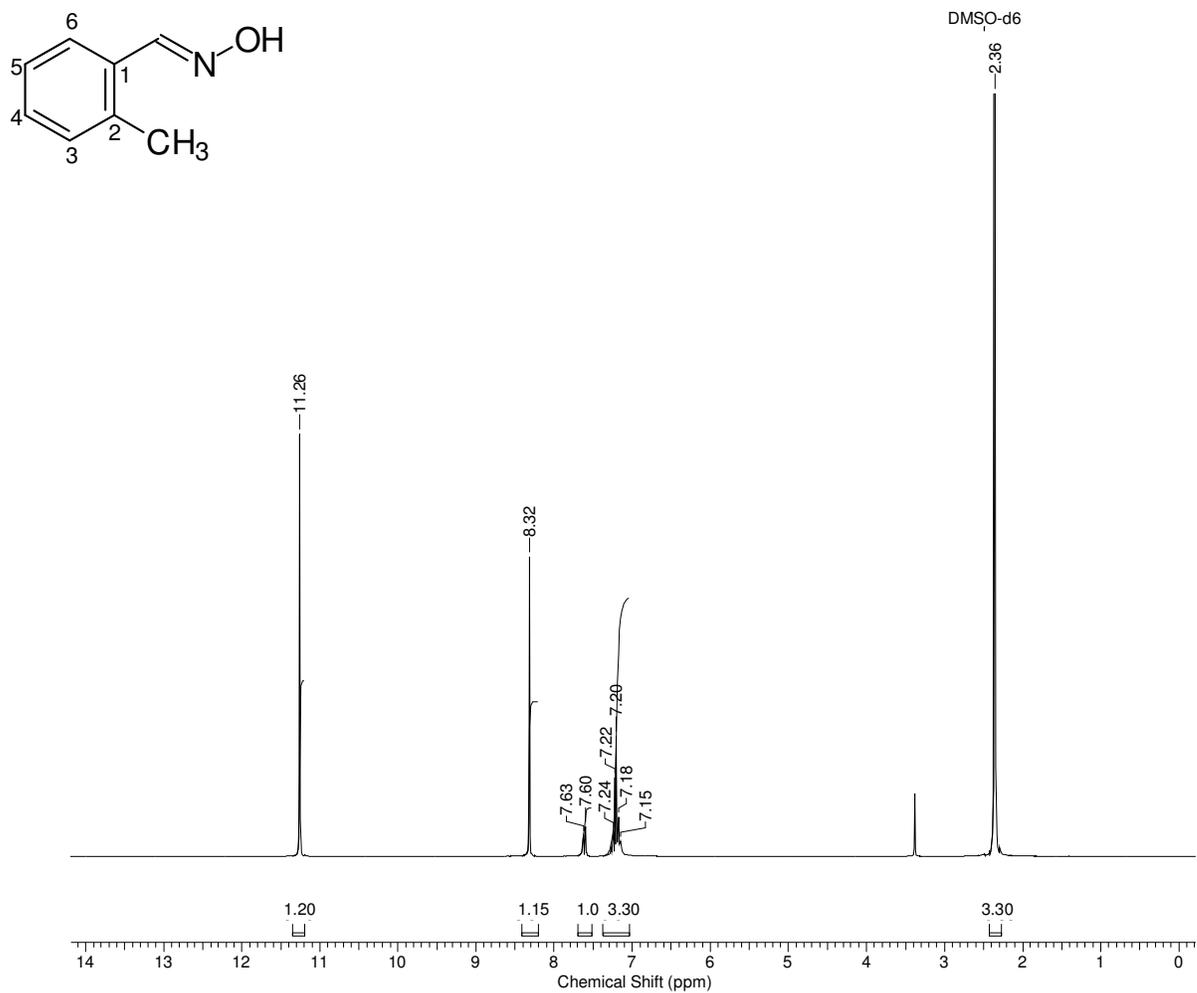


FIG. 8.42 - Espectro de RMN ¹H da *o*-touilaloxima.

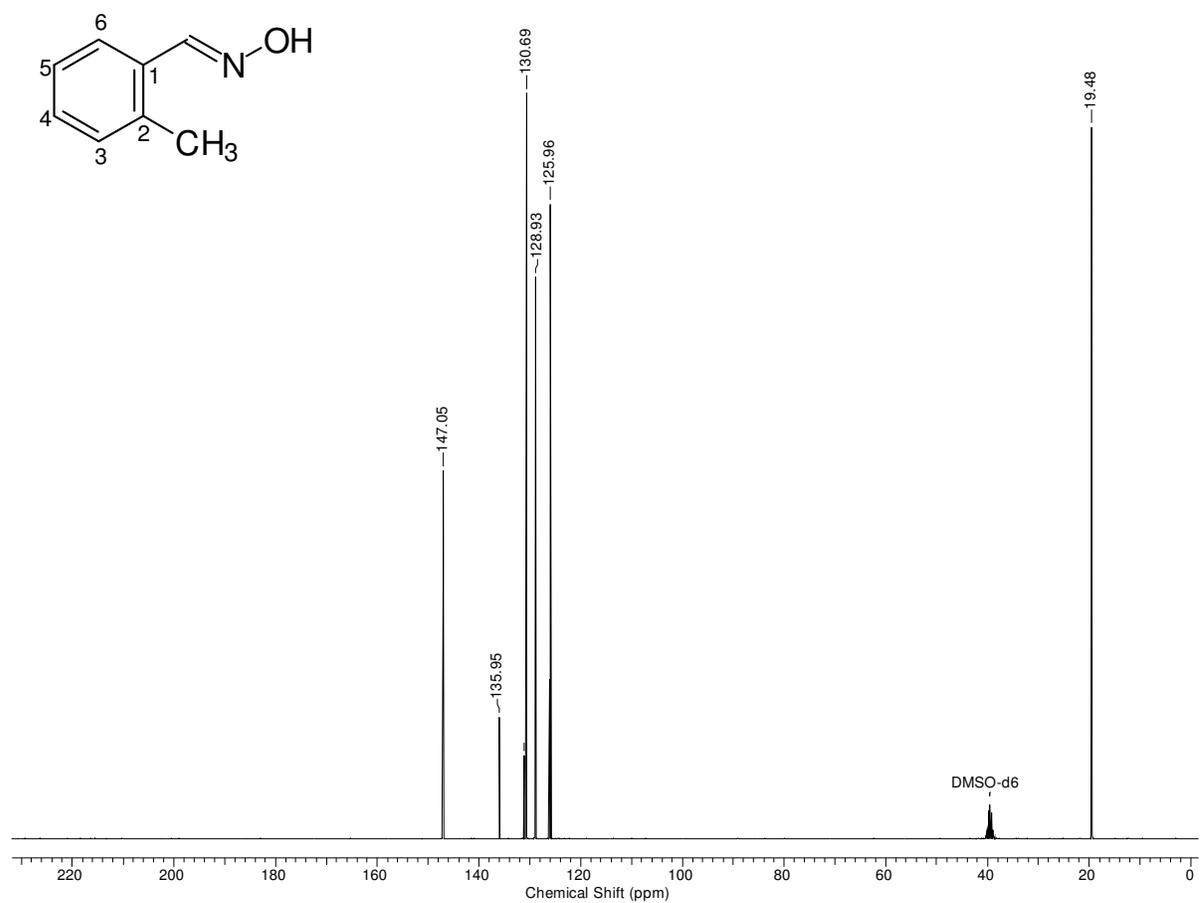


FIG. 8.43 - Espectro de RMN ¹³C da *o*-touilaldoxima.

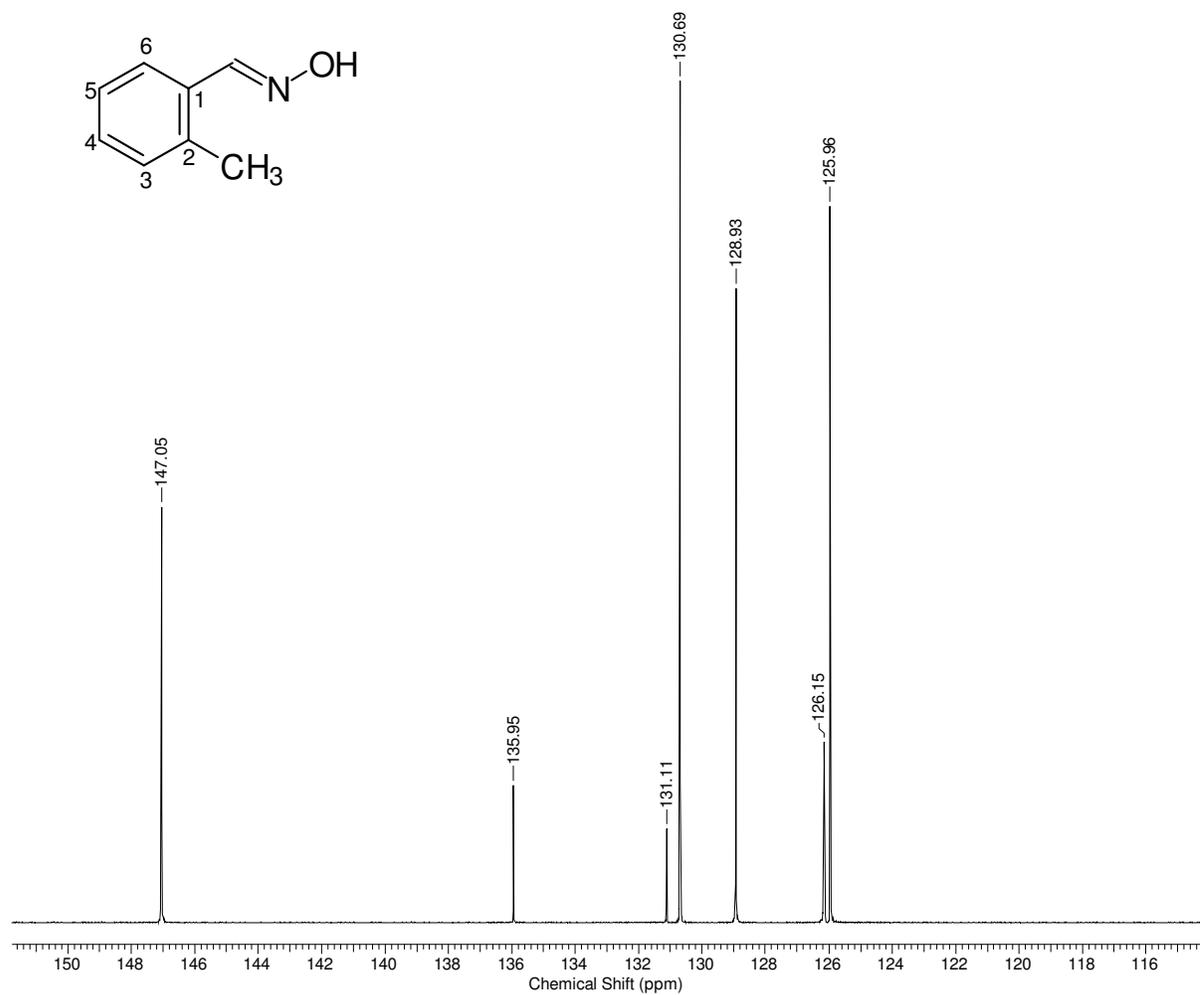


FIG. 8.44 - Espectro de RMN ¹³C da *o*-touilaloxima expandido.

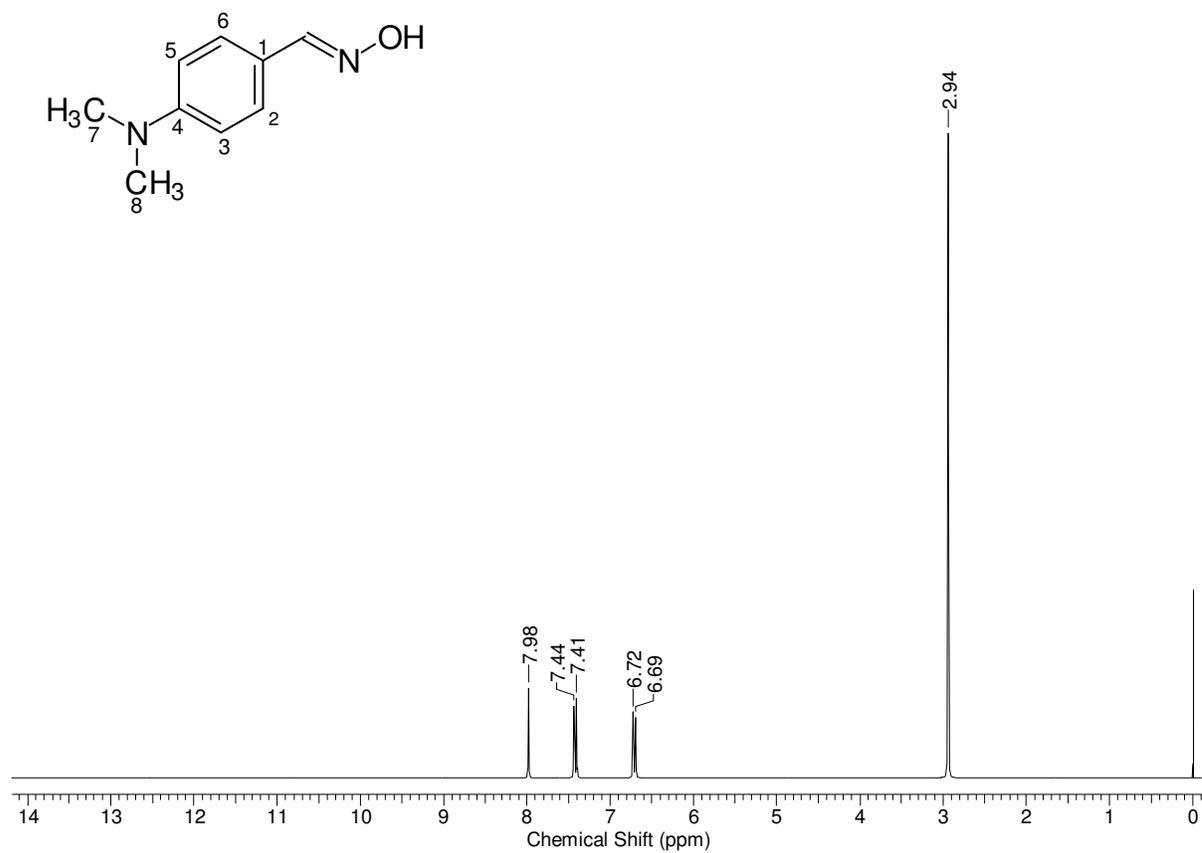


FIG. 8.45 - Espectro de RMN ¹H da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima.

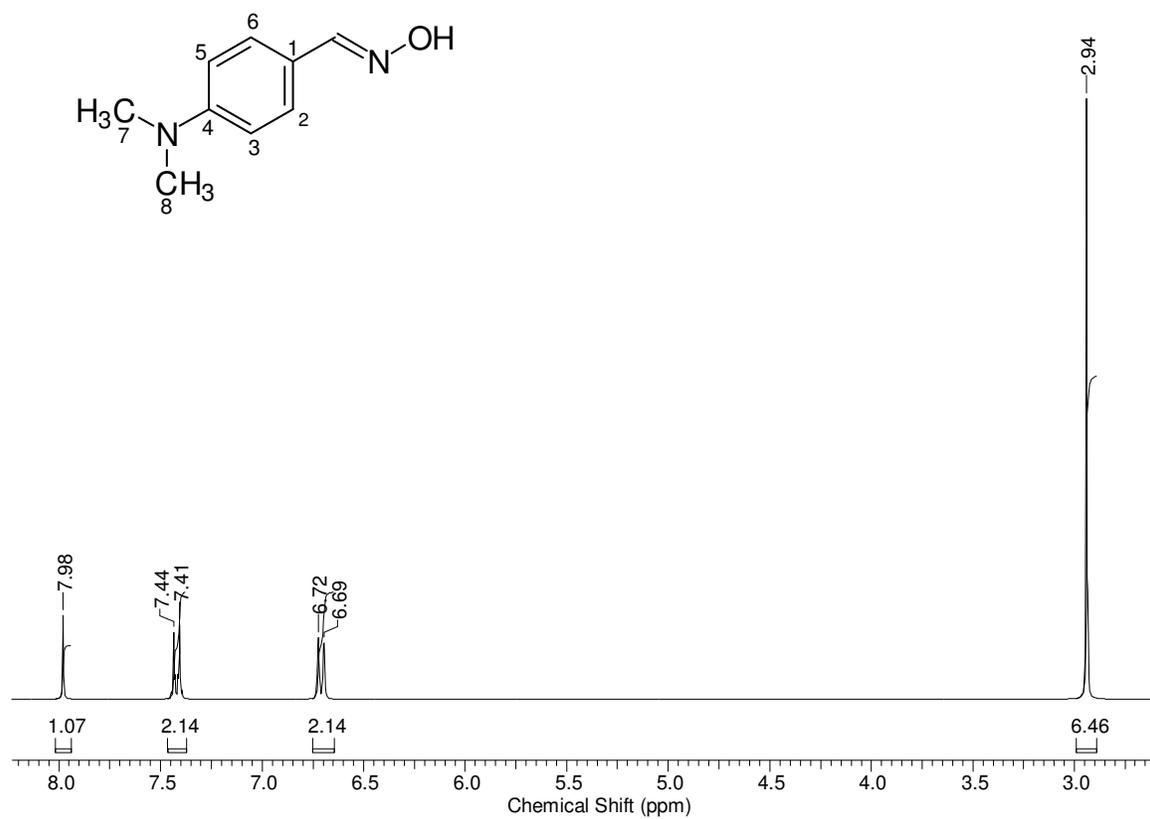


FIG. 8.46 - Espectro de RMN ¹H da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima expandido.

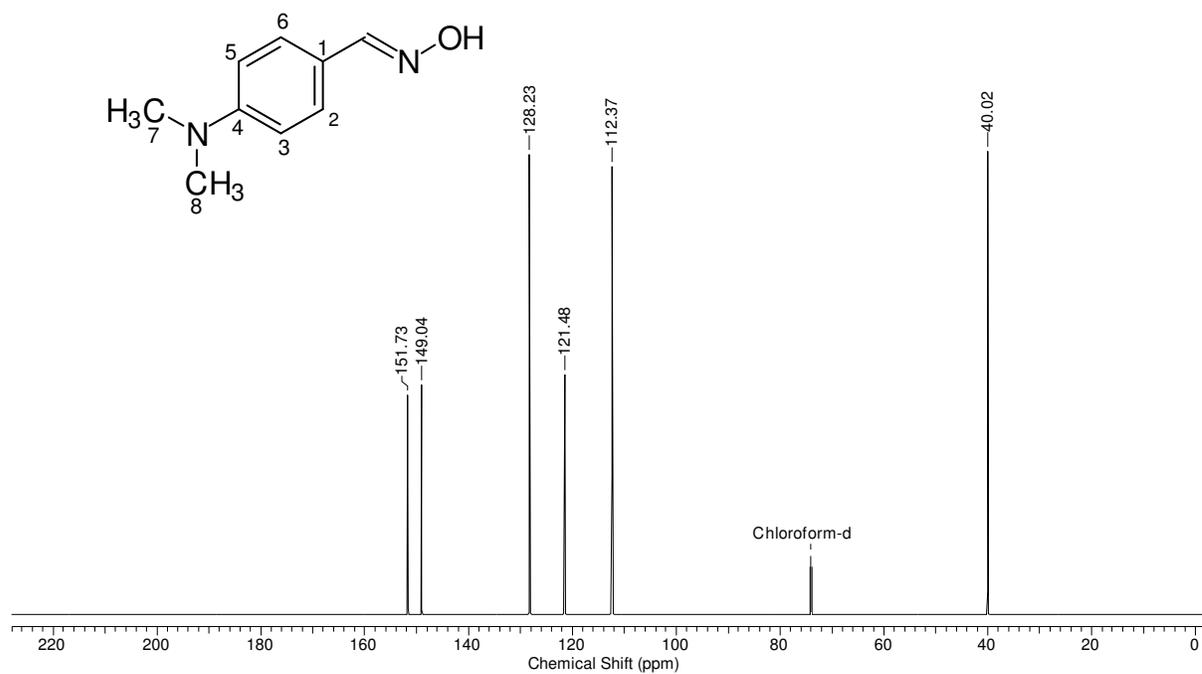


FIG. 8.47 - Espectro de RMN ^{13}C da *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldoxima.

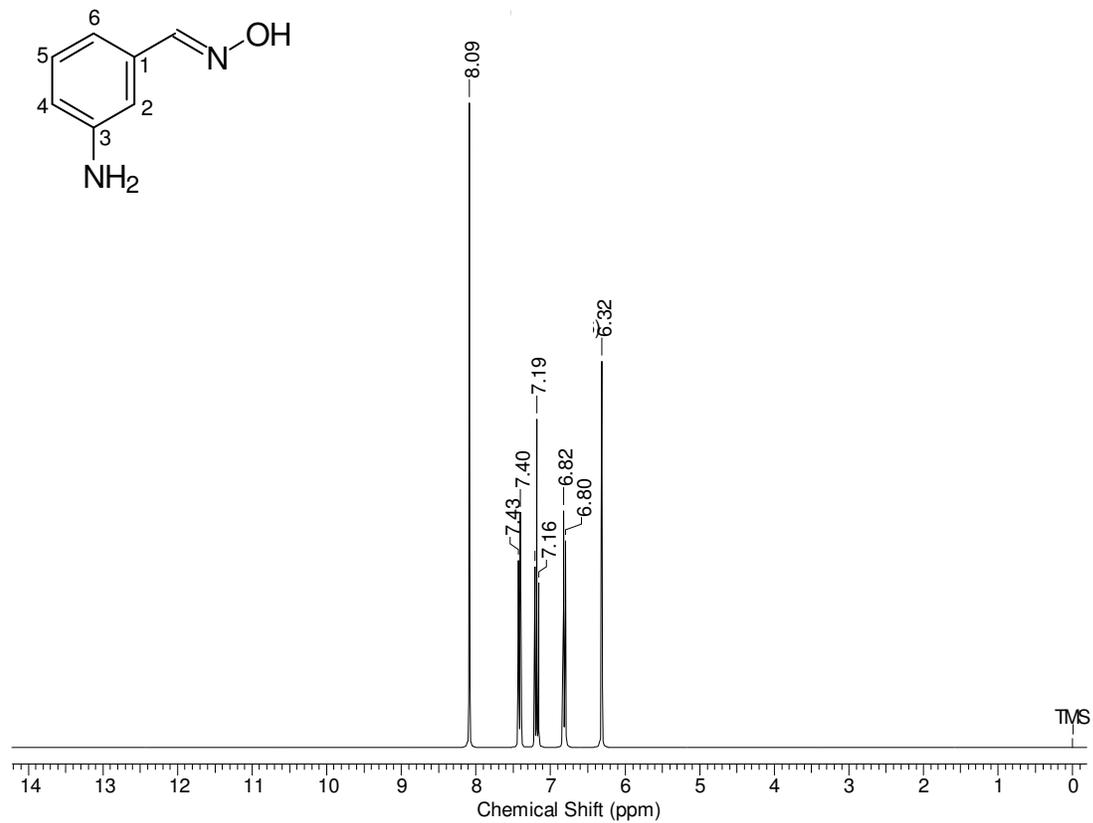


FIG. 8.48 - Espectro de RMN ¹H da *m*-aminobenzaldoxima.

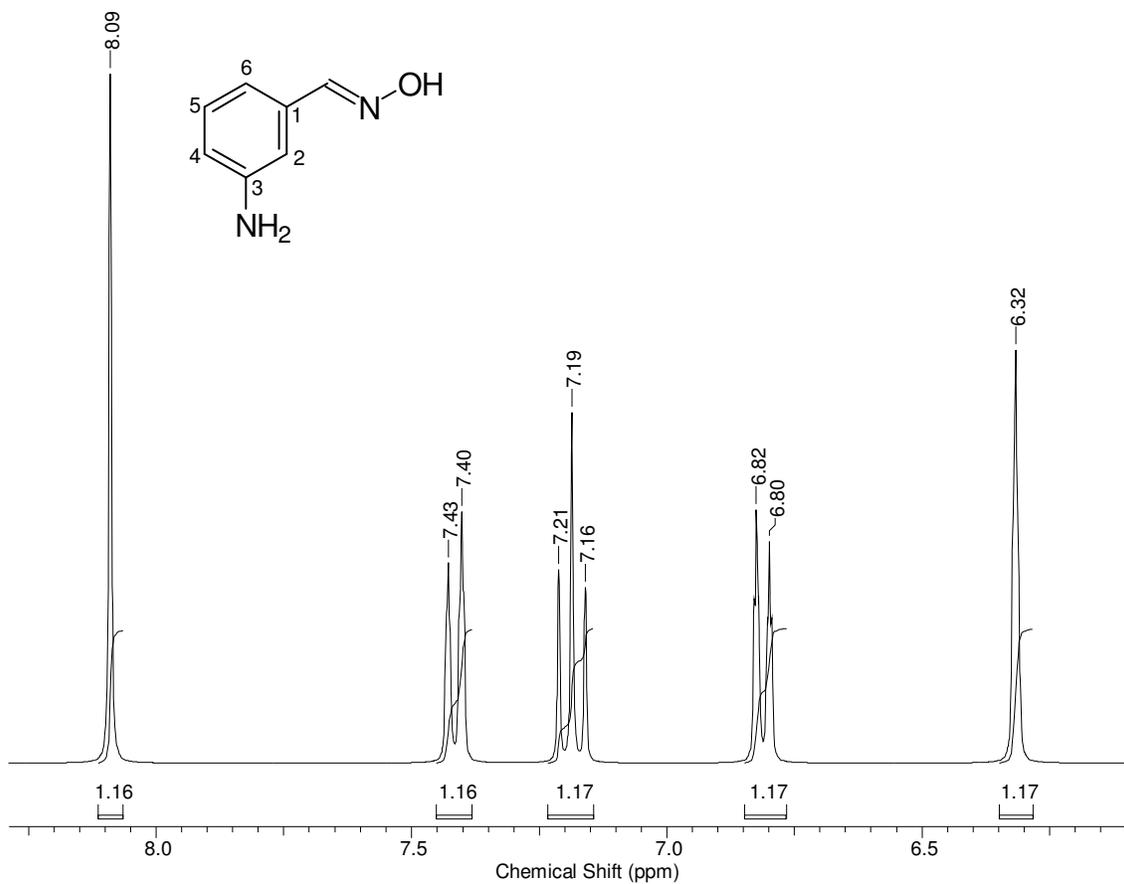


FIG. 8.49 - Espectro de RMN ^1H da *m*-aminobenzaldoxima expandido.

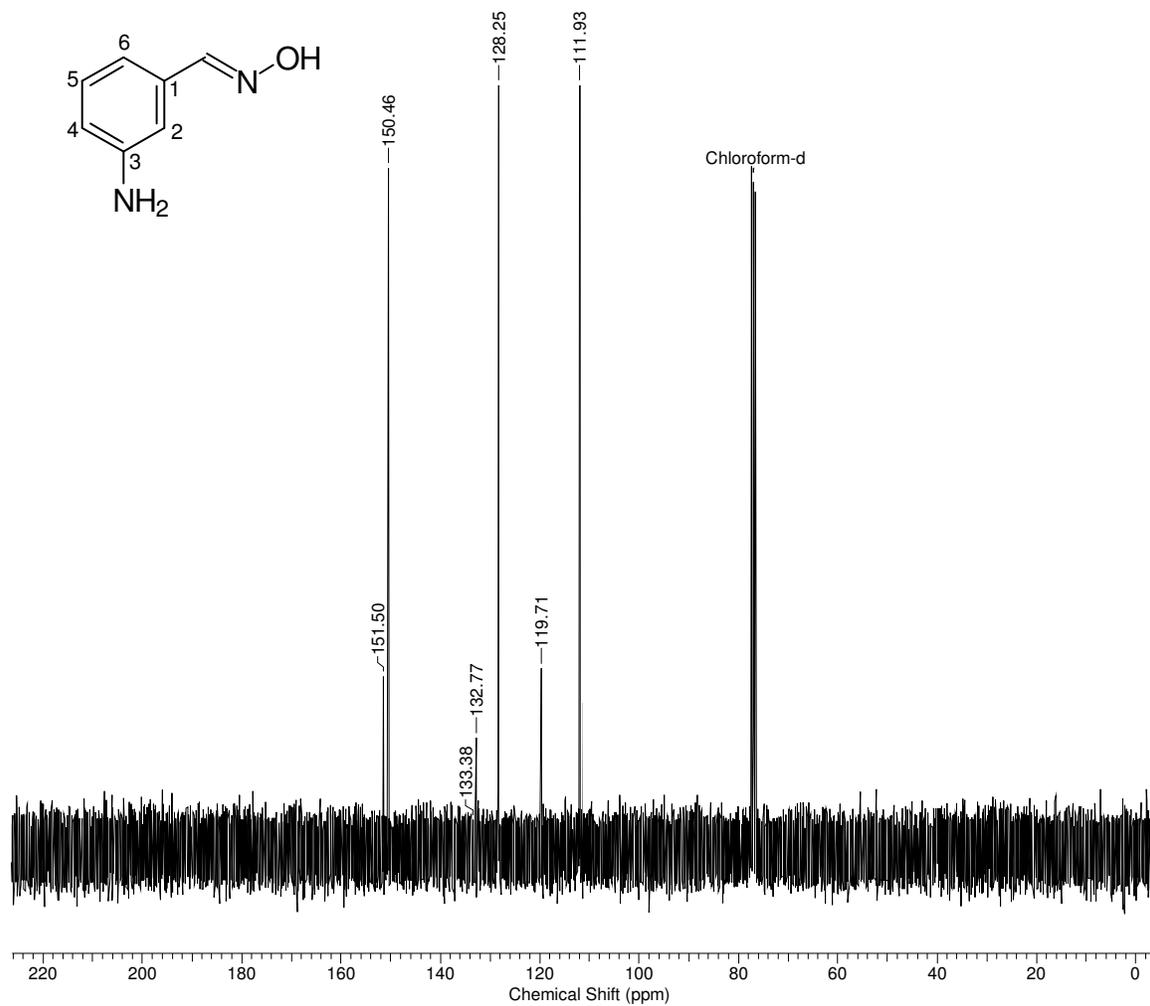


FIG. 8.50 - Espectro de RMN ^{13}C da *m*-aminobenzaldoxima.

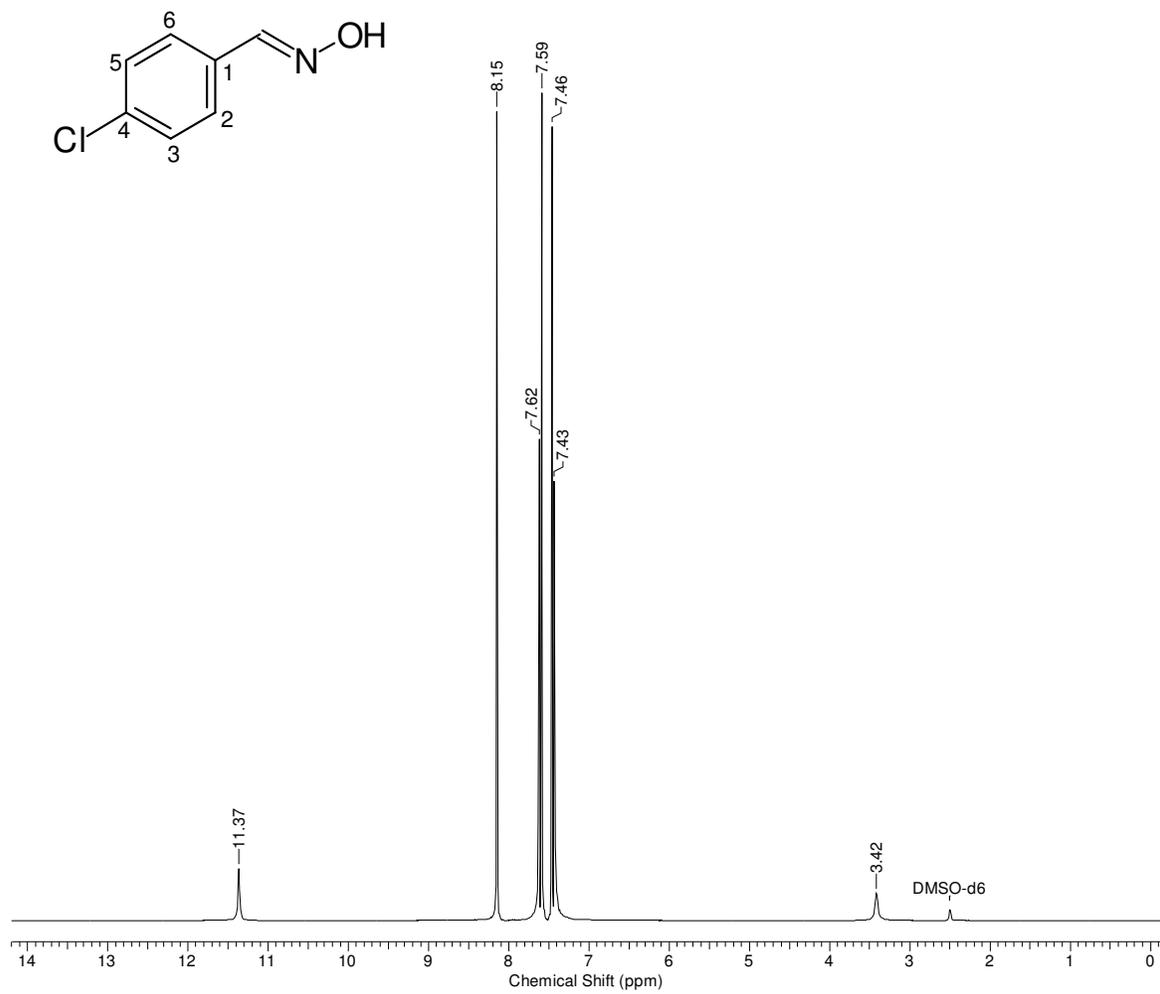


FIG. 8.51 - Espectro de RMN ^1H da 4-cloro-benzaldoxima.

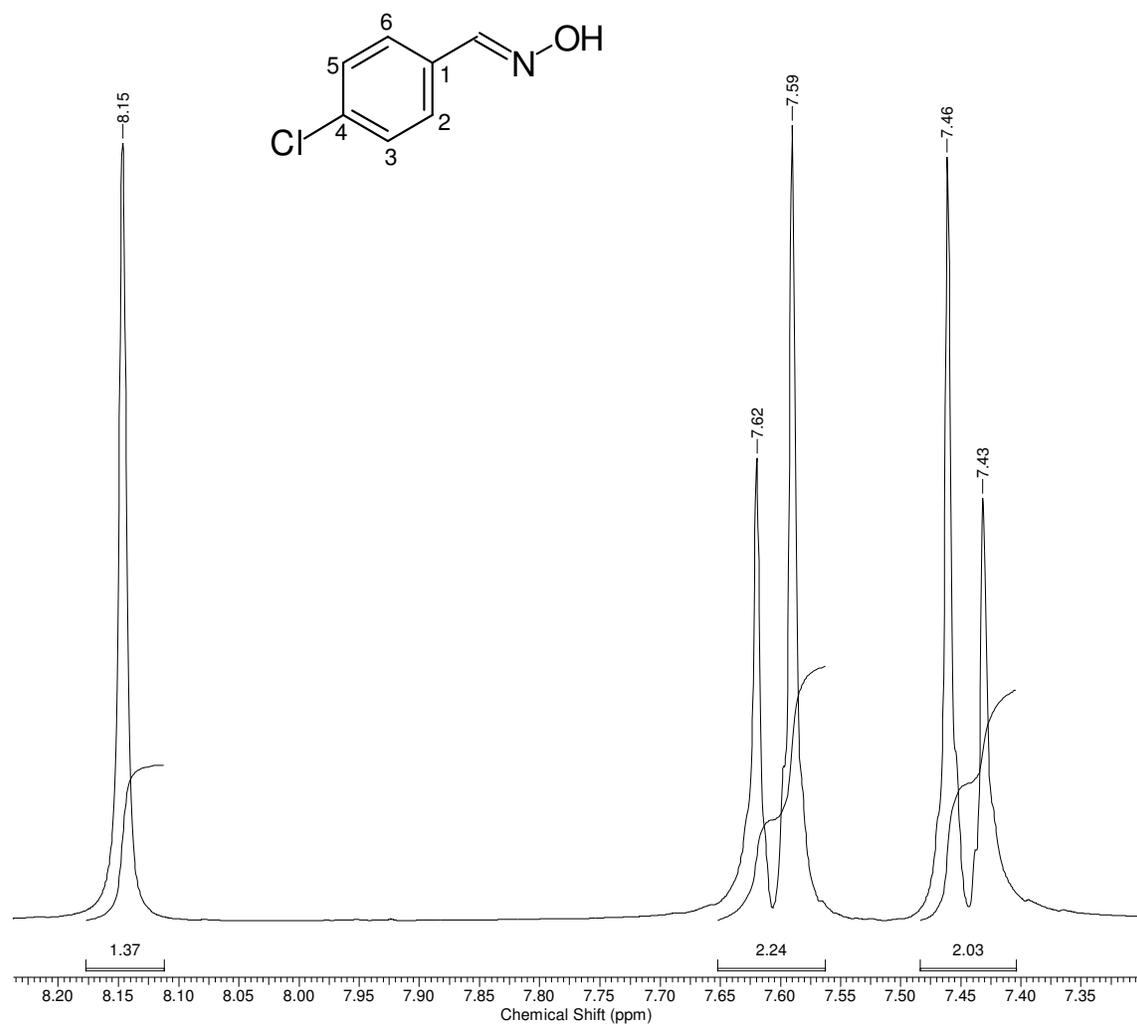


FIG. 8.52 - Espectro de RMN ^1H da 4-cloro-benzaldoxima expandido.

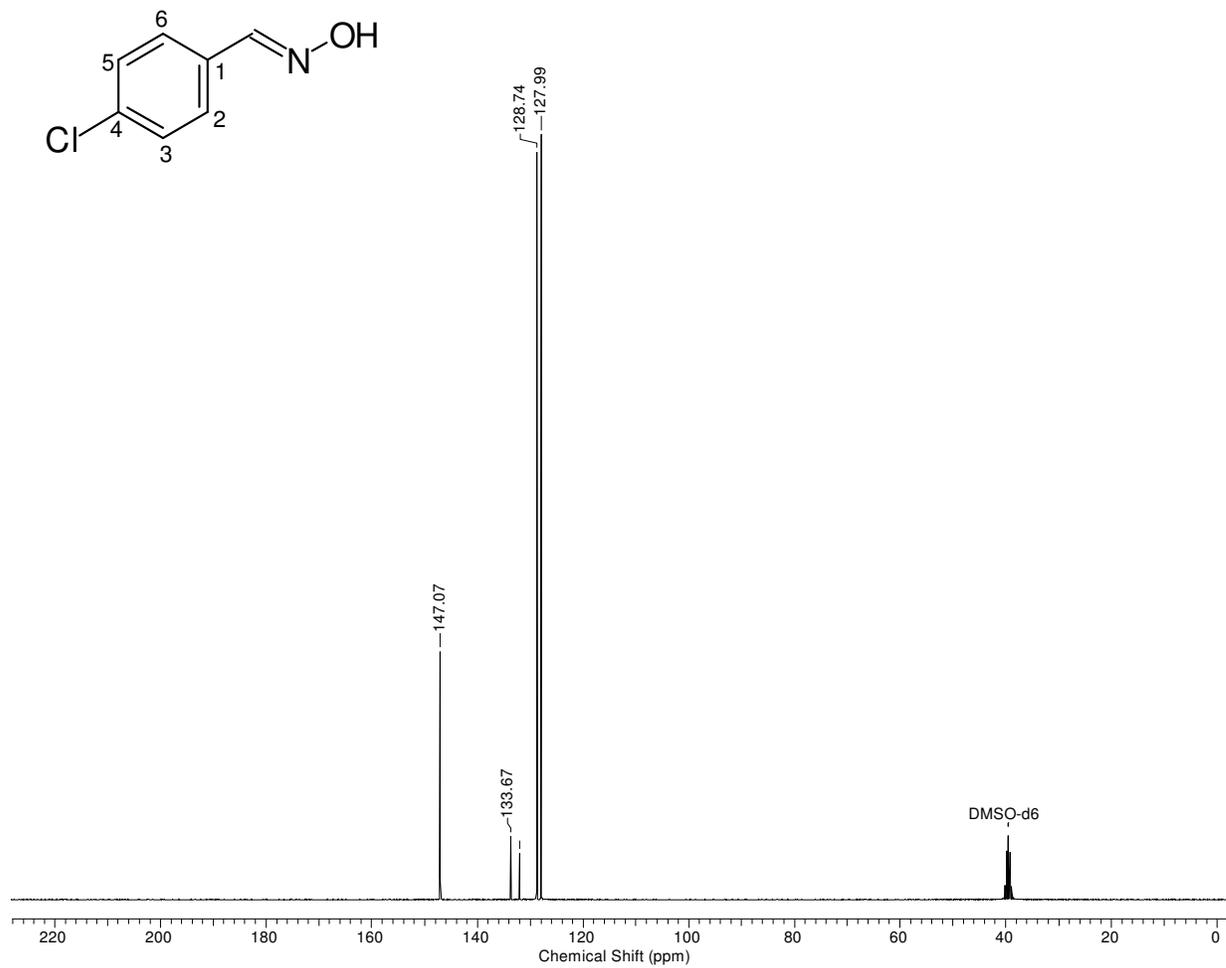


FIG. 8.53 - Espectro de RMN ^{13}C da 4-cloro-benzaldoxima.

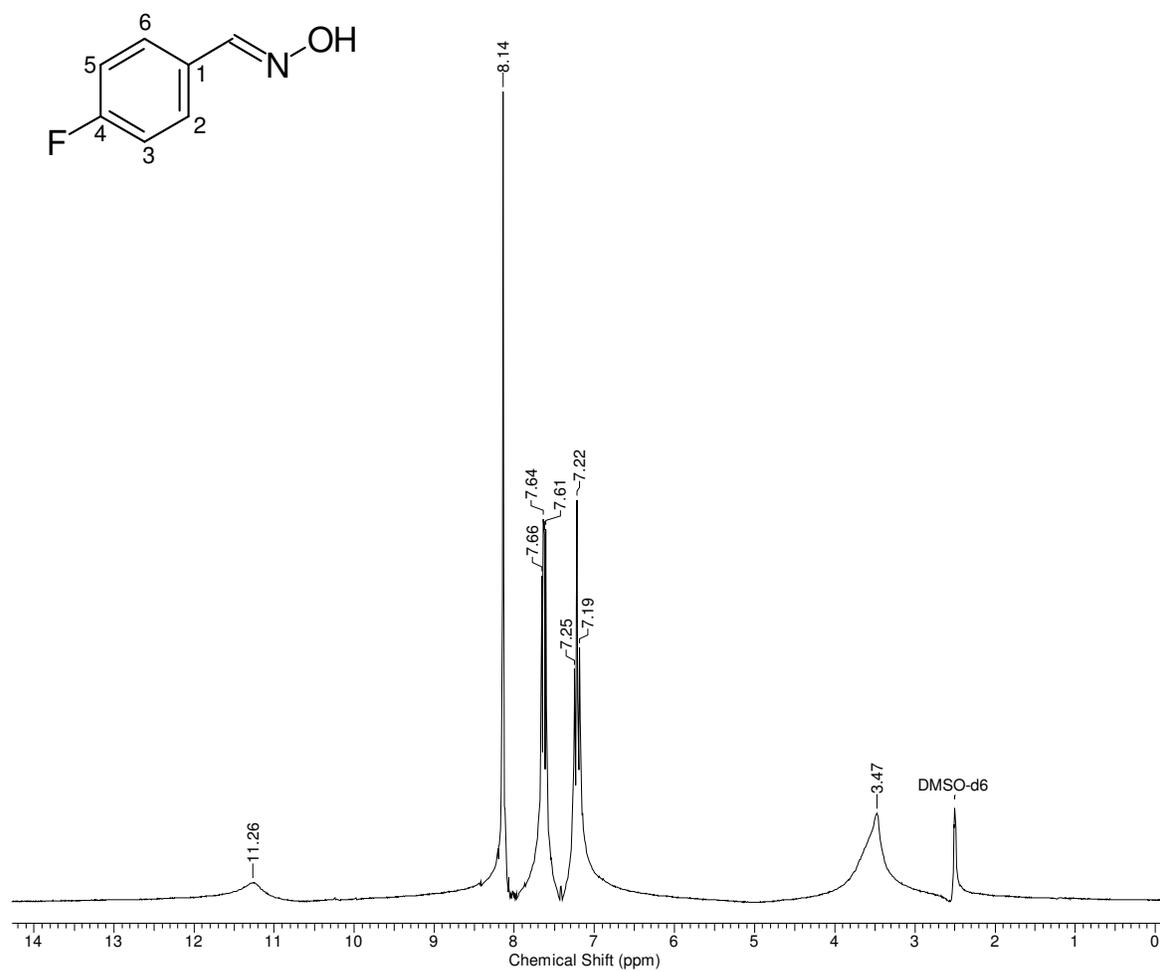


FIG. 8.54 - Espectro de RMN ¹H da 4-flúor-benzaldoxima.

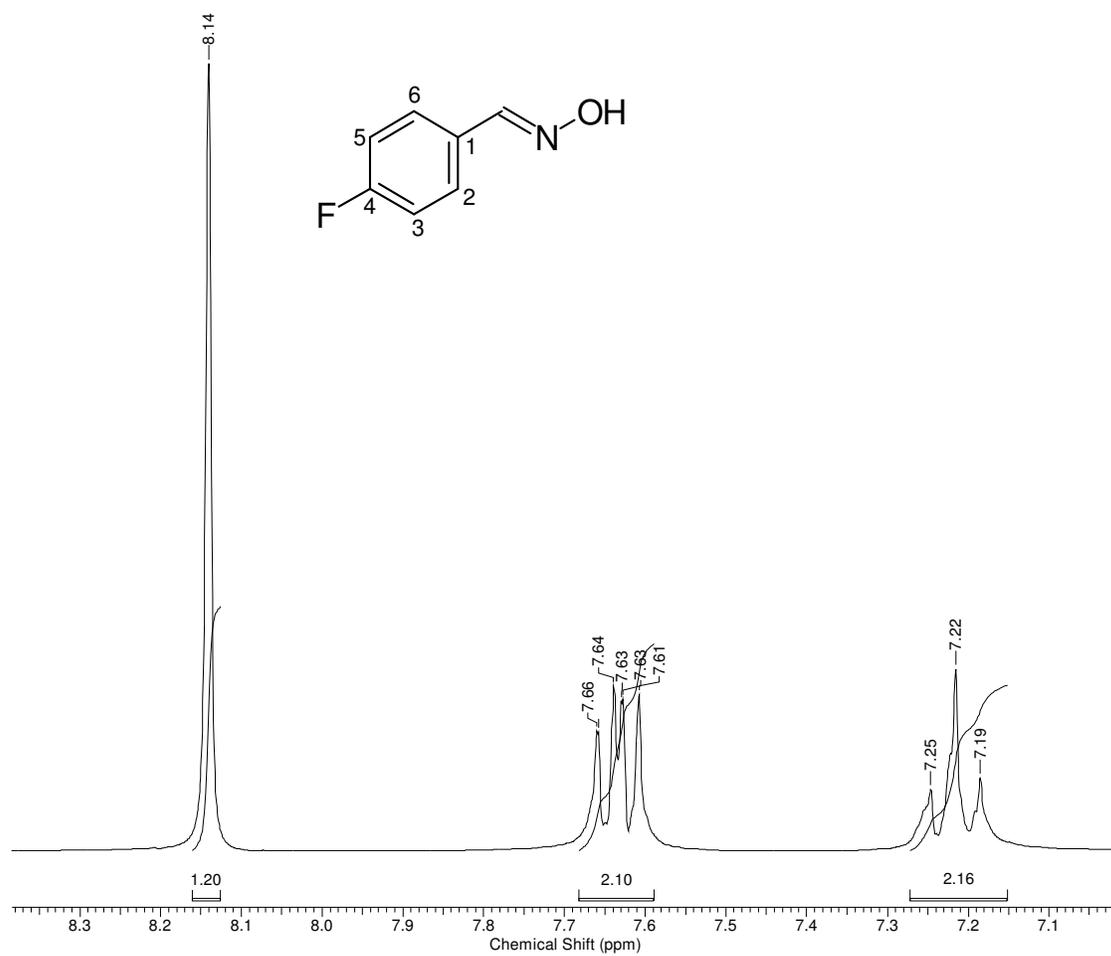


FIG. 8.55 - Espectro de RMN ^1H da 4-flúor-benzaldoxima expandido.

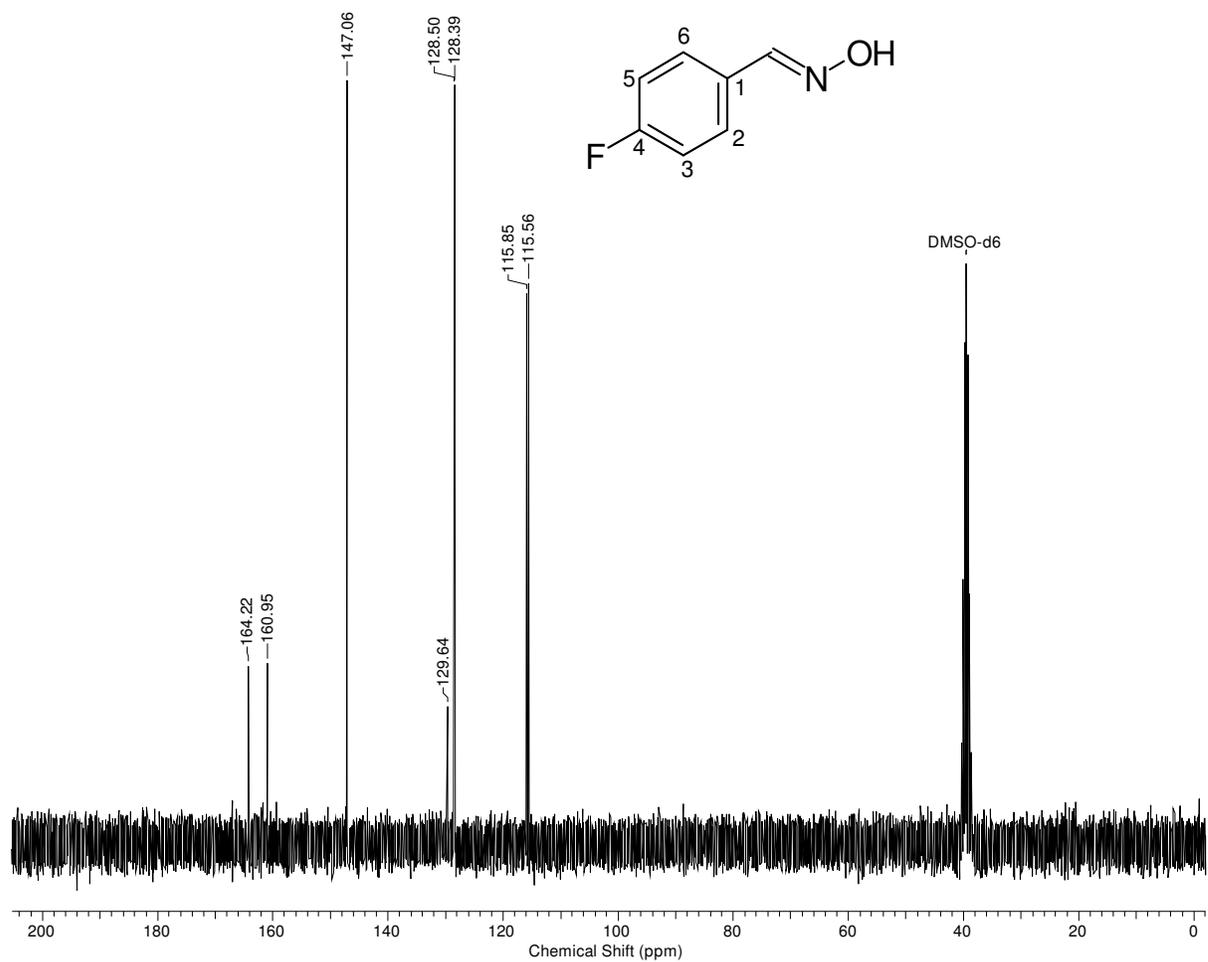


FIG. 8.56 - Espectro de RMN ^{13}C da 4-flúor-benzaldoxima.

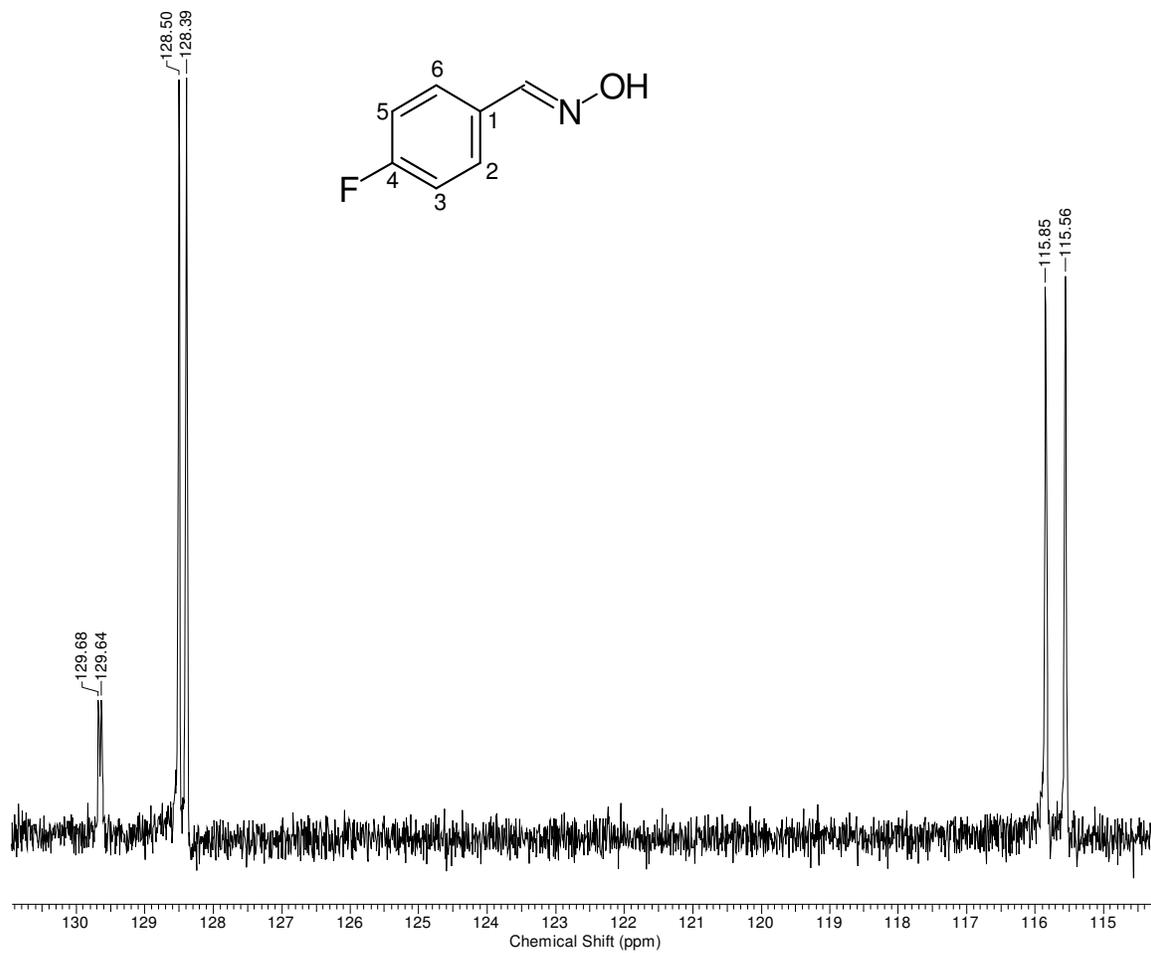


FIG. 8.57 - Espectro de RMN ^{13}C da 4-flúor-benzaldoxima expandido.

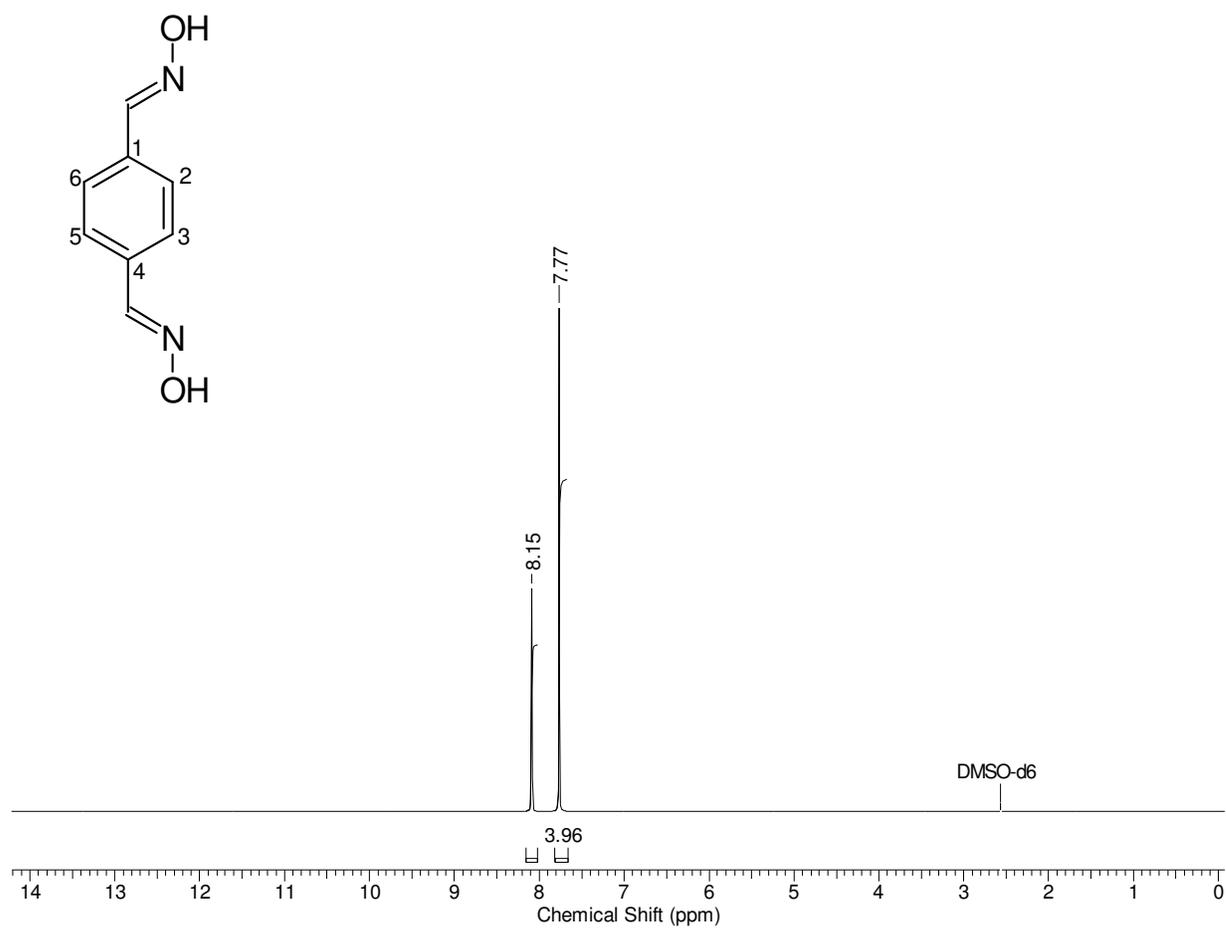


FIG. 8.58 - Espectro de RMN ^1H da tereftaldoxima.

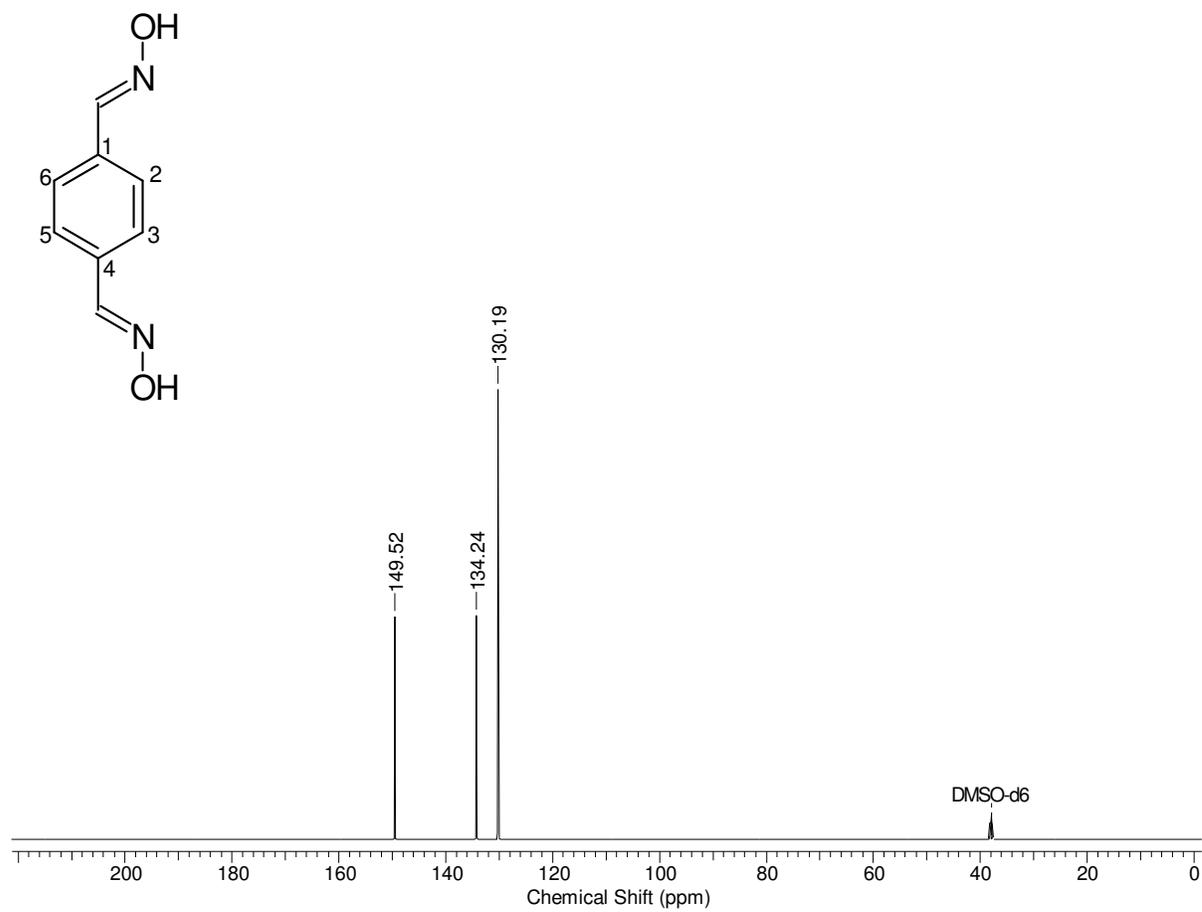


FIG. 8.59 - Espectro de RMN ^{13}C da tereftaldoxima.

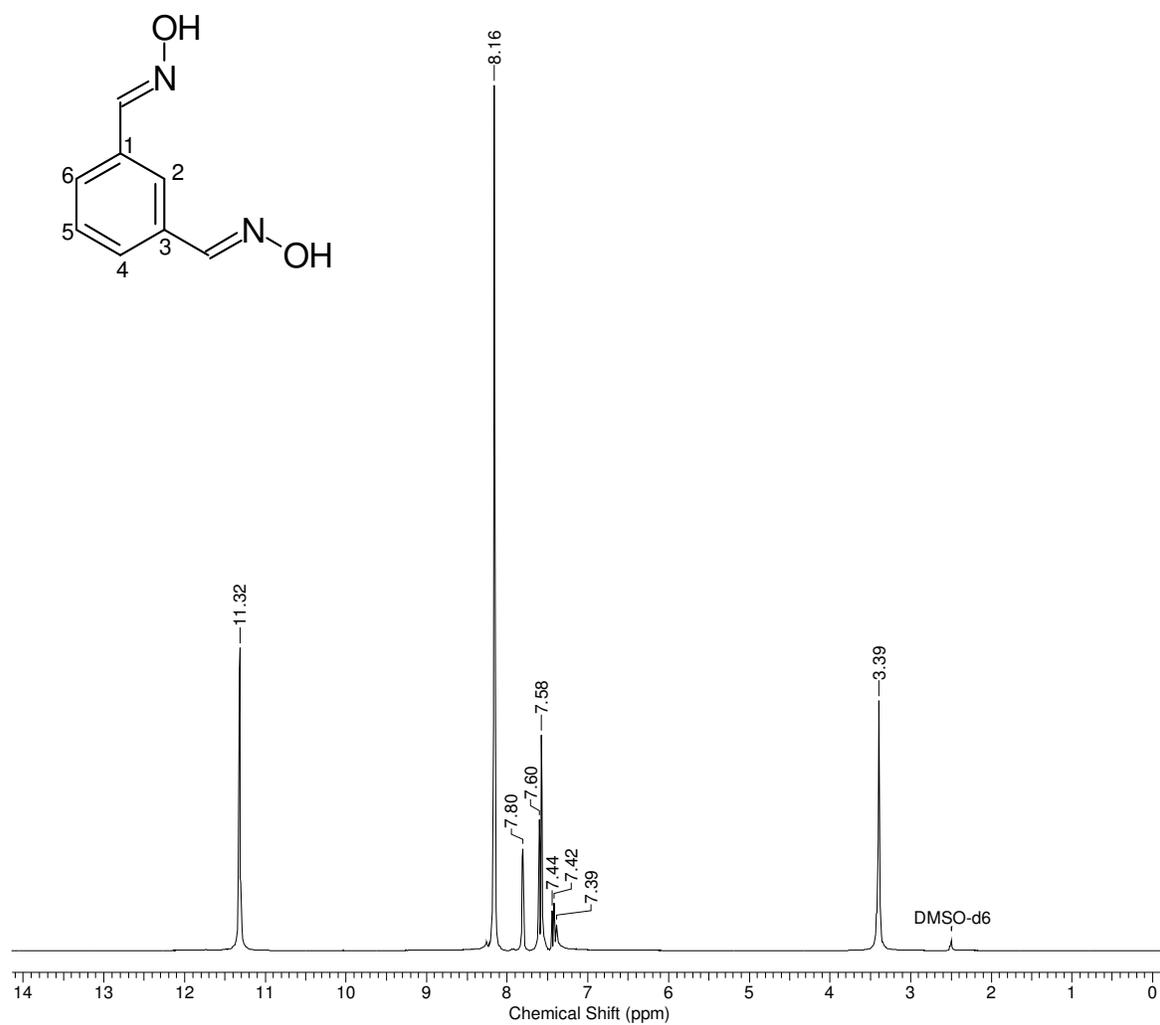


FIG. 8.60 - Espectro de RMN ¹H da isofaldoxima.

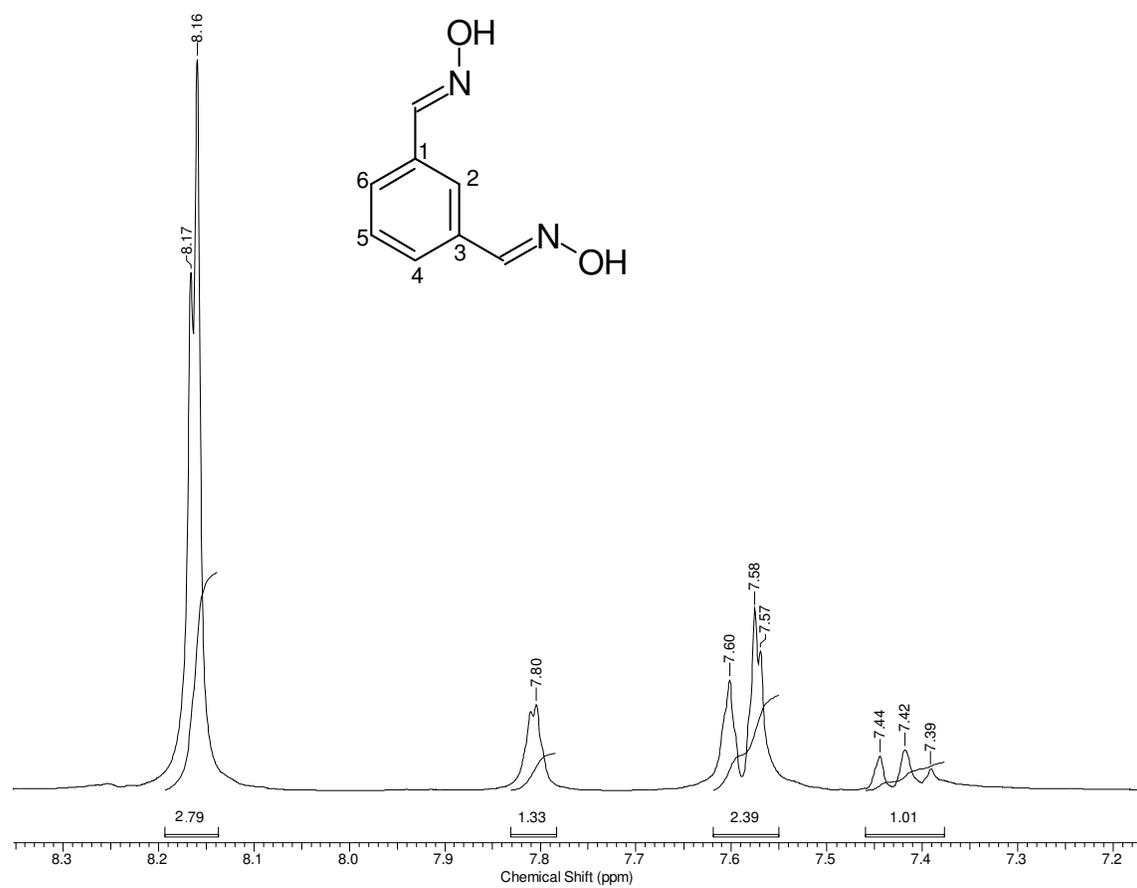


FIG. 8.61 - Espectro de RMN ¹H da isoftaldoxima expandido.

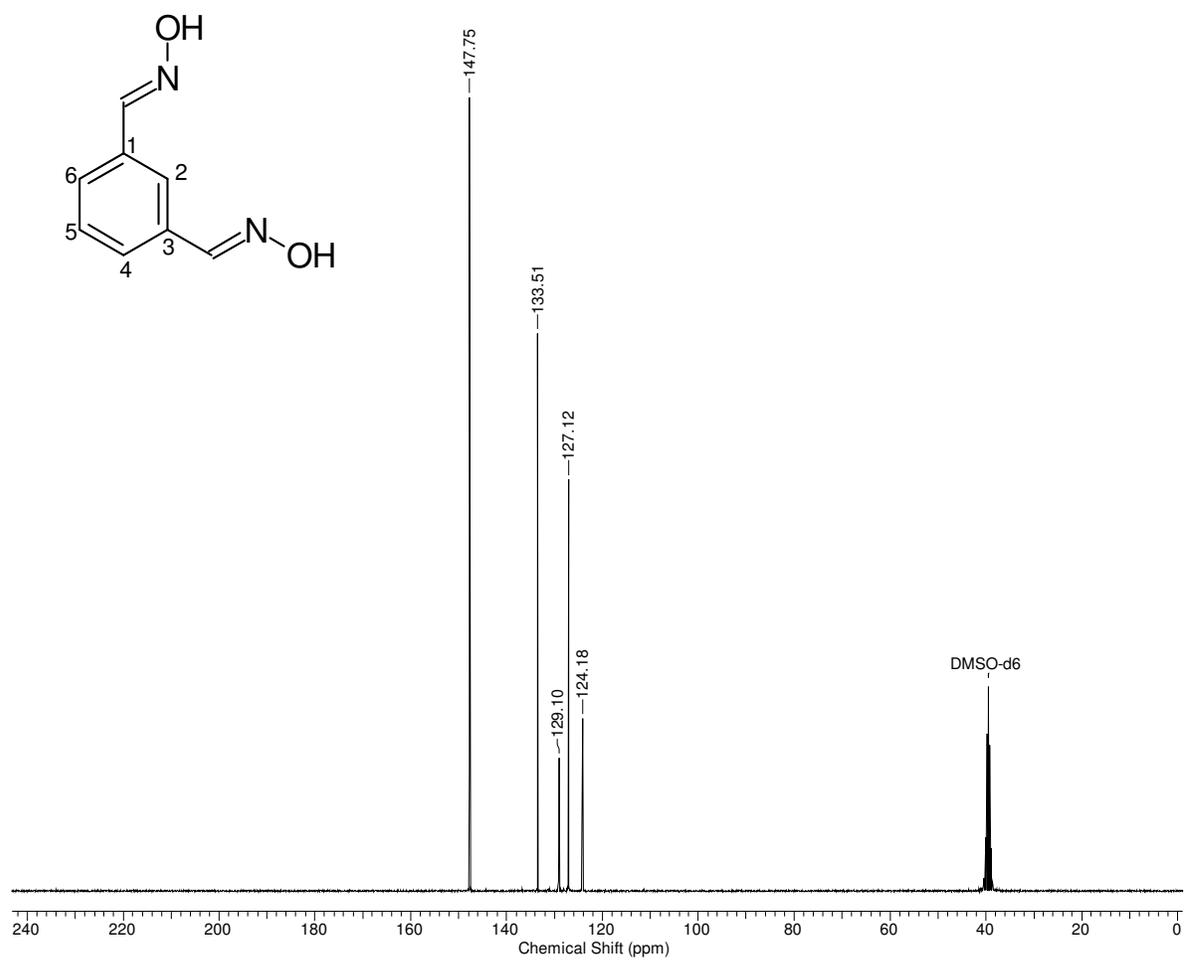


FIG. 8.62 - Espectro de RMN ¹³C da isoftaldoxima.

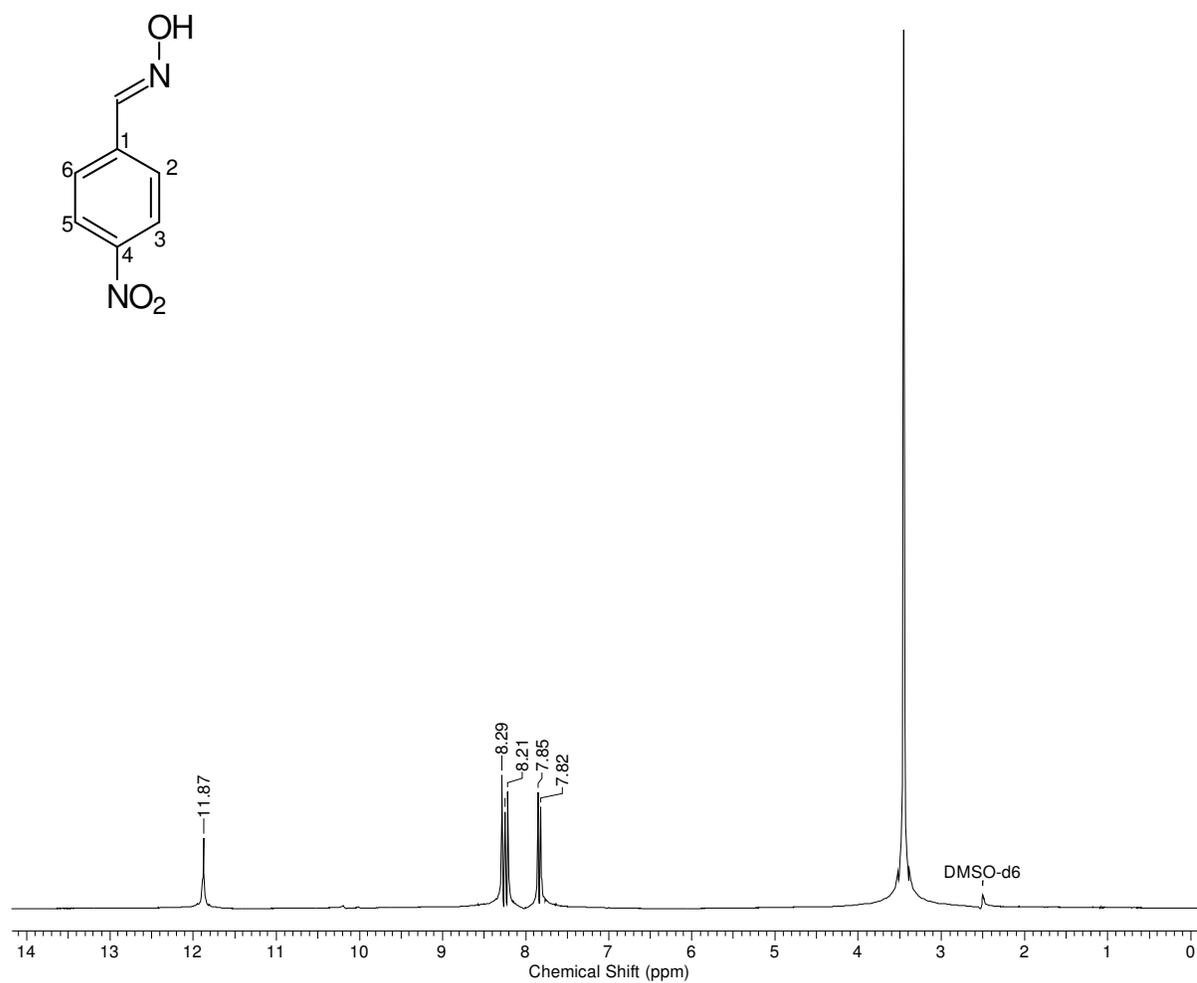


FIG. 8.63 - Espectro de RMN ^1H da 4-nitro-benzaldoxima.

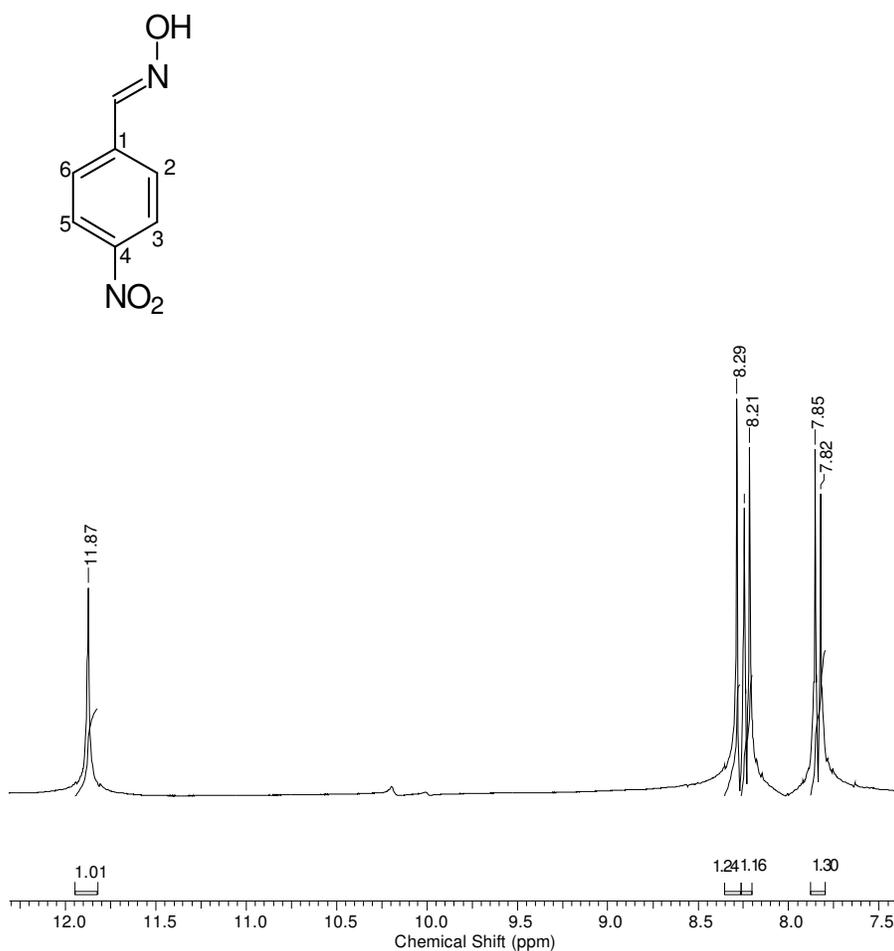


FIG. 8.64 - Espectro de RMN ^1H da 4-nitro-benzaldoxima expandido.

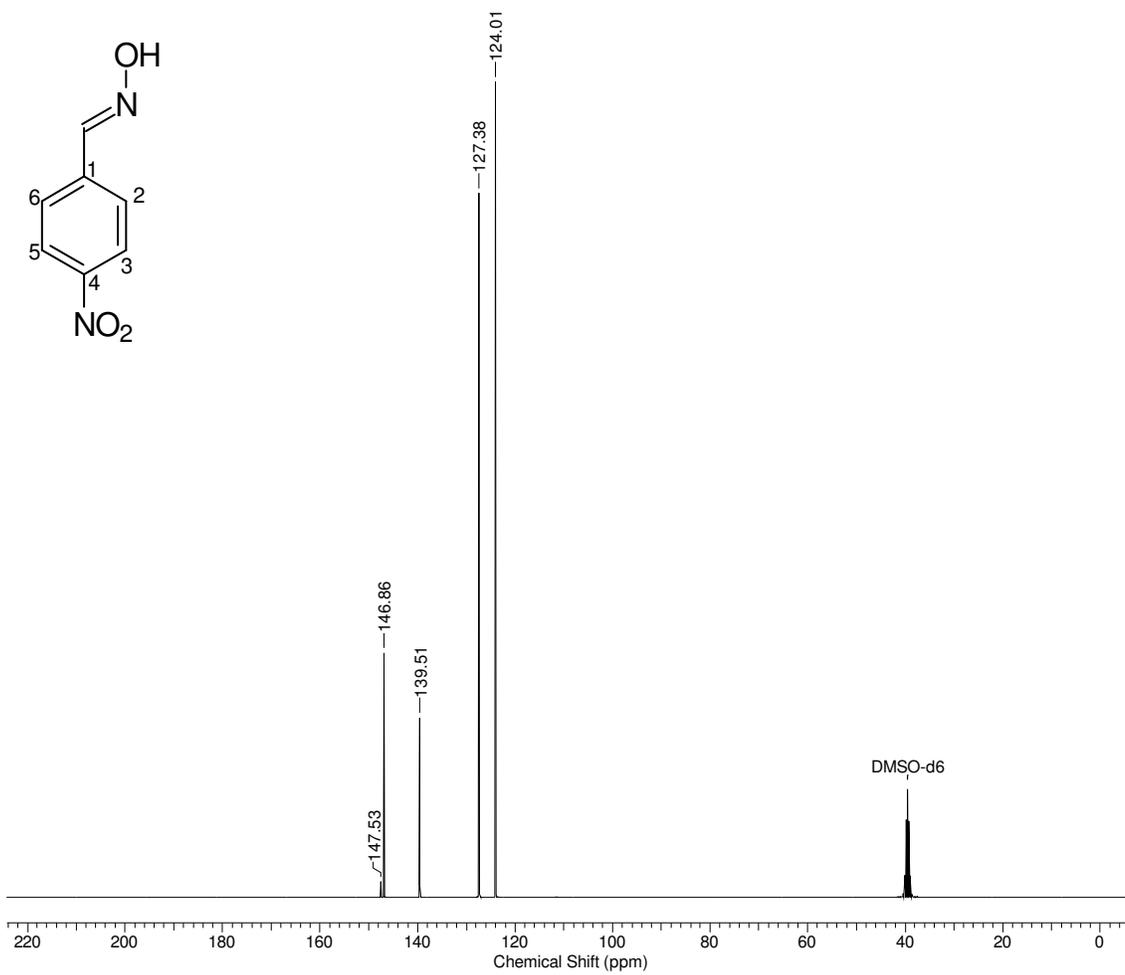


FIG. 8.65 - Espectro de RMN ^{13}C da 4-nitro-benzaldoxima.

APÊNDICE C – Arquivo do diretório para sequência de T_1

APÊNDICE C - Arquivo do diretório para sequência de T_1

mf (1,2)

wft

nt =1

d1= 10

gain= 20

findpw

dg

pw= (cada oxima teve o seu valor de pw calibrado)

ga

dg

d1= 1

dot1

mín de T_1 esperado: 0.5

máx de T_1 esperado: 10

tempo (horas): 0.5

nt= 8

gain= 20

ga

Depois do experimento (para adquirir os dados da tabela de T_1)

ds(1)

dll

fp

t1

APÊNDICE D – Artigo Publicado

Review

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review

*Reinaldo T. Delfino, Tatiana S. Ribeiro and José D. Figueroa-Villar**

Seção de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça Gen Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, 22290-070 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Os agentes de guerra química constituem uma das maiores ameaças do mundo moderno. Dentre estes, destacam-se os agentes neurotóxicos, em virtude de sua alta letalidade e periculosidade. Eles são compostos organofosforados que atuam pela inibição da enzima acetilcolinesterase, a qual é fundamental no processo de transmissão de impulsos nervosos. Existem várias formas de tratamento para a intoxicação por organofosforados, mas nenhuma delas é eficaz contra todos os agentes conhecidos ou contra todos os seus efeitos. Esta revisão tem como foco o uso de compostos organofosforados como agentes neurotóxicos de guerra química. Após uma breve introdução histórica, será feita uma discussão sobre as principais características estruturais e biológicas da acetilcolinesterase, seguida por uma revisão das propriedades dos compostos organofosforados e da sua aplicação como agentes de guerra química. Por fim, serão discutidas as formas de tratamento contra estes agentes, com ênfase nas oximas usadas para reativar a acetilcolinesterase inibida.

Chemical warfare agents constitute one of the greatest threats in the modern world. Among them, the neurotoxic agents are of special interest due to their high lethality and danger. Neurotoxic agents are organophosphorus compounds that act by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase, which is fundamental for the control of transmission of nervous impulses. There are several ways of treating intoxication by organophosphorus compounds, but none of them is efficient against all the known neurotoxic agents or against all of their effects. This review focus on the use of organophosphorus compounds as neurotoxic chemical warfare agents. After a brief historical introduction, it will be done a discussion about the structural and biological characteristics of acetylcholinesterase, followed by a review of the properties of organophosphorus compounds and their application as chemical warfare agents. Finally, the ways of treatment against intoxication with these agents will be discussed, with emphasis on the oximes used for reactivating the inhibited acetylcholinesterase.

Keywords: chemical warfare agents, organophosphorus compounds, acetylcholinesterase, oximes, neurotoxic agents

1. Introduction

One of the greatest threats in modern world is the possibility of use of chemical weapons by regular forces or by terrorist groups. Among these weapons, the so-called neurotoxic agents, commonly known as “nerve agents”, constitute the greatest concern, due to their highly deleterious effects on humans. The potentiality of attacks employing these agents gives a strong reason for continuous research on the development of more effective antidotes against them.

One way of treating victims of nerve agents consists on the administration of certain pyridinic oximes, which possess the capacity to regenerate the catalytic activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), the target of these compounds.^{1,4} Unfortunately, until now it has not been reported any oxime that acts efficiently against all the existing neurotoxic agents. Therefore, oximes that are efficient for the treatment of intoxication with one specific nerve agent can be completely ineffective with another.^{1,4} Also, even the fast identification of a neurotoxic agent in order to choose the treatment for the intoxication is usually not rapid enough to either save the life of the patient or to avoid serious permanent damages.

In this review, the main aspects concerning the nature and mode of action of neurotoxic agents and the treatment of intoxicated patients are discussed.

J. Braz. Chem. Soc.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review

2

2. History and Classification of the Chemical War Agents

The expression “chemical warfare”, first used in 1917, refers to all tactical war assets which use incendiary mixtures, smokes and irritating, vesicant, poisonous or asphyxiating gases.⁵ For the Brazilian Army, chemical war is the one that utilizes substances designated as “chemical agents”, which are defined as all the compounds that, due to their chemical activity, generate a toxic, smoking or incendiary effect, when used for military purposes.⁶ Chemical warfare agents (CWAs) distinguish themselves from biological warfare agents, since the latter consist of microorganisms which cause diseases in humans, animals or plants, or which deteriorate different materials.⁵ Microorganisms toxins may be considered as intermediate between chemical and biological warfare agents, since they are chemical entities which are produced exclusively by living organisms. However, it is not uncommon to consider them as biological weapons.⁵

The use of CWAs can be retraced to 1,000 B.C., when the Chinese employed smokes containing arsenic, while the Greek utilized chemical compounds to poison water and other supplies of their enemies. In the following centuries, the use of CWAs was diversified, progressively becoming more sophisticated.⁵ Today it is considered that modern chemical war began during the First World War, more precisely on April 22nd 1915, when the German Army employed large quantities of chlorine gas against the Allied Forces in Ypres, Belgium. British and French troops equally retaliated, and the First World War became the first stage of the use in large scale of several poisonous gases, some of which, like phosgene, diphosgene, hydrogen cyanide, cyanogen chloride and mustard gas, were even more toxic than chlorine,. Since then, the use of CWAs was confirmed or suspected in several localized conflicts, although never in such scale as in World War I.⁵ Some of the main historical events involving CWAs in the 20th century are listed in Table 1.3,⁷

Although Japan used CWAs against the Chinese forces between the end of the 1930's and the beginning of the 1940's, it is interesting to note that there is no confirmation of the use of these weapons in Europe during World War II. This fact is astonishing, since Germany was much more advanced in that area than the Allies, to whom tabun, sarin and soman were completely unknown.⁸ The reasons for the non-utilization of these neurotoxic agents by Germany is still a matter of debate: some people argue that Adolph Hitler or German senior officers, themselves victims of CWAs during World War I, would have prohibited the use of chemical weapons. However, the most probable reason was the German fear that the United States and Great Britain possessed equal or similar chemical weapons (which was untrue) and would use them in retaliation.⁹

Military CWAs can be classified in several categories, according to the nature of their use, their persistence in the field and their physiological action.¹⁰ They are generally divided in the following classes: (i) VESICANTS, which are compounds that cause irritation and vesication of the skin and mucous membranes (mainly the lungs),

being the mustard gases (ClCH₂ CH₂ XCH₂ CH₂ Cl, X=O, S, NR) the most important representatives of the group. Although they can lead to death, vesicants usually have only an incapacitating effect, as the victims of mustard gas require one to four months of hospitalization, for instance. (ii) PULMONARY TOXICANTS, which are compounds that attack the respiratory tract, causing choking. The main substances of this class are phosgene (COCl₂) and diphosgene (Cl₃ COCOCl). (iii) CYANIDES, which are substances that release cyanide ions in the body, being hydrogen cyanide and cyanogen chloride the most used. The major mechanism of toxicity of cyanides occurs by inhibition of cytochrome c oxidase, a process that results into cytotoxic hypoxia.¹¹ (iv) INCAPACITATING

Table 1. Historical facts about the modern use of chemical weapons

Date	Historical fact
1915-18	Use of chemical weapons in World War I.
1935	Italy uses mustard gas in Libya and Ethiopia.
1936	The German chemist Gerhard Schrader synthesizes the neurotoxic agent tabun.
1937	Schrader and coworkers synthesize the neurotoxic agent sarin.
1939	Japan uses mustard gas against China.
1940-5	Germany employs Zyklon B, a variant of hydrogen cyanide, in gas chambers.
1942	Germany begins the industrial production of nerve gases in Dyhernfurth.
1944	The German chemist Richard Kuhn synthesizes the neurotoxic agent soman.
1950's	VX is synthesized by the British and weaponized by the Americans.
1984-6	The use of CWAs by Iraq in the war against Iran is confirmed.
1988	The use of chemical weapons by Iraq in the repression against the Kurdish population situated in the North of the country is confirmed.
1994	Terrorist attack with sarin in Matsumoto, Japan, executed by the Aum Shinrikyo sect, results in 7 deaths and more than 300 injured.
1994/5	Assassination attempts with VX are made in Osaka, Japan, by Aum Shinrikyo members, with one fatality.
1995	Aum Shinrikyo uses sarin to attack the Tokyo subway, causing 12 deaths and thousands of casualties.

Vol. 00, No. 00, 2009

Delfino et al.

3

AGENTS, also known as irritating agents, are compounds that produce physiological or mental effects, rendering their victims unable to perform their duties. The most remarkable among them are the tear gases (chloroacetophenone, o-chlorobenzylidenemalononitrile, bromoacetone, etc.) and the vomiting gases (like chloropicrin, Cl₃ CNO₂) and psychoactive agents like 3-quinoclidinyl benzilate

(BZ). (v) NEUROTOXIC AGENTS, which are also known as nerve agents or nerve gases, inhibit an enzyme called acetylcholinesterase, causing several deleterious effects which can lead to death. The most important ones are tabun, sarin, soman and VX.

The employ of chemical warfare in conflicts is strongly objected by the majority of mankind; perhaps only biological warfare provokes a repulse even larger.⁸ Despite the successful United Nations efforts to proscribe these weapons, summarized by adherence to the Chemical Weapons Convention by most country of the world,¹² the possibility of chemical warfare use by rogue States or by terrorist groups is still a great concern.

Nerve agents, the focus of this review, are among the most toxic synthetic compounds and, along with vesicants, constitute the majority of the modern chemical arsenals.¹⁰ As already discussed, tabun, sarin and soman were synthesized, but not employed, during World War II. VX was synthesized in Great Britain during the 1950's and later developed for military purposes by U.S.A.³ Nerve agents are synthesized easily and cheaply, are easily dispersed and difficult to detect, feared by public opinion and highly lethal, being an excellent weapon for terrorist purposes.¹³ Although there are several unconfirmed reports of nerve agents' utilization since 1967,⁵ there are fortunately few confirmed cases of their use. During the Iran-Iraq war, Iraq occasionally employed tabun and, possibly, other nerve agents, along with mustard gas.^{14,15} Iraq has also used sarin and mustard gas against the civilian Kurdish village of Birjinni, in 1988.¹⁶ Impure sarin has been employed in the terrorist attacks in the Japanese cities of Matsumoto (1994) and Tokyo (1995) perpetrated by the Aum Shirinkyo sect.^{3,17-20} Finally, there are records of assassination attempts employing VX.²¹

To further discuss the neurotoxic agents, it is necessary to review the main characteristics of their target, the acetylcholinesterase enzyme.

3. Acetylcholinesterase

3.1 The cholinesterases

Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, E.C. 3.1.1.8) are the enzymes which constitute the group of the cholinesterases. Acetylcholinesterase hydrolyses acetylcholine (ACh) and is mainly associated to nerves and muscles, being typically found on the synapses, while butyrylcholinesterase, also known as plasma cholinesterase or pseudocholinesterase, hydrolyses butyrylcholine and is synthesized by the liver, being found in large amounts in the serum. The first structure of a cholinesterase was determined in 1986²² and after that it became clear that these enzymes define a unique family of serine hydrolases.^{23,24} AChE and BChE distinguish from each other mainly in the specificities of hydrolysis of different cholines: AChE hydrolyses ACh quickly, propionylcholine slower, and shows a marked loss of hydrolytic activity for butyrylcholine, while BChE is less selective to the size or nature of the acyl group of the choline to be hydrolyzed, hydrolyzing butyrylcholine and benzoylcholine efficiently.^{23,25} These unequal specificities are explained by differences in the sequences of the enzymes, which result in different sizes of their active sites.^{25,26}

Both AChE and BChE are found in neurons and glial cells of the human brain.²⁷ The physiological function of BChE is not fully understood yet: it appears not to be essential to cholinergic transmission, but there are some indications of its participation in the initial stages of the nervous system development.^{23,25} It has recently been suggested that BChE could act in an enzymatic reservoir, taking part under certain conditions in a regulatory mechanism of AChE levels in cholinergic synapses.²⁷ On the other hand, the physiological function of AChE is well understood. It acts mainly at the cholinergic receptors located in the central and peripheral nervous systems, performing an important role during the process of transmission of nerve impulses: the

catalytic destruction of ACh, which works as cationic neurotransmitter.^{23,28} The role of AChE can be summarized as follows: ACh is released from the presynaptic nerve in response to an action potential, and diffuses across the synapse, binding itself to the ACh receptor (which controls the entrance of K⁺ ions into the postsynaptic nerve or the muscular cell, among other functions). After this binding, there occur several events that result in the beginning of the action potential in the postsynaptic cell. In this moment, AChE quickly hydrolyses ACh, finishing the ACh receptor-mediated ion gating and interrupting the transmission of the nerve impulse.²⁸ Cholinergic receptors can be classified as nicotinic or muscarinic. Nicotinic receptors are found in autonomic ganglia (ganglionic synapses) and neuromuscular junctions, and are activated by nicotine, while muscarinic receptors, which are located on the parasympathetic effector organs and prejunctionally to neuromuscular junctions, are mainly activated by muscarine.⁴

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 4

ACh-mediated neurotransmission is a vital process for survival: its abrupt interruption is lethal, and its gradual reduction is associated to progressive deterioration of the cognitive and neuromuscular functions, as in the case of Alzheimer disease, for instance. However, AChE cannot be considered as just an enzyme of the cholinergic nervous system: it appears to be involved in other biological processes, such as neuritogenesis, cell adhesion and differentiation, and amyloid fiber assembly, among others.²⁹ Studies are being conducted to confirm or reject these hypotheses of non-classical roles for AChE, and how this knowledge could be employed to develop new therapeutic strategies for neurological diseases.²⁹⁻³¹ Recent findings indicate that ACh is not only involved in the correct functioning of the central and peripheral nervous systems: it is a ubiquitous molecule which takes part in the regulation of several other processes, such as cell growth, locomotion and apoptosis, to name just a few.³²

3.2 Catalytic mechanism of AChE

The catalytic mechanism of AChE is based on the formation of a tetrahedral acyl-enzyme intermediate, and involves stages of nucleophilic additions and acid-base reactions. In the decade of 1970, a minimal kinetical model was proposed by Rosenberry, which assumes that an induced-fit conformational adjustment of AChE occurs after substrate binding, but before chemical catalysis.^{28,33} This minimal kinetic model is represented on Figure 1.

The scheme represented in Figure 1 was the first to be proposed for AChE hydrolysis, and is basically a classical Michaelis-Menten model. However, the catalytic action of AChE and BChE can be described by this simple model only for neutral substrates, or for low concentrations of positively charged substrates; in other cases, more complex models should be employed.²⁶ One of these models takes into consideration the possibilities of substrate-activation and substrate-inhibition.³⁴ Other models have been proposed to explain the differences in the kinetics of hydrolysis among AChE of several species. As an example, we can cite the model for action of *Drosophila melanogaster* AChE proposed by Stojan et al.,³⁵ which considers the modulation of the enzyme catalytic action due to binding of the substrate to a secondary active site.

AChE has an outstanding catalytic performance: its turnover number exceeds 10^4 s⁻¹, and acetylcholine diffusion to the enzyme active site is the rate-limiting stage of the process. It is noteworthy that AChE is not a selective enzyme, as it catalyzes not only ACh hydrolysis, but also several reactions involving aryl esters, anilides, thioesters,

amides, selenoesters, and other acyclic and N-demethylated compounds analogous to AChE.²⁸

3.3 AChE structure

AChE is a polymorphic enzyme, constituted by globular catalytic subunits, each one with a mass of 70-80 kDa. These subunits group themselves in oligomeric structures that can be divided in two classes: the globular forms and the asymmetric (or elongated) forms. The globular forms are composed of monomers, dimers or tetramers; in the last two cases, the monomeric units are linked by disulfide bridges, and each one possesses its own active site. The asymmetric forms are constituted by three structural subdomains: the catalytic subunits (which are globular), the collagenous subunit and the noncollagenous subunit. The collagenous subunit is a proteic structure, rich in glycine, hydroxyproline and hydroxylysine, and generally contains a triple helix. This subunit ends in a noncollagenous subunit, which are disulfide-linked to the catalytic subunits. The polymorphic forms of AChE are found in several organs of various species. Despite their structural differences, the catalytic subunits activities in the globular and asymmetrical forms are similar.^{28,36}

Torpedo californica AChE (TcAChE) was the first to have its primary structure determined.²² A few years later, the primary structure of human AChE (HuAChE) was discovered.³⁷ TcAChE was also the first one to have

Figure 1. Minimal kinetic mechanism of AChE catalysis.

Delfino et al. 5 Vol. 00, No. 00, 2009

its three-dimensional crystalline structure determined by X-ray diffraction.³⁸ Generally, the AChE's of different species are well conserved, and TcAChE has more than 60% of identity when compared to mammals AChE's²³ (it is interesting to note that the identity between, the AChE and the BChE of a same species, or of genetically proximal species, varies from 50 to 52%). The high identity among the sequences of TcAChE and mammals AChE's, including the human, renders the tertiary structures of these enzymes very similar. This fact, associated to the good resolutions of TcAChE structures available in the Brookhaven Protein Data Bank (PDB), has made TcAChE the preferred enzyme in theoretical and experimental studies of acetylcholinesterases. The three-dimensional structure of TcAChE (PDB ID 1EA5) is represented in Figure 2.

TcAChE is naturally found in a homodimeric form. The monomer has 537 residues and is ellipsoid-shaped, with approximate dimensions of 45 Å × 60 Å × 65 Å. It is constituted by a 12-stranded central β-sheet surrounded by 14 α-helices. The first and the last pairs of strands each form a β-hairpin loop, which are loosely hydrogen-bonded to the eight remaining strands.³⁸ TcAChE is homologous to several lipases and esterases, resulting in similar three-dimensional structures for all of them.³⁹ However, this folding pattern (a β-sheet surrounded by α-helices) is also found in hydrolases that bear no similarity to TcAChE or among themselves. This fold, first identified in the 1990's, is designated α/β hydrolase.⁴⁰ It is believed that, in TcAChE, this folding is kept by four salt bridges.³⁹ In-depth descriptions of structural details and disulfide-linkage patterns, as well as comparisons with structures of other enzymes, can be found elsewhere.^{24,28,38,39}

3.4 AChE active site

Essentially, the AChE active site is composed by a catalytic triad, formed by Ser-200, Glu-327 and His-440 in TcAChE^{22,36,38,41,42} and by Ser-203, Glu-334 and His-447 in HuAChE.⁴² This triad is similar to the ones present in other serine hydrolases

and serine proteases, where there is an aspartate instead of the glutamate found in AChE,^{38,43} as well as an opposite “handedness”, as described by Sussman et al.³⁸ In TcAChE, the catalytic triad is located at the bottom of a deep and narrow gorge, known as active site gorge, which has about 20 Å of depth and penetrates approximately halfway in the enzyme, with a widening near its bottom. The O γ -atom of the Ser-200 residue is located 4 Å above the bottom of the gorge,³⁸ whose wall is aligned by 14 highly conserved aromatic residues that interact with quaternary ammonium ions, and also by a few acidic residues.^{38,44,45} Moreover, the distribution of charged residues in AChE results in a permanent dipole moment that is aligned with the axis of the active site gorge; this characteristic facilitates the attraction of a positively charged substrate, guiding it through the gorge.⁴⁶ The direct interaction of the substrate with the negatively charged residues situated in the gorge is shielded by the side chains of the aromatic residues.⁴⁷ This electrostatic steering caused by the huge dipole moment, associated with the quadrupole and other multipole moments of the enzyme, contributes to its high catalytic efficiency.^{38,44,47-49} The narrowest part of the gorge is smaller than the cross section of the ACh, indicating the need of conformational changes of at least part of the gorge to allow the penetration of the substrate.⁵⁰ The fast release of the products of the enzymatic catalysis remains unexplained, although some studies have proposed the possibility of conformational changes that would open alternative “back doors”, through which at least some water molecules would exit, while the choline would exit by the principal opening.^{47,49,50} The acetate formed in by the hydrolysis of ACh would leave the active site mainly through the principal opening, with a small fraction leaving through a back door formed during the enzymatic reaction.^{51,52}

The catalytic triad is not the only component of the active site, although it is undoubtedly the principal part. Quinn divided the active site in three subsites,²⁸ and others domains have been added to his classification since then. According to Quinn and as shown in Figure 3, the active site of AChE can

Figure 2. Tridimensional structure of *Torpedo californica* AChE (PDB ID 1EA5).

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 6

be divided in: (i) an esteratic subsite, where the serine and the histidine of the catalytic triad are located, which binds to the acyl group of ACh; (ii) an anionic subsite, constituted by negative charges that interact with the quaternary ammonium group of ACh; (iii) a hydrophobic region, contiguous or close to the esteratic and anionic subsites, which is important for the binding of aryl substrates.

Quinn also considered the existence of a fourth domain in AChE, which binds to cationic substrates. This domain is located near the ridge of the gorge, more than 20 Å away from the active site, and is denominated peripheral anionic site. The binding of ligands to this peripheral site frequently causes conformational changes in the active site. These four domains act in a concerted way, resulting in the complex reaction dynamics that characterize AChE.^{28,53}

As mentioned before, the enzymatic hydrolysis of ACh involves nucleophilic additions and acid-base reactions, and is based mainly on the action of the triad catalytic residues. The proposed mechanism most consistent with available experimental data consists of two nucleophilic attacks and two proton-transfers, with a covalent acyl-enzyme intermediate. In TcAChE, His-440 abstracts a proton from Ser-200, forming a nucleophile Ser-O⁻ that attacks the ACh molecule, generating a tetrahedral adduct as

intermediate. The protonated His-440 is stabilized by Glu-327 and, to a lesser extent, by Glu-199. The stabilization of existing charges in the transition state results in the exceptional catalytic power of AChE.^{43,45,51,54-57} This mechanism is represented in Figure 4. His-440 has a high mobility during the catalytic action of AChE,⁵⁸ and its exact positioning is fundamental for achieving optimal catalytic activity. This positioning is obtained by steric hindrance of Phe-288 and by π -stacking with Phe-331.^{53,59,60}

Figure 3. Scheme of the AChE active site.

Figure 4. Mechanism of ACh hydrolysis by AChE.

Delfino et al. 7 Vol. 00, No. 00, 2009

The residues Trp-84, Glu-199 and Phe-330 are the main components of the anionic subsite (also known as choline binding site), strongly interacting with the quaternary ammonium group of ACh.^{45,61-63} Particularly, Trp-84 is very close (3.7 Å) to the ammonium group, and both Trp-84 and Phe-330 interact with this group by cation- π interactions.⁶⁴ Although used for long time, the expression “anionic subsite” is not precise, since it contains, at most, one formal negative charge; the cation- π interactions are responsible for the binding of choline to the active site, and not any eventual ionic interaction.^{38,61,65}

Phe-288 and Phe-290 (which correspond to Phe-295 and Phe-297 in HuAChE and in other mammals) have a great importance in the active site: they delimit a space where the acyl group of the substrate accommodates itself, designated as acyl pocket. These residues are responsible for the higher specificity of AChE when compared to BChE: the big volume of the Phe sidechains limits the available space in the acyl pocket to an acetyl or propanoyl group. In BChE, these Phe are replaced by smaller residues (Leu, Ile or Val), resulting in a more spacious acyl pocket, capable of accommodating larger groups such as butanoyl or benzoyl.^{25,66} Mutagenesis experiments showed that mouse AChE with the mutations Phe295Leu and Phe297Ile loses its specificity and reduces its maximum catalytic rate (k_{cat}), which leads to the conclusion that these residues are important for substrate stabilization at the optimal catalysis position.²⁵ Moreover, mutations Phe297Ile and Phe297Val change the kinetic profile of AChE from one of substrate-inhibition to another of substrate-activation analogous to that of BChE.^{25,67} The TcAChE acyl pocket is complemented by residues Trp-233 and Phe-331, which are involved in the mentioned maintenance of the right orientation of His-440 for catalysis.^{59,60}

An important structural characteristic found in the active site of AChE is an arrangement of hydrogen-bond donors that stabilize the acyl-enzyme intermediate, accommodating the negative charge of the carbonyl group (which is in the form C=O⁻ in the acylation and deacylation intermediates). This arrangement forms a cavity known as oxyanion hole, where the carbonyl group accommodates itself. This hole is formed by residues Gly-118, Gly-119 and Ala-201 in TcAChE, and by Gly-121, Gly-122 and Ala-204 in HuAChE. The NH groups of these residues' backbones hydrogen-bond to the carbonyl.^{38,45,54,55,65} The residues in the oxyanion hole and in the acyl pocket take part in the stabilization of acylation and deacylation intermediates, accommodating them without the need of major conformational changes.⁶⁸

The peripheral anionic site is located near the ridge of the active site gorge and, although is not directly involved in AChE catalytic activity, comprises several

superposed sites for the binding of allosteric inhibitors and activators. The exact structure and functional role of the peripheral anionic site are still unknown, but it was discovered that some allosteric inhibitors act by a combination of steric hindrance (blocking the way of ligands entering and leaving the active site gorge) and allosteric modifications in the conformation and efficiency of the catalytic triad.⁶⁹ It is also known that Tyr-70, Tyr-121 and Trp-279 are certainly part of the peripheral anionic site, and that this domain binds to cationic and aromatic ligands which are too large to penetrate the active site gorge, or to long bisquaternary ligands which can extend themselves from the ridge to the bottom of this gorge.^{24,61,63,70}

As can be seen in Figure 4, water molecules play an important role in AChE catalysis. A study of several crystalline structures of TcAChE showed that most water molecules are in well-conserved positions, and that some of these molecules move after AChE binds to the substrate, while others remain approximately in the same position.⁵⁰ It is noteworthy that when AChE catalyzes the hydrolysis of substances less reactive than ACh, there occur changes in the mechanism of reaction, the action of the catalytic triad being replaced by a basic catalysis involving Glu-199.⁶²

Other structural aspects of AChE and BChE which are not discussed in this review can be found elsewhere.⁷⁰ AChE is the main target of the neurotoxic CWAs, which will be discussed next.

4. Organophosphorus Compounds as Neurotoxic Chemical Warfare Agents (CWAs)

4.1 Organophosphorus compounds

Neurotoxic chemical warfare agents are essentially organophosphorus compounds (OPCs) that inhibit AChE activity, resulting in several deleterious effects in the victim (including death). OPCs and carbamates are the AChE inhibitors most used nowadays. Many substances of these two classes compounds are used as insecticides, but only OPCs are employed as CWAs.^{71,72} Accidental intoxications and suicide attempts with insecticides constitute a serious health problem, mainly in Third World countries: World Health Organization estimates that there occurs annually three millions of poisoning cases due to pesticides, with more than 220.000 deaths caused by them around the world.^{73,74} Some OPCs are also used as flame retardants in electrical devices and as antiparasites in veterinary medicine.⁷² Although less lethal than chemical weapons, organophosphorus pesticides can lead to similar deleterious effects when used in greater amounts or higher

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 8

concentrations.⁷⁵ In fact, the World Health Organization reports about three million cases per year of intoxication with organophosphorus pesticides, causing about 220.000 deaths, in the world.^{73,74} These intoxications usually result from wrong manipulation of pesticides and suicidal attempts.^{73,76,77}

Phosphorus is an extremely versatile element, located below nitrogen in Group V of the Periodic Table. Its general application in many reactions in organic chemistry results from its electronic structure ($1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^3$). Consequently, phosphorus can adopt several stable oxidation states, including +3, +5 and +6, and can be naturally found bonded to organic and inorganic ligands. The usefulness of phosphorous reagents in organic synthesis stems from the phosphorus ability to progress from the lowest to highest coordination number (and, occasionally, in the reverse direction). Key factors of phosphorous compounds include the high nucleophilicity of trivalent phosphorous reagents towards electrophiles, its strong and readily formed bonds with oxygen,

sulphur, nitrogen and halogens, and the capacity of phosphorus to stabilize adjacent anions.⁷⁸

Organophosphorus compounds are organic substances which contain a phosphoryl (P=O) or a thiophosphoryl (P=S) bond.⁷² They are essentially esters, amides or thionic derivatives of phosphoric, phosphonic or phosphinic acids, with different arrangements of attached oxygen, carbon, nitrogen or sulfur atoms.^{72,79} The classification of OPCs is quite complex, due to the extraordinary variety of side chains that can be attached to the phosphorus atom. Because of this, no universal classification system for OPCs has been widely accepted to date. According to Gupta,⁷² there are at least 13 types of OPCs, whose structures are shown in Figure 5. OPCs usually have two alkyl substituents and an additional substituent known as “leaving group”, since it is more susceptible to hydrolysis or substitution by nucleophiles than the alkyl groups. OPCs that are derivatives from phosphoric and phosphonic acids generally have anticholinesterase activity, in opposition to OPCs derived from phosphinic acid.⁷²

The toxic effects of OPCs in humans and insects were discovered in 1932 and 1937, respectively. In 1940, it was proven that AChE is the main target of OPCs in mammals, and a few years later it was found out that the same is true for insects.⁸⁰ OPCs employed as CWAs are much more potent than the ones used as insecticides, which usually present selective toxicity towards insects, relatively to mammals, because of structural differences in AChE receptors, as well as in other binding subsites.^{80,81} It is noteworthy that only toxicity to insects does not qualify an OPC (or any other substance) as insecticide: it should have other properties, mainly efficacy in low concentrations, low toxicity to mammals, low phytotoxicity and economic viability.⁸² The use of OPCs as insecticides began in the 1940's, and has received a great impulse between 1960 and 1980, when they gradually replaced the organochloride insecticides (which are less toxic, but much more persistent in the environment). In 1999, OPCs represented about 40% of the global market of pesticides.⁸²

Figure 5. Types of OPCs, according to Gupta.⁷²

Delfino et al. 9 Vol. 00, No. 00, 2009

Before reaching AChE, OPCs may suffer several metabolic biotransformations. Most OPCs (except phosphates and phosphonates) show no or little anticholinesterase activity in their nonmetabolized form.⁸³ The biotransformation of non-toxic OPCs to active metabolites occurs through many different reactions, being the most representative of them the oxidative desulfuration of the thiophosphate group, converting the thiophosphoryl bond to a phosphoryl. In this way, phosphorothioates and phosphorodithioates, which are usually weak AChE inhibitors (due to the low electronegativity of sulfur when compared to oxygen), are converted to their oxidized forms, which are extremely toxic anticholinesterase compounds.⁸³⁻⁸⁵ Other important metabolic reactions are those that result in the detoxification of OPCs. These processes involve the breaking one of the phosphorus bonds, forming a negatively charged molecule,⁸³ or the increase in water solubility of the OPC, making its excretion easier and reducing its half-life in the organism.⁸⁵

4.2 Mechanism of action of OPCs

OPCs used as CWAs and as insecticides act by inhibiting AChE, preventing hydrolysis of ACh. This causes an accumulation of ACh in all cholinergic receptors, resulting in overstimulation of the structures enervated by these cholinergic fibers. The mechanism of the reaction involves a nucleophilic attack of the serine in the AChE

catalytic triad (Ser-200 in TcAChE, Ser-203 in HuAChE) to the phosphorus atom in the OPC. Unlike acetylated AChE, which quickly converts itself in acetic acid and regenerated AChE, the phosphylated enzyme ('phosphylation' denotes both 'phosphorylation' and phosphonylation') is stable and, depending on the groups attached to the phosphorus atom, becomes irreversibly inhibited. The lack of activity of the inhibited enzyme occurs because the serine of the catalytic triad, when phosphylated, can no longer hydrolyze ACh.^{4,36,75,84,86,87} A scheme of AChE inhibition by OPCs is shown in Figure 6. Computational studies of AChE phosphonylation by the nerve agent sarin indicate that the reaction actually involves a two-step addition-elimination mechanism, rather than a concerted one; the addition would be the rate-determining step.^{88,89} OPCs are also able to inhibit BChE action by an analogous mechanism, but the effects of this inhibition in the organism are unknown, since the physiological function of this enzyme is not fully understood yet.⁸⁶ Moreover, OPCs covalently bond to other serine esterases, such as carboxylesterase, neuropathy target esterase (NTE), trypsin and chymotrypsin.⁷⁹

The reaction of OPCs with cholinesterases initially involves the formation of the OPC-enzyme Michaelis complex, followed by the phosphylation of the enzyme and its subsequent inactivation, with replacement of the OPC leaving group by the alcoholic oxygen of the catalytic triad serine. The phosphylated enzyme is stable; nonetheless, the phosphyl-enzyme complex eventually suffers one of different possible secondary processes. The first possibility is the spontaneous reactivation: hydrolysis of the phosphyl-enzyme complex regenerates the cholinesterase, with elimination of the OPC (although this process can be

Figure 6. Scheme of AChE inhibition by OPCs and aging (X = leaving group).

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 10

very slow to be clinically significant). As will be seen, this reactivation can be accelerated by the use of adequate nucleophiles.^{1,2,4,79}

Another possibility is the breaking of the PO-C bond of the phosphylated enzyme, with the subsequent loss of an alkylic carbenium (Figure 6). After this reaction, known as aging, the phosphylated enzyme can no longer be efficiently reactivated spontaneously or by the action of nucleophiles, becoming irreversibly inhibited.^{1,2,4} The mechanism of aging by monodealkylation of a dialkylphosphyl-enzyme is considered classical; non-classical mechanisms have been described. In the case of the nerve agent tabun, aging occurs by breaking of a P-N bond, instead of a PO-C bond, with elimination of a dimethylamine group,^{90,91} however, the possibility of occurring a classical aging for tabun has been recently proven.⁹² Some OPCs can age by different mechanisms. For instance, the insecticide mipafox [O=P(F)(NHCH(CH₃)₂)₂] ages by deprotonation of one of its phosphoroamide groups in the complex with human NTE,⁹³ by loss of two isopropyl groups in the complex with HuAChE⁹⁴ (as represented in Figure 7), and by loss of just one isopropyl group in the complex with equine BChE.⁹⁵

The aged phosphylated cholinesterase cannot be reactivated due to several factors.^{96,97} Firstly, the aged complex possesses a negative charge in the active site, making the attack of a negatively charged nucleophile more difficult. Besides, various non-covalent forces stabilize the aged complex: interactions among the OPC and the oxyanion hole, the acyl pocket and the histidine at the active site either stabilize the

aged complex, either limit the dephosphylation by blocking the access of water or other nucleophiles to the phosphorus atom.⁹⁸⁻¹⁰² Another factor that may contribute to the resistance of aged enzymes for reactivation is the conformational changes that they suffer after aging, making the OPC less exposed to nucleophilic attacks.⁹⁶ Finally, at least in the case of the nerve agent soman, it has been proposed the existence of a “push-pull” electrostatic mechanism, involving residues Glu-199, His-440, Trp-84 and the oxyanion hole in TcAChE, which would stabilize the carbenium formed during aging and favor a methyl migration that would transform a secondary carbenium in a tertiary one.^{97,99,103,104}

Spontaneous reactivation rates of phosphylated cholinesterases are determined by the structure of the phosphyl-enzyme. Except for the nerve agents, spontaneous reactivation occurs at clinically significant rates with the majority of the OPCs, but it is always slower than the deacetylation that happens in the hydrolysis of the natural substrate: Deacetylation of AChE occurs in microseconds, but dephosphylation in hours to days. Generally, the smaller the alkyl groups of the OPC, the faster will be spontaneous reactivation.⁴ Aging rates also depend on the structure of the phosphyl-enzyme complex.

Nucleophilic substitutions of OPCs, all of which have a tetra-coordinated phosphorus atom, pose two questions: what is the position of attack of the nucleophile, and which leaving group is effectively replaced? For reactions with strong nucleophiles, it is considered that the nucleophile approaches perpendicularly to the trigonal face of the phosphorus-centered tetrahedron that is opposed to the leaving group. In this way, a pentavalent trigonal bipyramidal intermediate is formed, where the nucleophile and the leaving group are located on the apical positions (see Figure 6).¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ In OPCs with more than a potential leaving group, the intermediate structure influences which group will be replaced, determining the product stereochemistry. In OPCs, it is common a competition between an alkoxy and a thioalkyl leaving group, the former being more electronegative and the latter being more polarizable, less basic and, therefore, a better leaving group. In the absence of restraining steric

Figure 7. Mechanism of aging of AChE inhibited by mipafox.⁹⁴

Delfino et al. 11 Vol. 00, No. 00, 2009

effects, the most electronegative substituents tend to occupy the apical positions in trigonal bipyramidal structures,^{107,109,110} which would make them the preferable leaving groups. However, the possibility of occurrence of pseudorotations around the phosphorus atom and the possible existence of steric hindrances may result in a less electronegative group occupying an apical position in the intermediate, so becoming the preferable leaving group.^{106,110,111} So, breaking of a P–O or a P–S bond will be the result of a competition between the apicophilicity of the alkoxy group, kinetically favored, and the better stability as leaving group of the thioalkyl group, thermodynamically favored.^{106,108,112}

OPCs cause several deleterious effects in the organism, since ACh accumulation results in an excessive stimulation of nicotinic and muscarinic receptors in both central and peripheral nervous systems. The muscarinic symptoms are the result of an increase of activity of the parasympathetic system and include miosis, salivation, abdominal pain and bradycardia, while the nicotinic symptoms, which affect the autonomic ganglia, are usually tachycardia and hypertension. Effects at both, muscarinic and nicotinic receptors can occur at different organs, like the heart or the central nervous system (CNS). At the

CNS the symptoms are usually headache, muscle tremors, giddiness, convulsions and respiratory arrest, being the latter the responsible for most fatalities caused by OPCs.^{3,4,113} The signs and symptoms of intoxication by these agents (cholinergic syndrome) just appear when more than 50% of AChE is inhibited, and death occurs after inhibition of 90% of the enzyme.⁷¹ Interestingly, the symptoms caused by different nerve agents are similar, with the differences being caused by the variation of inactivation or ageing rates, as well as differences in absorption, distribution and metabolism.⁴ Long-term effects, observable from weeks to months, have been registered, and are due to constant exposition to low doses of OPCs, or to late effects of acute expositions.^{3,4,114}

It should be noted that AChE inhibition does not constitute the only toxic effect of OPCs, since these compounds also inhibit other enzymes. Besides, very high concentrations of cholinesterases inhibitors (many times the lethal dose) can cause direct effects on cholinergic receptors, for instance by blocking the ionic channels. Finally, OPCs can affect other neurotransmission pathways, such as the dopaminergic and the noradrenergic ones, although these perturbations seem to be secondary when compared to effects on cholinergic systems. Despite the relevance of these alternative mechanisms for the clinical effects of OPCs not being completely understood yet,^{3,4} a recent study has mathematically modeled the lethal effects in vivo of several highly toxic OPCs used as nerve agents, concluding that their primary mechanism of action is really AChE inhibition: less than 10% of their toxicity can be attributed to alternative mechanisms.¹¹⁵

4.3 OPCs as chemical warfare agents

The so-called neurotoxic chemical warfare agents, also known as nerve gases or nerve agents, are OPCs which have a very high toxicity to mammals, particularly percutaneously or by inhalation. Their toxicity is much higher than that of OPCs used as insecticides.^{3,4} Nerve gases are usually phosphonofluoridates and S-substituted phosphonothioates, while most OPCs used as insecticides are phosphonothioates with the P=S bond. The main neurotoxic CWAs are known by their military designations attributed by the North Atlantic Organization Treaty (NATO): GA (also denominated tabun; O-ethyl-N,N-dimethyl-phosphoramidate), GB (sarin; O-isopropyl-methyl-phosphonofluoridate), GD (soman; O-pinacolyl-methyl-phosphonofluoridate) and VX (O-ethyl S-[2-(diisopropylamine)ethyl]-methyl-phosphonothioate). These agents are considered nerve gases because they have favorable characteristics for military use, and their structures are represented on Figure 8. There are registrations of an old nerve agent, designated as GF (cyclosarin; O-cyclohexyl-methyl-phosphonofluoridate), whose manufacture is

Figure 8. Structures of the main neurotoxic chemical warfare agents.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 12

similar to that of sarin. This neurotoxic agent would have been discarded by U.S.A. as being of no military interest (for reasons still unknown), and was fabricated by Iraq during the Gulf War.³ VR (or Russian VX; O-isobutyl S-[2-(diethylamine)ethyl]-methylphosphonothioate) is a VX-analogous developed by the Soviet Union. Structures of GF and VR are also represented in Figure 8. Other less relevant (and less studied) nerve agents are GE (O-isopropyl-methyl-phosphonofluoridate), CVX (O-n-butyl S-[2-(diethylamine)ethyl]-methylphosphonothioate, also known as Chinese VX), VE (O-

ethyl S-[2-(diethylamine)ethyl]-ethyl-phosphonothioate), VG (O,O-diethyl S-[2-(diethylamine)ethyl]-ethyl-phosphorothioate) and VM (O-ethyl S-[2-(diethylamine)ethyl]-methyl-phosphonothioate).⁴

Anticholinesterase compounds have been used as weapons in Africa since the XIX century, at least, and the first AChE inhibitor OPC to be developed was probably tetraethylpyrophosphate, synthesized by Wurtz in 1854.³ However, the history of modern nerve agents begins in the 1930's, when the German conglomerate Farbenindustrie initiated a program of syntheses of several compounds, in an attempt to develop new insecticides. In this program, tabun and sarin were synthesized by Schrader in 1936 and 1937, respectively. The high toxicity of these compounds to mammals limited their use as insecticides, but attracted the attention of the German Ministry of Defense, which anticipated their potential as weapons and created a pilot plant for their industrial production in 1942. In 1944, Richard Kuhn synthesized soman, but there was no time to weaponize it before the end of World War II. VX was synthesized in the 1950's in the United Kingdom, being weaponized by U.S.A., and cyclosarin was first synthesized in 1949, by a process analogous to the synthesis of sarin.^{3,4}

Although known as 'nerve gases', neurotoxic OPCs are actually colorless liquids at room temperature: their boiling point varies from 158 °C (sarin) to 298 °C (VX). G-series compounds are relatively volatile and offer more risk when inhaled; VX is very little volatile, and it may be necessary weeks before its complete dissipation. In this way, VX offers low risk of being inhaled (unless at high temperatures), and an elevated risk of being absorbed through the skin.³ Some physical, chemical and toxicological properties of nerve agents are summarized on Table 2. It is believed that toxicity differences among them are partially due to differentiated AChE inhibitions in different parts of the brain.¹¹⁶ VR is not listed on Table 2, but recent studies have shown few differences between the in vitro toxicities of VX and VR, although the former is a bit more toxic.¹¹⁷

All nerve agents present optical isomery: tabun, sarin, cyclosarin, VX and VR have one chiral phosphorus atom each, while soman has an additional stereocenter at a carbon atom of the pinacolyl group. These stereoisomers react with AChE at different rates and possess distinct toxicological properties,¹¹³ so toxicological data in Table 2 should be considered as regarding non-specified mixtures of stereoisomers of each nerve agent. These differences result from the stereochemistry of the active site of AChE, which favors the accommodation of one enantiomer at the active site in detriment to the binding of another one. It is believed that the phenylalanine residues in the acyl pocket (mainly Phe-290 in TcAChE) are the major agents of this selectivity, due to the steric constraints imposed by them.^{66,118} However, molecular modeling⁹⁷ and mutagenesis studies^{63,119} have shown that the oxyanion hole, the anionic subsite and the peripheral anionic site also play an important role in stabilization of the phosphyl-AChE complex and in stereoselectivity.

Table 2. Physical, chemical and toxicological properties of the principal nerve agents

Property	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX
Molecular weight / (Da)	162.3	140.1	182.2	267.4
Boiling point / (°C)	230	158	198	298
Melting point / (°C)	-49	-56	-80	-20

Vapor pressure / mm Hg	0.037 (20 o C)	2.1 (20 o C)	0.40 (25 o C)	0.0007 (20 o C)
Vapor Density (relative to air)	5.6	4.9	6.3	9.2
Liquid Density / (g per mL at 25 o C)	1.08	1.10	1.02	1.01
Volatility / (mg per m ³ a 25 o C)	610	22000	3900	10.5
Solubility in water	9.8 g per100g (25 o C)	miscible	2.1g per 100g (20 o C)	Miscible
Persistency on soil	1-1.5 day (half-life)	2-24 h (5 to 20 o C)	relatively persistent	2-6 days
LCt50 in humans / (mg min per m ³)	400	100	50	10
LD50 in humans / (mg per 70 kg in human)	1000 (percutaneous)	1700 (percutaneous)	350 (percutaneous)	6-10 (percutaneous)

Sources: references 3 and 4.

Delfino et al. 13 Vol. 00, No. 00, 2009

For nerve agents, the stereoisomer with the absolute configuration shown in Figure 9 is usually the most active AChE inhibitor, since the R'O group is greater than the R group.¹¹³ This configuration corresponds to the S-isomers of sarin and VX, and to S-configuration around the phosphorus atom (PS) for soman.^{63,97,118} Table 3 shows the effect of the stereochemistry of nerve agents on their anticholinesterase activity and acute lethality, which is not very expressive.⁹⁷ In the particular case of soman, there is low selectivity related to the chiral carbon atom. In fact, the PS CS isomer is a bit more toxic than the PS CR, and there is practically no difference between their aging rates,¹²⁰ probably because the same carbenium is formed in both cases.

In soman, isomers P(-) have S-configuration on the phosphorus atom, and isomers C(-) have S-configuration on the chiral carbon atom.⁹⁷ Recently, it has been proved that (+)-tabun and (-)-tabun have R- and S-configuration, respectively.¹²¹

Since AChE inhibition is irreversible after aging, there is a great interest on the study of the kinetics of this process. Aging rates vary among the several OPCs: for tabun, the half-life for the aging of the phosphyl-AChE is about 19 hours; for sarin, 3 hours; for cyclosarin, 7 hours; for VX, 36.5 hours; and for soman, only 2 minutes.^{75,79} The extraordinarily fast aging rate of soman constitutes a great challenge for the treatment of victims of this agent, since it demands a nearly immediate administration of the currently used antidotes, limiting their efficacy. It is believed that the rapid aging of soman is due to the formation of a tertiary carbenium (which later rearranges itself in neutral compounds) by a methyl migration in the secondary pinacolyl carbenium aided by a 'push-pull' mechanism, as shown in Figure 10.^{97,99,103,104}

Table 4 compiles data of rate constants for inhibition of HuAChE by racemic mixtures of several nerve agents, and also presents rate constants for aging and spontaneous reactivation of the phosphylated enzyme in each case.

A phenomenon not observed in other nerve agents occurs with tabun. When this compound forms a complex with mouse AChE, still without aging, a movement of the imidazolic ring of His-447 dislocates Tyr-337 and Phe-338, thus reducing the diameter of the active site gorge and

Figure 9. Absolute configuration of the most active nerve agent stereoisomers for AChE inhibition.

Table 3. Effect of the stereochemistry of nerve agents on their anticholinesterase activity and acute lethality

Nerve agent stereoisomer	Rate constant for AChE inhibition / (mol L ⁻¹ min ⁻¹) at 25 °C	LD50 (in mice) / (µg per kg)
C(+)-P(-)-soman	2.8 × 10 ⁸	99 (sc)
C(-)-P(-)-soman	1.8 × 10 ⁸	38 (sc)
C(+)-P(+)-soman	< 5 × 10 ³	> 5000 (sc)
C(-)-P(+)-soman	< 5 × 10 ³	> 2000 (sc)
C(±)-P(±)-soman	not available	156 (sc)
(-)-sarin	1.4 × 10 ⁷	41 (iv)
(+)-sarin	< 3 × 10 ³	not available
(±)-sarin	not available	83 (iv)
(-)-tabun	2.3 × 10 ⁶	119 (iv)
(+)-tabun	3.7 × 10 ⁵	837 (iv)
(±)-tabun	not available	208 (iv)
(-)-VX	4 × 10 ⁸	12.6 (iv)
(+)-VX	2 × 10 ⁶	165 (iv)
(±)-VX	not available	20.1 (iv)

Source: reference 113.

Figure 10. Mechanism for the aging of the soman-AChE complex.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 14

hampering the access of the antidote.¹²¹ This conformational change is reversible, so that the cited residues reverse to the original positions in the apoenzyme and in the aged tabun-AChE complex. It is believed that this phenomenon, denominated conformational aging, renders reactivation of tabun-inhibited AChE quite difficult, even before aging of the complex.¹²²

Another important problem by the use of CWAs is the need of safe and effective cleaning of the contaminated areas and victims skin. Due to their volatility, G-agents have a short biological half-life, while VX and other V-agents are more persistent in the environment. There are several processes for chemical or enzymatic decontamination for these purposes. The discussion of this important subject is beyond the scope of this review, but it may be found elsewhere.¹²³⁻¹²⁶

4.4 Treatment and antidotes for nerve agents

Intoxication with different nerve agents leads to similar symptoms and effects, caused mainly by accumulation of acetylcholine.

Despite their high lethality, most nerve gases have a relatively short period of action, being quickly degraded or dispersed to non-lethal concentrations.¹³ So, just after an

attack with one of these agents, there are significant possibilities for the emergency services to treat the majority of the exposed victims, providing emergency care and, when possible, transporting them to better-equipped facilities. The principles of medical treatment of OPCs victims are the same applied to victims of intoxications by any other toxic substance, that is, termination of exposure to the toxic agent; establishment or maintenance of appropriate ventilation; administration of adequate antidotes, if available; and, finally, correction of cardiac abnormalities. All care must be taken by rescue personnel in order to avoid their own contamination during the treatment and transportation. This is accomplished by the use of appropriate suits and individual protection equipments and the complete decontamination of victims.³ In battle situations, removal of victims of nerve agents to decontamination locals may be a very hard task to accomplish. In these cases, fast administration of antidotes becomes the main priority. With this problem in mind, autoinjector syringes were developed, allowing the administration of the antidotes by the victim itself (or by a colleague) at the first signs of contamination by nerve agents.^{127,128}

When exposure to nerve agents is expected, prophylactic measures may be taken. One of them involves pretreatment with carbamates, such as pyridostigmine or physostigmine. Carbamates are reversible inhibitors of AChE and, once bonded to the enzyme active site, prevents its irreversible inhibition by OPCs, being spontaneously hydrolyzed later.¹²⁹⁻¹³¹ However, their continuous use causes some collateral effects (mainly gastrointestinal).¹²⁹ The use of patches for transdermal drug administration¹³²⁻¹³³ can help to circumvent or mitigate these effects. Another prophylactic alternative consists on the use of compounds which sequester or degrade the nerve agent before it gets to its target. These compounds are denominated scavengers, and are classified as stoichiometric or catalytic. The stoichiometric scavengers are enzymes which bind stoichiometrically and irreversibly to the OPC (such as the cholinesterases themselves), while the catalytic scavengers hydrolyze the molecules of OPCs (such as OPC hydrolases and anhydrases).^{134,135} Several enzymes are being evaluated for use as scavengers, such as human serum BChE, recombinant human BChE expressed in the milk of transgenic goats, genetic variants of AChE and human paraoxonase.¹³⁴⁻¹³⁸ Oximes can be employed for pretreatment, improving the post-treatment by atropine and other oximes^{132,139} (see below), but some questions should be addressed for their use, such as timing, duration and achievement of adequate concentrations after administration.^{132,133}

The chemotherapy employed for the treatment of intoxication with OPCs includes the use of three types of drugs:^{1,3,13,128} (i) an anticholinergic substance, to antagonize the effects of ACh accumulation in the cholinergic receptors; (ii) a central nervous system (CNS) depressor, which acts as an anticonvulsive; and (iii) an oxime to reactivate inhibited AChE.

Atropine, whose structure is shown in Figure 11, is the most used anticholinergic. It competes with ACh for the muscarinic receptors, blocking the effects of the excess of ACh. Atropine is effective in the treatment for all OPCs, being adopted as standard antidote since the end of the decade of 1940 until the present, in spite of the continuous research for new antidotes. However, atropine is unable

Table 4. Rate constants for HuAChE inhibition by nerve agents (k_i) and for aging (k_a) and spontaneous reactivation (k_r) of inhibited HuAChE

Nerve agent	k_i / (mol L ⁻¹ min ⁻¹)	k_a / (h ⁻¹)	k_r / (h ⁻¹)
Tabun	$7.4 \pm 0.2 \times 10^6$	0.036 ± 0.001	N.D.

Sarin	$2.1 \pm 0.1 \times 10^7$	0.228	N.D.
Soman	$9.2 \pm 0.4 \times 10^7$	6.6	N.D.
Cyclosarin	$4.9 \pm 0.0006 \times 10^8$	0.099 ± 0.003	N.D.
VX	$1.2 \pm 0.002 \times 10^8$	0.019 ± 0.001	0.021 ± 0.001
VR	$4.4 \pm 0.006 \times 10^8$	0.005 ± 0.001	0.039 ± 0.002

Each entry in the table indicates mean value \pm standard deviation of 2-5 experiments. N.D.: no spontaneous reactivation of AChE activity during the observation period. Source: reference 75.

Delfino et al. 15 Vol. 00, No. 00, 2009

to counterbalance the action of OPCs in the nicotinic receptors. It should be noted that atropine does not prevent AChE inhibition by OPCs; it just antagonizes the effects of ACh accumulation.

CNS depressors are used to mitigate the convulsions and the muscle spasms commonly associated to acute OPC intoxications. Diazepam, also represented in Figure 11, is the most used compound of this class, but many other analogues can be employed.

Several oximes are employed for reactivation of AChE inhibited by OPCs, provided that the phosphorylated enzyme is not aged yet. They are especially useful in the treatment of OPCs nicotinic effects. The diverse oximes differ among themselves in the optimal dose for reactivation, in toxicity and in effectiveness. However, all of them have three great deficiencies: (i) the utilized oximes are generally quaternary ammonium ions and, as hydrophilic compounds, have many difficulties to cross the blood-brain barrier: their concentrations in the brain are only 1 to 10% of their plasma levels.¹⁴⁰⁻¹⁴² As a consequence, they can reactivate only a small fraction of the inhibited AChE in the CNS; (ii) oximes do not reactivate aged phosphoryl-enzymes; and (iii) unlike atropine, oximes are not effective against all OPCs, having different activities for each one of them.

Oximes that reactivate AChE are usually mono or bis-pyridinic ones. One of the most used of them is pralidoxime, or 2-PAM (2-pyridinium aldoxime), employed in the form of chloride (in USA) or methanesulfonate (in UK). Other European countries utilize other oximes, such as trimedoxime (TMB-4) or obidoxime (or toxogonin).^{1,3,143} The structures of these compounds are shown in Figure 12.

A deficiency of the cited oximes is their low efficacy against soman intoxications. On the other hand, the so-called Hagedorn oximes are much more effective against this nerve agent. The structures of the main Hagedorn oximes (HI-6, HLö-7, HGG-12 e HGG-42) are represented on Figure 13. In general, it can be said that 2-PAM is efficient *in vitro* against sarin and VX, but not against soman, tabun and cyclosarin; obidoxime is effective against sarin, VX and tabun, but not against soman and cyclosarin; and HI-6 is highly efficient against sarin, soman and VX, but not against tabun. The most recent HLö-7 seems to be able to reactivate AChE inhibited by sarin, soman, cyclosarin, tabun and VX, and may constitute the first step towards a truly universal AChE reactivator.^{1,75,143,144} The relative toxicity of these oximes to humans is HI-6 < HLö-7 < 2-PAM < obidoxime < trimedoxime.¹²⁷ Despite the activity of those compounds, there are several problems for the reactivation of AChE *in vivo*. For example, it should be reminded that the fast aging of the AChE phosphorylated by soman limits the use of any oxime as a reactivator.¹⁴³ Also, HI-6 and HLö-7 decompose in aqueous solution, and must be stored as lyophilized powder.¹⁴⁵ To solve this last problem, a recent study has evaluated the possibility of using HI-6 dimethanesulfate,

which is more stable and water soluble than the hydrochloride. The obtained results in that investigation have been encouraging.¹⁴⁶

Nucleophilic reactivation of phosphorylated AChE by an oxime occurs through the mechanism described in Figure 14. Usually, it is considered that the oxime reacts in the deprotonated form (oximate) in nucleophilic reactivation, as represented in Figure 14.¹⁴⁷ However, there are indications

Figure 11. Structures of atropine and diazepam.

Figure 12. Structures of 2-PAM, trimedoxime and obidoxime.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 16

pointing to the possibility that the reaction occurs with the neutral oxime, instead of the oximate;¹⁴⁸ additional studies are needed to elucidate this question.¹⁴⁹ The nucleophilic attack of the oximate (or oxime) to the phosphorus atom is facilitated by the polarization of the phosphoryl bond, which is enhanced by the oxyanion hole. In general, the phosphyl-enzymes derived from nerve agents with SP configuration (which are more toxic) are more prone to reactivation; this indicates that polarization of the phosphoryl bond is necessary for an efficient reactivation by nucleophiles.^{118,150} Ideally, the oximate and the enzyme (the leaving group in the reactivation) would occupy the axial positions in the trigonal bipyramidal intermediate; however, steric constraints in the active site gorge prevent the optimal attack of the oximate. Because of this, reactivations by oximes are much slower than phosphorylation reactions.^{118,150}

The possibility of AChE reinhibition by the phosphorylated oxime may pose a serious clinical problem.^{151,152} Accordingly, an efficient reactivator should have an unstable phosphorylated form. This factor reduces the efficacy of the 4-pyridinium aldoximes (such as 4-PAM, TMB-4 and obidoxime), whose phosphorylated forms decompose slower than those of 2-pyridinium aldoximes).^{152,153} Nevertheless, human serum capacity to decompose phosphorylated oximes attenuates this negative effect.¹⁵⁴ Therefore, the efficiency of an oxime as an antidote for intoxication with neurotoxic OPCs is function of the nucleophilicity of the oximate (or the oxime itself) and the exclusion from the active site and decomposition rate of the phosphorylated oxime.¹⁴³

Structural models for the mechanism of action and the differences in activity among oximes have been proposed.^{122,147,150,155,156} It is known that an adequate orientation of the phosphoryl bond inside the active site is necessary for both the enzyme efficient inhibition and its reactivation; however, the orientation of the oximes in the active site and their angles for attacking the phosphorylated serine are different.¹⁵⁰ Many new oximes have been synthesized, and their capacities of AChE reactivation evaluated.¹⁵⁷⁻¹⁷⁰ Figure 15 shows the structure of some of those new promising bis-pyridinium oximes. For example 1,7-heptylene-bis-N,N'-syn-2-pyridiniumaldoxime, which is 200 times more active than 2-PAM and could lead to the development of compounds able to reactivate aged phosphorylated HuAChE.¹⁵⁸ Other examples of new promising bis-pyridinium oximes are K027 [1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-

Figure 13. Structures of the main Hagedorn oximes.

Figure 14. Reactivation of phosphorylated AChE by oximes.

Delfino et al. 17 Vol. 00, No. 00, 2009

3-(4-carbamoylpyridinium) propane dibromide], K048 [1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium) butane dibromide], which display low toxicity against different types of human cells but have a very good capacity to reactivate HuAChE inhibited with tabun,^{161,165} and similar oximes with an unsaturated linker, like K203 ((E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide).^{166,167} There are evidences that at least some oximes (mainly HI-6 and HLö-7) also act on the treatment of intoxications through direct pharmacological effects, which are not related to AChE reactivation. However, the mechanism of these effects is not well understood yet, but there are some hypotheses.^{127,171} For example, it has been suggested that HI-6 may interfere with GABA-ergic inhibition, a process that is related to regulation of respiration.¹⁷¹ Oximes can bind to the active site of AChE or to the peripheral anionic site, acting as a reversible inhibitors and preventing the enzyme interaction with OPCs. Although this phenomenon has been well documented in in vitro studies, it has not been evaluated yet in terms of experimental toxicology.¹²⁷

Several factors can lead an oxime to be ineffective in the treatment of OPCs intoxications. For instance, it is possible that steric or electronic effects result in low reactivation rates, which happens particularly with phosphoramidates, such as tabun. Also, due to the employed low doses of oximes, it is possible that the rate of AChE inhibition by an OPC is higher than the reactivation rate by the oxime. The oxime optimal concentration might not be kept during the necessary period, when treatment is interrupted too early. Finally, as already cited, AChE re-inhibition by the phosphorylated oximes reduces the antidote efficacy. The treatment regimen with oximes must be rigorously followed in order to maximize the antidote effects, although there are still many doubts about the adequate regimen under certain conditions.¹⁷² Nowadays, it is still discussed even the need of administration of oximes to victims of OPCs intoxication.¹⁷³⁻¹⁷⁵

Studies have shown that, to be an effective AChE reactivator, a compound should possess some structural properties: it should have a quaternary nitrogen atom, which guides the molecule to the active site by interacting with the anionic subsite.¹⁴⁵ Also, the length and the stiffness of the chain linking the pyridinium rings should be adequate for the action against the target OPC. Finally, the antidote molecule should possess one or more oxime groups properly positioned.¹⁷⁶ Nonetheless, the reason for the necessity of this oxime group, instead of another nucleophilic one, is not well understood yet. A proposed explanation considers the alpha effect presented by oximes and oximates.^{177,178} Our research group is conducting further investigations on this point, trying to better understand the need of an oxime as an antidote.

Figure 15. Structures of 1,7-Heptylene-bis-N,N'-syn-2-pyridiniumaldoxime, K027, K033, K048 and K203.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review J. Braz. Chem. Soc. 18

5. Conclusions

Despite the widespread adherence to the Chemical Weapons Convention, chemical warfare agents still constitute a threat, due to the possibility of their use by Non-Signatory States or by terrorist groups. Among these weapons, organophosphorus

neurotoxic agents are the most dangerous. No universal antidote against these compounds is known to date, and the possibility of aging demands a quick-acting AChE reactivator (especially for soman).

The development of antidotes for intoxication with neurotoxic OPCs is important, not only because their potential use as chemical warfare defense agents, but also for the treatment of intoxication with organophosphorus pesticides, which are very intensively used in agriculture.

Continuous research on new oximes for AChE reactivation is being conducted all around the world. However, the incomplete knowledge about the interaction between the oxime and the nerve agent inside the enzyme active does not allow a rational approach for new drugs design; most of the research of new oximes is on empirical basis. It is expected that the application of molecular modeling techniques may eventually shed some light on this subject.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Brazilian Ministry of Defense and CAPES (Pro-defesa), CNPq and IMBEB2 for financial support.

Reinaldo Teixeira Delfino graduated in Chemical Engineering at Military Institute of Engineering (IME), Rio de Janeiro, Brazil (1995). From that Institute, he also received his M.Sc. (2002) and his Ph.D. (2008) in Chemistry, both of them under the orientation of Prof. José D. Figueroa-Villar. He is Captain of the Brazilian Army, and currently Professor of Calculus at IME. His main interests are focused in molecular modeling applied to defense against chemical and biological warfare.

Tatiana S. Ribeiro received her B.Sc. in Chemistry in 2002 and M. Sc. in Organic Synthesis in 2004 from the Institute of Chemistry, Rural Federal University of Rio de Janeiro (UFRRJ), Brazil. Currently, she is a Chemistry Ph. D. student at the Department of Chemistry, Military Institute of Engineering (IME) under the supervision of Prof. José Daniel Figueroa-Villar, working with the synthesis, biological evaluation and NMR kinetics of antidotes for intoxication with neurotoxic compounds.

José Daniel Figueroa-Villar obtained his B. Sc. in Chemistry at Universidad de Costa Rica in 1977 and started his M. Sc. in Biochemistry at the same university in 1978. He obtained his Ph. D. in Organic Chemistry at the University of Alberta, Canada, in 1983, under the orientation of William A. Ayer. He worked as pos-doctoral fellow and research associate at the same university until 1985. In 1986 he became Professor of Chemistry at the Military Institute of Engineering in Rio de Janeiro, Brazil where he is working until now. He was founder of the NMR Users Association (AUREMN) in 1987. In 1999 he created the journal *Annals of Magnetic Resonance*, being its actual Chief Editor. He is the president of AUREMN since 2000. His main area of work is Medicinal Chemistry (NMR, molecular modeling and synthesis) applied to the discovery of chemotherapy for tropical infectious diseases and for defense against chemical and biological warfare agents.

References

1. Somani, S. M.; Solana, R. P.; DUBE, S. N. In *Chemical Warfare Agents*; Somani, S. M., ed., Academic Press Inc.: San Diego, 1992, pp. 68-123.
2. Black, R. M.; Harrison, J. M. In *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*, Vol 4, Ter- and Quinque-phosphorus Acids and Their Derivatives; Hartley, F. R., ed., John Wiley & Sons: Chichester, 1996, pp. 781-840.
3. Sidell, F. R. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Textbook of Military Medicine*; Sidell, F.R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R., eds.; Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 129-179.

4. Marrs, T. C. In *Chemical Warfare Agents- Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 191-221.
5. Smart, J. K. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Textbook of Military Medicine*; Sidell, F. R.; Takafuji, E. T; Franz, D.R., eds., Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 9-86.
6. Ministério do Exército, Estado-Maior do Exército; *Manual de Campanha-Operações Químicas, Biológicas e Nucleares-Defesa Contra Ataques Químicos, Biológicos e Nucleares*, 1st ed., 1987.

Delfino et al. 19 Vol. 00, No. 00, 2009

7. Greenfield, R. A.; Brown, B. R.; Hutchins, J. B.; Iandolo, J. J.; Jackson, R.; Slater, L. N.; Bronze, M. S; *Am. J. Med. Sci.* 2002, 323, 326.
8. Maynard, R. L. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 1-20.
9. Toy, R. J. T. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare - Textbook of Military Medicine*; Sidell, F. R.; Takafuji, E. T; Franz, D. R., eds., Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 87-109.
10. Takafuji, E. T.; Kok, A. B. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Textbook of Military Medicine*; Sidell, F. R.; Takafuji, E. T; Franz, D. R., eds. Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 111-128.
11. Ballantyne, B.; Bismuth, C.; Hall, A. H. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 495-542.
12. OPCW: <http://www.opcw.nl/factsandfigures/index.html#participation>, accessed in September 2008.
13. Cannard, K.; *J. Neurol. Sci.* 2006, 249, 86.
14. UN Report S/16433; United Nations: New York, NY, 1984.
15. UN Report S/117911; United Nations: New York, NY, 1986.
16. MacIlwain, C.; *Nature* 1993, 363, 3.
17. Nagao, M.; Takatori, T.; Matsuda, Y.; Nakajima, M.; Iwase, H.; Iwadate, K.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 144, 198.
18. Yanagisawa, N.; Morita, H.; *J. Neurol. Sci.* 2005, 238, S8.
19. Yanagisawa, N.; Morita, H.; Nakajima, T.; *J. Neurol. Sci.* 2006, 249, 76.
20. Yokoyama, K.; *Neurotoxicology* 2007, 28, 364.
21. Nozaki, H.; Aikawa, N.; Fujishima, S.; Suzuki, M.; Shinozawa, Y.; Hori, S.; Nogaws, S.; *Lancet* 1995, 346, 698.
22. Schumacher, M.; Camp, S.; Maulet, Y.; Newton, M.; MacPhee-Quigley, K; Taylor, S. S.; Friedmann, T; Taylor, P; *Nature* 1986, 319, 407.
23. Taylor, P.; *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 4025.
24. Taylor, P.; Radic, Z.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994, 34, 281.
25. Vellom, D. C.; Radic, Z.; Li, Y.; Pickering, N. A.; Camp, S.; Taylor, P; *Biochemistry* 1993, 32, 12.
26. Masson, P.; Froment, M.-T.; Gillon, E.; Nachon, F.; Lockridge, O.; Schopfer, L. M.; *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1774, 16.
27. Giacobini, E.; *Pharmacol. Res.* 2004, 50, 433.
28. Quinn, D. M.; *Chem. Rev.* 1987, 87, 955.
29. Soreq, H.; Seidman, S.; *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2, 294.

30. He, X.-C.; Feng, S.; Wang, Z.-F.; Shi, Y.; Zheng, S.; Xia, Y.; Jiang, H.; Tang, X.-C.; Bai, D.; *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 1394.
31. Greenfield, S. A.; Zimmermann, M.; Bond, C. E.; *FEBS J.* 2008, 275, 604.
32. Shen, Z.-X.; *Med. Hypotheses* 2008, 70, 43.
33. Rosenberry, T. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975, 72, 3834.
34. Rosenberry, T. L.; Johnson, J. L.; Cusack, B.; Thomas, J. L.; Emani, S.; Venkatasubban, K. S.; *Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 181.
35. Stojan, J.; Marcel, V.; Estrada-Mondaca, S.; Kläebe, A.; Masson, P.; Fournier, D.; *FEBS Lett.* 1998, 440, 85.
36. MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P.; Taylor, S.; *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 12185.
37. Soreq, H.; Ben-Aziz, R.; Prody, C. A.; Seidman, S.; Gnatt, A.; Neville, L.; Lieman-Hurwitz, J.; Lev-Lehman, E.; Ginzberg, D.; Lapidot-Lifson, Y.; Zakut, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 9688.
38. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I.; *Science* 1991, 253, 872.
39. Cygler, M.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M. K.; Doctor, B. P.; *Protein Sci.* 1993, 2, 366.
40. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Verschueren, K. H. G.; Goldman, A.; *Protein Eng.* 1992, 5, 197.
41. Gibney, G.; Camp, S.; Dionne, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 7546.
42. Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Velan, B.; *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 17640.
43. Dodson, G.; Wlodawer, A.; *Trends Biochem. Sci.* 1998, 23, 347.
44. Axelsen, P. H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Protein Sci.* 1994, 3, 188.
45. Fuxreiter, M.; Warshel, A.; *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 183.
46. Gonçalves, A. S.; França, T. C. C.; Wilter, A.; Figueroa-Villar, J. D.; *J. Braz. Chem. Soc.* 2006, 17, 968.
47. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 5128.
48. Tan, R. C.; Truong, T. N.; McCammon, J. A.; Sussman, J. L.; *Biochemistry* 1993, 32, 401.
49. Botti, S. A.; Felder, C. E.; Lifson, S.; Sussman, J. L.; Silman, I.; *Biophys. J.* 1999, 77, 2430.
50. Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T.; *J. Mol. Biol.* 2000, 296, 713.
51. Enyedy, I. J.; Kovach, I. M.; Brooks, B. R.; *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 8043.
52. Nachon, F.; Stojan, J.; Fournier, D.; *FEBS J.* 2008, 275, 2659.
53. Shafferman, A.; Barak, D.; Kaplan, D.; Ordentlich, A.; Kronman, C.; Velan, B.; *Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 123.

Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review *J. Braz. Chem. Soc.* 20

54. Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 2340.
55. Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 10572.
56. Sant'anna, C. M. R.; Viana, A. S.; Junior, N. M. N.; *Bioorg. Chem.* 2006, 34, 77.

57. Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S. V.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D.; *J. Mol. Model.* 2008, 14, 409.
58. Millard, C. B.; Koellner, G.; Ordentlich, A.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 9883.
59. Barak, D.; Kaplan, D.; Ordentlich, A.; Ariel, N.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochemistry* 2002, 41, 8245.
60. Kaplan, D.; Barak, D.; Ordentlich, A.; Kronman, C.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochemistry* 2004, 43, 3129.
61. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 9031.
62. Selwood, T.; Feaster, S. R.; States, M. J.; Pryor, A. N.; Quinn, D. M.; *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 10477.
63. Ordentlich, A.; Barak, D.; Sod-Moriah, G.; Kaplan, D.; Mizhari, D.; Segall, Y.; Kronman, C.; Karton, Y.; Lazar, A.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochemistry* 2004, 43, 11255.
64. Ma, J. C.; Dougherty, D. A.; *Chem. Rev.* 1997, 97, 1303.
65. Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A.; *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 19509.
66. Hosea, N. A.; Berman, H. A.; Taylor, P.; *Biochemistry* 1995, 34, 11528.
67. Taylor, P.; Radic, Z.; Hosea, N. A.; Camp, S.; Marchot, P.; Berman, H. A.; *Toxicol. Lett.* 1995, 82/83, 453.
68. Silman, I.; Millard, C. B.; Ordentlich, A.; Greenblatt, H. M.; Harel, M.; Barak, D.; Shafferman, A.; Sussman, J. L.; *Chem.-Biol. Interact.* 1999, 119-120, 43.
69. Bourne, Y.; Taylor, P.; Radic, Z.; Marchot, P.; *EMBO J.* 2003, 22, 1.
70. Radic, Z.; Taylor, P. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., ed.; Elsevier Academic Press: London, 2006, pp. 161-186.
71. Moretto, A. *Toxicol. Lett.* 1998, 102-103, 509.
72. Gupta, R. C. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., ed., 1st ed., Elsevier Academic Press: London, 2006, pp. 5-24.
73. Carlton, F. B.; Simpson, W. M.; Haddad, L. M. In *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*; Haddad, L. M.; Shannon, M. W.; Winchester, J. F., eds., 3rd ed., WB Saunders Company: Philadelphia, 1998, pp.836-850.
74. Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Carrera, V.; *Toxicol. Lett.* 2004, 151, 219.
75. Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P.; *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 2237.
76. Larini, L. In *Toxicologia*; Larini, L., ed., 2nd ed., Editora Manole Ltda: São Paulo, Brazil, 1993, pp. 136-163.
77. Bardin, P. G.; *Arch. Intern. Med.* 1994, 154, 1433.
78. Carey, F. A.; Sundberg, R. J.; *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis*, 4th ed., Plenum; *Organophosphorus Reagents in Organic Synthesis*, Cadogan, Academic Press; *Organic Chemistry*, Clayden, Greeves, Warren and Wothers: Oxford, 2001.
79. Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; *Toxicology* 2005, 214, 182.
80. Casida, J. E.; Quistad, G. B.; *Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 277.
81. Casida, J. E.; Quistad, G. B.; *J. Pestic. Sci.* 2004, 29, 81.
82. Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; DaCosta, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R.; *Quím. Nova*, 2007, 30, 159.
83. Jakanovic, M.; *Toxicology* 2001, 166, 139.
84. Kwong, T. C.; *Ther. Drug Monit.* 2002, 24, 144.

85. Tang, J.; Rose, R. L.; Chambers, J. E. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., ed., 1st ed., Elsevier Academic Press: London, 2006, pp. 127-143.
86. Fukuto, T. R.; *Environ. Health Perspect.* 1990, 87, 245.
87. Majumdar, D.; Roszak, S.; Leszczynski, J.; *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 13597.
88. Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J.; *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 7567.
89. Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J.; *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 3485.
90. Barak, D.; Ordentlich, A.; Kaplan, D.; Barak, R.; Mizrahi, D.; Kronman, C.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochemistry* 2000, 39, 1156.
91. Elhanany, E.; Ordentlich, A.; Dgany, O.; Kaplan, D.; Segall, Y.; Barak, R.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 912.
92. Carletti, E.; Li, H.; Li, B.; Ekström, F.; Nicolet, Y.; Loiodice, M.; Gillon, E.; Froment, M. T.; Lockridge, O.; Schopfer, L. W.; Masson, P.; Nachon, F.; *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16011.
93. Kropp, T. J.; Glynn, P.; Richardson, R. J.; *Biochemistry* 2004, 43, 3716.
94. Kropp, T. J.; Richardson, R. J.; *Chem. Res. Toxicol.* 2006, 19, 334.
95. Kropp, T. J.; Richardson, R. J.; *Chem. Res. Toxicol.* 2007, 20, 504.
96. Curtil, C.; Masson, P.; *Ann. Pharm. Fr.* 1993, 51, 63.
97. Bencsura, A.; Enyedy, I.; Kovach, I. M.; *Biochemistry* 1995, 34, 8989.
98. Ordentlich, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A. *FEBS Lett.* 1993, 334, 215.
99. Qian, N.; Kovach, I. M.; *FEBS Lett.* 1993, 336, 263.
100. Segall, Y.; Waysbort, D.; Barak, D.; Ariel, N.; Doctor, B. P.; Grunwald, J.; Ashani, Y.; *Biochemistry* 1993, 32, 13441.
101. Shafferman, A.; Ordentlich, A.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Velan, B.; *Biochem. J.* 1996, 318, 833.

Delfino et al. 21 Vol. 00, No. 00, 2009

102. Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A.; Greenblat, H. M.; Harel, M.; Raves, M. L.; Segall, Y.; Barak, D.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Biochemistry* 1999, 38, 7032.
103. Viragh, C.; Akhmetshin, R.; Kovach, I. M.; *Biochemistry* 1997, 36, 8243.
104. Saxena, A.; Viragh, C.; Frazier, D. S.; Kovach, I. M.; Maxwell, D. M.; Lockridge, O.; Doctor, B. P.; *Biochemistry* 1998, 37, 15086.
105. Westheimer, F. H.; *Acc. Chem. Res.* 1968, 1, 70.
106. DeBruin, K. E.; Tang, C.-I.; Johnson, D. M.; Wilde, R. L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 5871.
107. Thatcher, G. R. J.; Kluger, R.; *Adv. Phys. Org. Chem.* 1989, 25, 99.
108. Seckuté, J.; Menke, J. L.; Emmett, R. J.; Patterson, E. V.; Cramer, C. J.; *J. Org. Chem.* 2005, 70, 8649.
109. Muettterties, E. L.; Mahler, W.; Schmutzler, R.; *Inorg. Chem.* 1963, 2, 613.
110. Cramer, C. J.; Gustafson, S. M.; *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9315.
111. Cavell, R. G.; Gibson, J. A.; The, K. I.; *Inorg. Chem.* 1978, 17, 2880.
112. Menke, J. L.; Patterson, E. V.; *J. Mol. Struct.* 2007, 811, 281.
113. Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A.; *Acc. Chem. Res.* 1988, 21, 368.
114. Rafai, M. A.; Boulaajaj, F. Z.; Bourezgui, M.; Charra, B.; Otmani, H. E.; Benslama, A.; Motaouakkil, S.; Slassi, I.; *Neurophysiol. Clin.* 2007, 37, 35.
115. Maxwell, D. M.; Brecht, K. M.; Koplovitz, I.; Sweeney, R. E.; *Arch. Toxicol.* 2006, 80, 756.

116. Bajgar, J.; Hajek, P.; Slizova, D.; Krs, O.; Fusek, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Bartosova, L.; Blaha, V.; *Chem.-Biol. Interact.* 2007, 165, 14.
117. Kuca, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Hrabinoval, M.; Bartosova, L.; Opletalova, V.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 98, 389.
118. Taylor, P.; Wong, L.; Radic, Z.; Tsigelny, I.; Brüggemann, R.; Hosea, N. A.; Berman, H. A.; *Chem.-Biol. Interact.* 1999, 119-120, 3.
119. Ordentlich, A.; Barak, D.; Sod-Moriah, G.; Kaplan, D.; Mizrahi, D.; Segall, Y.; Kronman, C.; Karton, Y.; Lazar, A.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 191.
120. Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A.; Ariel, N.; Barak, R.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochemistry* 1999, 38, 3055.
121. Ekström, F.; Akfur, C.; Tunemalm, A.-K.; Lundberg, S.; *Biochemistry* 2006, 45, 74.
122. Ekström, F.; Pang, Y.-P.; Boman, M.; Artursson, E.; Akfur, C.; Börjegen, S.; *Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 597.
123. Yang, Y.-C.; Baker, J. A.; Ward, J. R.; *Chem. Rev.* 1992, 92, 1729.
124. Yang, Y.-C.; *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 109.
125. Morales-Rojas, H.; Moss, R. A.; *Chem. Rev.* 2002, 102, 2497.
126. Smith, B. M.; *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 470.
127. Jokanovic, M.; Stojiljkovic, M. P.; *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 553, 10.
128. McDonough, J. H.; Shih, T.-M. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 287-303.
129. Dunn, M. A.; Hackley, B. E.; Sidell, F. R. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Textbook of Military Medicine*; Sidell, F.R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R., eds.; Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 181-196.
130. Eckert, S.; Eyer, P.; Mückter, H.; Worek, F.; *Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 344.
131. Scott, L. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 343-353.
132. Bajgar, J.; *J. Med. Chem. Def.* 2004, 1, 1.
133. Layish, I.; Krivoy, A.; Rotman, E.; Finkelstein, A.; Tashma, Z.; Yehezkelli, Y.; *Isr. Med. Assoc. J.* 2005, 7, 182.
134. Doctor, B. P.; Saxena, A.; *Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 167.
135. Lenz, D. E.; Yeung, D.; Smith, J. R.; Sweeney, R. E.; Lumley, L. A.; Cerasoli, D. M.; *Toxicology* 2007, 233, 31.
136. Evron, T.; Geyer, B. C.; Cherni, I.; Muralidharan, M.; Kilbourne, J.; Fletcher, S. P.; Soreq, H.; Mor, T. S.; *FASEB J.* 2007, 21, 2961.
137. Huang, Y.-J.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Lazaris, A.; Leduc, M.; Bilodeau, A. S.; Bellemare, A.; Côté, M.; Herskovits, P.; Touati, M.; Turcotte, C.; Valeanu, L.; Lemée, N.; Wilgus, H.; Bégin, I.; Bhatia, B.; Rao, K.; Neveu, N.; Brochu, E.; Pierson, J.; Hockley, D. K.; Cerasoli, D. M.; Lenz, D. E.; Karatzas, C. N.; Langermann, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104, 13603.
138. Rochu, D.; Chabrière, E.; Masson, P.; *Toxicology* 2007, 233, 47.
139. Vrdoljak, A. L.; Calic, M.; Radic, B.; Berend, S.; Jun, D.; Kuca, K.; Kovaric, Z.; *Toxicology* 2006, 228, 41.
140. Petroianu, G. A.; Lorke, D. E.; Hasan, M. Y.; Adem, A.; Sheen, R.; Nurulain, S. M.; Kalasz, H.; *J. Appl. Toxicol.* 2007, 27, 350.

141. Lorke, D. E.; Hasan, M. Y.; Nurulain, S. M.; Sheen, R.; Kuca, K.; Petroianu, G. A.; *J. Appl. Toxicol.* 2007, 27, 482.
142. Lorke, D. E.; Kalasz, H.; Petroianu, G. A.; Tekes, K.; *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 743.
143. Eyer, P. A.; Worek, F. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 305-329.
- Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review *J. Braz. Chem. Soc.* 22
144. Worek, F.; Reiter, G.; Eyer, P.; Szinicz, L.; *Arch. Toxicol.* 2002, 76, 523.
145. Kassa, J.; *J. Toxicol.- Clin. Toxicol.* 2002, 40, 803.
146. Kassa, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Bajgar, J.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 101, 328.
147. Ashani, Y.; Radic, Z.; Tsigelny, I.; Vellom, D. C.; Pickering, N. A.; Quinn, D. M.; Doctor, B. P.; Taylor, P.; *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 6370.
148. Castro, A. T.; Figueroa-Villar, J. D.; *Int. J. Quantum Chem.* 2002, 89, 135.
149. Silva, G. R.; Borges Jr., I.; Figueroa-Villar, J. D.; *Int. Quant. Chem.* 2005, 105, 260.
150. Wong, L.; Radic, Z.; Brüggemann, R. J. M.; Hosea, N.; Berman, H. A.; Taylor, P.; *Biochemistry* 2000, 39, 5750.
151. Luo, C.; Saxena, A.; Smith, M.; Garcia, G.; Radic, Z.; Taylor, P.; Doctor, B. P.; *Biochemistry* 1999, 38, 9937.
152. Ashani, Y.; Bhattacharjee, A. K.; Leader, H.; Saxena, A.; Doctor, B. P.; *Biochem. Pharmacol.* 2003, 66, 191.
153. Worek, F.; Eyer, P.; Kiderlen, D.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; *Arch. Toxicol.* 2000, 74, 21.
154. Kiderlen, D.; Worek, F.; Klimmek, R.; Eyer, P.; *Arch. Toxicol.* 2000, 74, 27.
155. Ekström, F. J.; Astot, C.; Pang, Y.-P.; *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 82, 282.
156. Worek, F.; Aurbek, N.; Koller, M.; Becker, C.; Eyer, P.; Thiermann, H.; *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1807.
157. Lucic, A.; Radic, B.; Peraica, M.; Mesic, M.; Primožic, I.; Binenfeld, Z.; *Arch. Toxicol.* 1997, 71, 467.
158. Pang, Y.-P.; Kollmeyer, T. M.; Hong, F.; Lee, J.-C.; Hammond, P. I.; Haugabouk, S. P.; Brimijoin, S.; *Chem. Biol.* 2003, 10, 491.
159. Kim, T.; Kuca, K.; Jun, D.; Jung, Y.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 2914.
160. Kuca, K.; Bartosova, L.; Kassa, J.; Cabal, J.; Bajgar, J.; Kunesova, G.; Jun, D.; *Ext. Abstr. / Chem.-Biol. Interact.* 2005, 157-158, 367.
161. Calic, M.; Vrdoljak, A. L.; Radic, B.; Jelic, D.; Jun, D.; Kuca, K.; Kovarik, Z.; *Toxicology* 2006, 219, 85.
162. Kuca, K.; Jun, D.; Kim, T.; Cabal, J.; Jung, Y.; *Bull. Korean Chem. Soc.* 2006, 27, 395.
163. Vrdoljak, A. L.; Lovric, J.; Radic, B.; Zlender, V.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 99, 17.
164. Kassa, J.; Karasova, J.; *Toxicology* 2007, 229, 136.
165. Kuca, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Musilova, L.; *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 101, 25.
166. Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K.; *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 6733.

167. Musilek, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Kassa, J.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K.; J. Med. Chem. 2007, 50, 5514.
168. Acharya, J.; Gupta, A. K.; Mazumder, A.; Dubey, D. K.; Toxicol. in Vitro 2008, 22, 525.
169. Jun, D.; Kuca, K.; Picha, J.; Koleckar, V.; Marek, J.; Drug Chem. Toxicol. 2008, 31, 1.
170. Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K.; Toxicology 2008, 243, 311.
171. Van Helden, H. P. M.; Busker, R. W.; Melchers, B. P. C.; Bruijnzeel, P. L. B.; Arch. Toxicol. 1996, 70, 779.
172. Eyer, P.; Toxicol. Rev. 2003, 22, 165.
173. Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Eyer, P.; Dawson, A. H.; Lancet 2008, 371, 597.
174. Hmouda, H.; Salem, C. B.; Bouraoui, K.; Lancet 2008, 371, 2169.
175. Eddleston, M.; Dawson, A. H.; Buckley, N. A.; Lancet 2008, 371, 2170.
176. Kuca, K.; Jun, D.; Musilek, K.; Mini-Rev. Med. Chem. 2006, 6, 269.
177. Buncl, E.; Cannes, C.; Chatrousse, A.-P.; Terrier, F.; J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 8766.
178. Terrier, F.; Rodriguez-DaFonte, P.; Le Guével, E.; Moutiers, G.; Org. Biomol. Chem. 2006, 4, 4352.

Received: October 23, 2008
Web Release Date: March 6,

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)