



UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO

Estudo da Cinética de Inibição Anticolinesterásica por Dialquilfosforamidatos

Aline Figueira Lira

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estudo da Cinética de Inibição Anticolinesterásica por Dialquilfosforamidatos

Aline Figueira Lira

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo da Cinética de Inibição Anticolinesterásica por Dialquilfosforamidatos

Aline Figueira Lira

Sob a Orientação do Professor

Dr. Victor Marcos Rumjanek

Co-Orientação do Professor

Dr. Emerson G. Pontes

Dissertação submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2010

547
L768e
T Lira, Aline Figueira, 1985-.
Estudo da cinética de inibição
Anticolinesterásica por
Dialquilfosforamidatos / Aline Figueira
Lira - 2010.

75 f.: il.

Orientador: Victor Marcos Rumjanek.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 49-58.

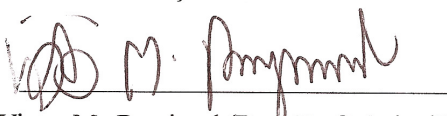
1. Química orgânica - Teses. 2.
Cinética química - Teses. 3. Inibidores
(química) - Teses. I. Rumjanek, Victor
Marcos, 1953-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA ORGÂNICA**

Aline Figueira Lira

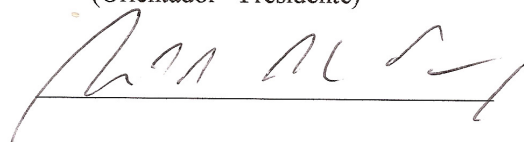
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM



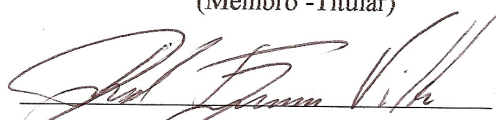
Prof. Dr. Victor M. Rumjanek(Dep. De Química/ICE/UFRRJ)

(Orientador - Presidente)



Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha(LBCT/CBB/UENF)

(Membro -Titular)



Prof. Dr. José Daniel Figueroa Villar (IME)

(Membro -Titular)

Prof. Dr. Carlos Mauricio R. Sant' Anna(Dep. De Química/ICE/UFRRJ)

(Membro - Suplente)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Deus, por todas as vitórias incontestáveis e magníficas que tem me proporcionado desde meu nascimento até hoje.

Aos meus pais Maria Lucia e Raimundo pelo apoio incondicional em todas as decisões que outrora tomei em minha vida.

A minha irmã Camila e ao meu namorado Thiago pelo apoio e amizade.

Aos meus grandes amigos: Tereza, Carla, Vinicius, Janaina, Daniel, Letícia, André, Ceará, Marcelo, Jorge Fábio, pelo companheirismo, ajuda e amizade que foram fundamentais para meu trabalho e obtenção de conhecimento, principalmente nos momentos de tensão.

Ao Professor Arnoldo Façanha pela ajuda no início desse trabalho.

Ao Professor Victor Rumjanek pela amizade e oportunidade, por creditar a mim a execução deste trabalho, pela paciência e confiança depositadas.

Aos professores, João Batista, Mario Geraldo, Rosane e Carlos Mauricio pelo conhecimento adquirido durante todo o meu curso de pós-graduação em química que me tornou o que sou hoje.

Aos amigos e familiares.

Aos todos os amigos da pós-graduação pelo convívio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

Ao CNPQ por fornecer a bolsa.

E a todos aqueles que sempre torcem pelo meu sucesso, ajudando-me e incentivando-me.

Dedico este trabalho aos meus pais pela contribuição à minha formação e pelo apoio incondicional em todos os momentos, e a minha irmã Camila e meu namorado Thiago pela torcida e companheirismo ao longo desta jornada.

RESUMO

Lira, Aline Figueira. **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE DIALQUILFOSFORAMIDATOS**. 2010. Dissertação (mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O controle de insetos considerados como pragas é feito em grande parte com o uso de compostos organofosforados (OFs). Estes compostos atuam inibindo a enzima acetilcolinaesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h do contato. Novas estruturas são necessárias devido ao processo de desenvolvimento de resistência às estruturas usadas no combate a muitas espécies de insetos. Além disso, alguns organofosforados que são inibidores reversíveis da acetilcolinaesterase (AChE) podem ser usados no tratamento do mal de Alzheimer o que enfatiza a importância do estudo de suas interações com a enzima AChE é de interesse.

Neste trabalho propôs-se realizar uma investigação cinética e a atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* de compostos organofosforados sintetizados no laboratório de Química Orgânica da UFRRJ, que podem agir como pesticidas em geral.

Foi efetuada preliminarmente uma triagem com dos 12 compostos e posteriormente foi realizada uma investigação cinética com os compostos **3, 5, 7, 9 e 10** que apresentaram uma inibição. A cinética enzimática foi estudada segundo o método de Ellman. Assim, observou-se que os compostos **3 e 10** apresentaram uma inibição reversível incompetitiva e os compostos **5 e 9** apresentaram uma inibição reversível não competitiva e somente o composto **7** apresentou uma inibição irreversível.

Com o objetivo de correlacionar a atividade anticolinesterásica com a atividade pesticida, foi realizado um teste com os 12 compostos frente à larva do mosquito *Aedes aegypti*. Os compostos **6, 8, 9, 11 e 12** não puderam ser testados pois apresentam baixa solubilidade em água. Os compostos **1, 2, 3 e 4** não apresentaram atividade pesticida mesmo após 48 horas de contato com a larva. Após 48 horas foi observada atividade larvicida de 53,33% para o composto **5**, e 20 % de atividade larvicida para o composto

10. Somente o composto **7** apresentou atividade pesticida tendo um valor de $DL_{50} = 0,876$ mM.

ABSTRACT

Control of insects which are pests is done in the majority of cases with organophosphorus compounds (OP). These compounds act through the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), an enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. They have low residual activity, low stability in the environment and limited accumulation in living organisms and 80 to 90% of compounds are eliminated after 48 h of contact. New structures are necessary due to development of resistance to known structures by many classes of insects. Furthermore, some organophosphorus compounds which are reversible inhibitors of AChE maybe used in the treatment of Alzheimer's disease which emphasizes the importance of investigating the interaction between them and the enzyme.

This work describes the kinetic investigation and also an *Aedes aegypti* larvicidal study on 12 organophosphorus compounds synthesized in the Organic chemistry laboratory at UFRRJ, which may act as insecticides. Furthermore, some organophosphorus compounds, which are reversible inhibitors of AChE, may be used to alleviate the symptoms of Alzheimer's disease, and for this reason the investigation of the interactions between these compounds are of interest.

A preliminary screening was carried out with the 12 compounds and afterwards an investigation of the kinetics of the inhibition process was undertaken with compounds **3**, **5**, **7**, **9** and **10**, which showed significant inhibition. The study was carried out employing Ellman's method. Thus, compounds **3** and **10** showed reversible incompetitive inhibition while compounds 5 and 9 showed reversible non competitive inhibition and finally compound 7 showed an irreversible inhibition.

In order to correlate enzyme inhibitory activity with insecticide ability, a study was undertaken with the 12 compounds with *Aedes aegypti* larvae. Compounds **6**, **8**, **9**, **11** and **12** were not tested because of very low water solubility. Compounds **1**, **2**, **3** and **4** did not show any activity even after 48 h. After 48 h, compound 5 showed an activity of 53.33% and compound **10** exhibited 20% activity. Only compound 7 showed a significant activity having a $DL_{50} = 0,876$ mM.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Valores de absorbâncias e concentrações para o composto 5 como demonstrativo de cálculo utilizado para a avaliação da atividade anticolinesterásica	30
Tabela 2 : Valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ para o composto 5 como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática.....	33
Tabela 3: Percentual de inibição dos compostos em diferentes concentrações.....	35
Tabela 4: Percentual de inibição da Fisostigmina em diferentes concentrações.....	36
Tabela 5: Valores de CI_{50} e seus respectivos desvios padrões para os compostos avaliados quanto à atividade da inibição da Acetilcolinesterase.....	41
Tabela 6: Valores de concentração do Substrato (mM), ABS, $1/v^o$ e $1/[S]$ para a realização do gráfico de Lineweaver-Burk de interação da Acetilcolinesterase com a acetiltiocolina.....	42
Tabela 7: Valores de concentração do substrato e velocidade catalítica da enzima na presença do composto 7 na concentração de 250 μ M.....	45
Tabela 8: Valores de variação do percentual de inibição com a variação de tempo em minutos para três concentrações diferentes do composto 7.....	45
Tabela 9: Correlação da natureza de inibição e o valor de CI_{50} com o valor de K_i	46
Tabela10: dados de percentual de atividade larvicidas e concentração do composto 7 testada.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos inseticidas OF	3
Figura 2. Princípios Ativo de Bladan	3
Figura 3. Inseticidas OF responsáveis pelo avanço no uso de pesticidas em agricultura.	4
Figura 4. OF de baixa toxidez	4
Figura 5. Formula geral de fosforamidatos	5
Figura 6. Inseticidas fosforamidatos	5
Figura 7. Inseticidas OF menos tóxicos para mamíferos	6
Figura 8. Cinética de Michaelis-Menten	8
Figura 9. Gráfico de Lineaweaver-Burk.	9
Figura 10 Gráfico de Lineaweaver-Burk de inibição reversível competitiva	11
Figura 11. Gráfico de Lineaweaver-Burk de inibição reversível não competitiva	12
Figura 12. Gráfico de Lineaweaver-Burk de inibição reversível incompetitiva	14
Figura 13. Estrutura tridimensional da AChE de <i>Torpedo californica</i>	15
Figura 14. A função da acetilcolina e da AChE na sinapse nervosa.	16
Figura 15. Alguns inibidores reversíveis da AChE.	19
Figura 16. Fosforamidatos inibidores reversíveis da AChE	20
Figura 17. Inibição da AChE	23
Figura 18. Fosforamidatos estudados	26
Figura 19. Exemplo de cálculo do valor de CI_{50} (μM) para o composto 5	31
Figura 20. Cálculo de cinética enzimática para o composto 5	33
Figura 21. Recipiente plástico para teste de atividade larvicida	34
Figura 22. Gráfico de CI_{50} para o composto 2.	37
Figura 23. Gráfico de CI_{50} para o composto 3	37
Figura 24. Gráfico de CI_{50} para o composto 5	38
Figura 25. Gráfico de CI_{50} para o composto 7	38
Figura 26. Gráfico de CI_{50} para o composto 9	39
Figura 27. Gráfico de CI_{50} para o composto 10	39
Figura 28. Gráfico de CI_{50} para o Acefato	40
Figura 29. Gráfico de CI_{50} para a Fisostigmina	40
Figura 30. Gráfico de Lineaweaver-Burk para interação da AChE com acetilcolina.	42
Figura 31. Gráfico de cinética de inibição de AChE pelo composto 3	43

Figura 32. Gráfico de cinética de inibição de AChE pelo composto 5	43
Figura 33. Gráfico de cinética de inibição de AChE pelo composto 9	44
Figura 34. Gráfico de cinética de inibição de AChE pelo composto 10	44
Figura 35. Gráfico de DL ₅₀ do composto 7..	47

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação envolvida em uma inibição reversível competitiva.	10
Esquema 2: Reação envolvida em uma inibição reversível não competitiva.	11
Esquema 3: Reação envolvida em uma inibição reversível incompetitiva.	13
Esquema 4: Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE.	17
Esquema 5: Sítios de ação da AChE no sistema nervoso e seus receptores.	22
Esquema 6: Reações envolvidas no método de Ellman.	29

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis[2-nitrobenzóico]

ACTI - iodeto de acetiltiocolina

AChE - acetilcolinesterase

OF - organofosforado

Teep - tetraetilpirofosfato

DA - doença de Alzheimer

BSA - albumina sérica bovina

[S]- Concentração de Acetiltiocolina ou concentração de substrato

AE- Atividade anticolinesterásica

SUMÁRIO

Índice de tabela	VI
Índice de figura	VII
Índice de esquema	IX
Abreviaturas e Símbolos	X
1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Revisão da Literatura	2
2.1.Organofosforados como pesticidas	2
2.2. Enzimas	6
2.3.Inibidores enzimáticos reversíveis e irreversíveis	9
2.3.1. Inibidores Reversíveis	9
2.3.2. Inibidores irreversíveis	14
2.4. Acetilcolinesterase	14
2.5. Inibidores Reversíveis e Irreversíveis da AChE	18
2.5.1. Inibidores Reversíveis	18
2.5.2. Inibidores Irreversíveis	20
2.6. Principais Aspectos de Inibição Da AChE pelos OF	22
2.7. Dengue	24
2.7.1. <i>Aedes Aegypti</i>	24
3. OBJETIVOS	27
4. PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1. Materiais e Métodos	27
4.1.1. Equipamentos	27
4.1.2. solventes e Reagentes Utilizados	27
4.2. Ensaio químico-biológico	28
4.2.1. Avaliação da atividade Anticolinesterásica	28
4.2.2. Cinética Enzimática	31

4.2.3. Ensaio de atividade larvicida contra a larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Avaliação da atividade Anticolinesterásica	34
5.2. Cinética Enzimática	41
5.3. Ensaio de atividade larvicida contra a larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	46
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1-INTRODUÇÃO

Em razão do aumento crescente da população mundial e da demanda por alimentos torna-se necessário um tratamento adequado das plantações a fim de aumentar a produção e abastecer toda a população. Este inclui novos fertilizantes para o solo e pesticidas utilizados no controle de pragas.

Os pesticidas ou praguicidas, são todas as substâncias ou misturas que tem como objetivos impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Segundo SANCHES(2003) os pesticidas ou praguicidas podem ser classificados em: acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, rodenticidas, vermífugos.

A utilização de pesticidas ocorre há aproximadamente 5.000 anos com o objetivo de diminuir os danos na colheita, sendo o enxofre o primeiro a ser utilizado. Por volta do Século XV, começaram a ser utilizados elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio no combate a pragas em colheitas. No Século XVII, o sulfato de nicotina foi extraído das folhas de tabaco para ser usado como pesticida.(EMBRAPA, 2005)

O DDT foi sintetizado em 1874, mas foi apenas em 1939 que Paul Müller descobriu sua característica inseticida e desta forma acabou se transformando no pesticida mais usado no mundo. Foi utilizado largamente depois da segunda guerra mundial para o combate do mosquito causador da malária e do tifo. Porém, na década de 60 foi descoberto que este provocava danos à saúde de diversas espécies de mamíferos .Atualmente, o DDT é proibido em pelo menos 86 países (KAUSHIK, 2007). No entanto, ele continua sendo usado em algumas nações no combate à malária e outras doenças tropicais, matando mosquitos e outros insetos transmissores.(<http://scienceblogs.com.br/ecodesenvolvimento/2008/10/blogagem-coletivadescobertas-cientificas.php>;<http://www.diaadia.pr.gov.br/tvpendrive/modules/mylinks/viewcat.php?cid=1&letter=D&min=90&orderby=titleA&show=10>).

Na década de 50, o uso de pesticidas dobrou,e cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são usadas atualmente todos os anos. De acordo com o Relatório da FAO, em 2006 o Brasil era o terceiro maior consumidor de agroquímicos do mundo. Em 2008 o Brasil assumiu a liderança no consumo de agrotóxico superando os Estados Unidos, segundo informa o presidente mundial do instituto internacional de pesquisa em agronegócios Kleffmann Group, Burkhard Kleffmann. Em 2008, o número

de aplicações nas lavouras brasileiras de soja cresceu 5,3% e movimentou US\$ 2,38 bilhões, 33% a mais que na safra anterior. Dados preliminares da indústria indicam que os produtores brasileiros compraram entre US\$ 6,9 bilhões e US\$ 7 bilhões em defensivos agrícolas, US\$ 200 milhões a mais que os norte-americanos, até então líderes mundiais, gerando um acréscimo de 15% na demanda global quando comparado com 2007

<http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=83274>;

<http://www.aged.ma.gov.br/2009/1/21/Pagina245.htm>; http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399).

Um dos maiores problemas enfrentados pelo agricultores no uso excessivo de pesticidas é o desenvolvimento de resistência de pragas a pesticidas. O primeiro caso de resistência de uma praga a um pesticida foi documentado em 1908 para piolho-de-São José, resistente ao enxofre, nos Estados Unidos (ANDRADE & MODOLO, 1991; MACORIS *et al.*, 1999). A evolução da resistência de pragas a pesticidas teve um grande aumento na década de 40 quando foram introduzidos os inseticidas organo-sintéticos. A resistência já foi detectada para praticamente todos os grupos de pesticidas, incluindo DDT, ciclodienos, organofosforados, carbamatos, piretróides etc (MACORIS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1997; CAMPOS & ANDRADE, 2001; REY *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2008; POURPARDIN *et al.*, 2008).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Organofosforados como pesticidas

Os compostos organofosforados (OF), compõem uma das classes mais importantes usadas no controle de pestes, juntamente com os carbamatos e os piretróides, e respondem por cerca de 40% do mercado de pesticidas. Os OF são ésteres derivados dos ácidos fosfóricos, fosfônicos, fosfínicos e fosforamídicos. A estrutura básica destes compostos é mostrada na **Figura 1**.

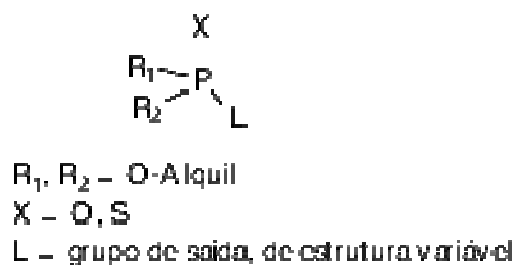
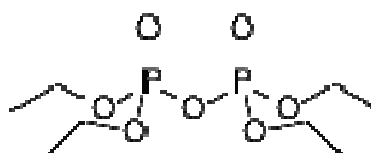


Figura 1 - Estrutura básica dos inseticidas OF

Geralmente, R_1 e R_2 são grupamentos alquils ligados ao átomo de P por um átomo de oxigênio (fosfatos) ou enxofre (fosfortioatos). Os fosforamidatos possuem pelo menos um grupamento amino que pode por sua vez possuir outros substituintes. O primeiro OF utilizado como pesticida comercial foi o Bladan, que tinha como princípio ativo o tetraetilpirofosfato (TEEP) (**Figura 2**). Este foi sintetizado pela primeira vez por De Clemont (DE CLEMONT, 1984).



tetraetilpirofosfato

Figura 2 . Princípio ativo do Bladan

O maior avanço no uso dos inseticidas na agricultura, e também no conhecimento científico sobre esta classe de compostos, deu-se com a síntese do paration por Schrader em 1944. Embora o paration seja extremamente tóxico, tanto para insetos como para mamíferos, vários inseticidas menos tóxicos para mamíferos puderam ser sintetizados com pequenas alterações na estrutura original do paration (**Figura 3**) (NISHIZAWA, 1960).

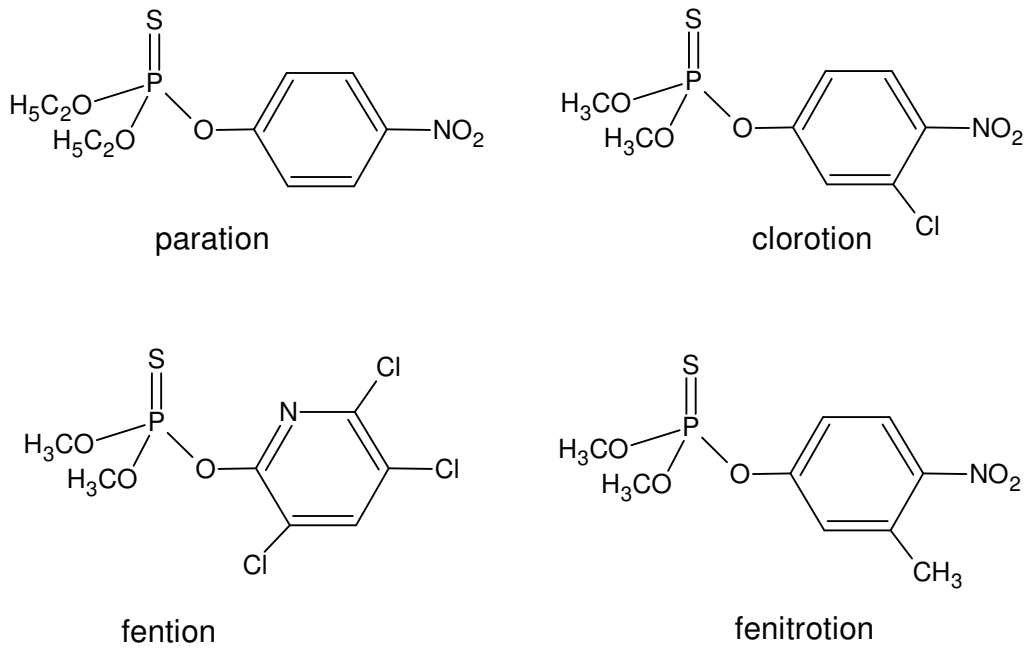


Figura 3 - Inseticidas OF responsáveis pelo avanço no uso de pesticidas em agricultura

Desde então, foram desenvolvidos outros OF importantes com baixa toxidez para mamíferos, como é o caso do malation e do demeton-S (**Figura 4**)

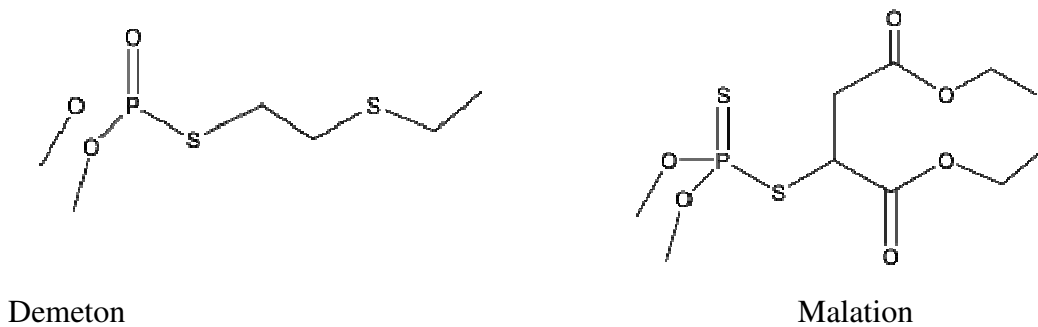
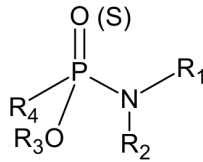


Figura 4 . Organofosforados de baixa toxidez

Schrader (SCHRADER, 1961) observou atividade inseticida em alguns OF da classe dos fosforamidatos de fórmula geral mostrada na **Figura 5**.



R₁, R₂, R₃, R₄ = alquila, arila

Figura 5 . Fórmula Geral de Fosforamidatos

Os fosforamidatos derivados de aminas secundárias e terciárias são geralmente menos ativos como inseticidas do que os derivados de aminas primárias ou de amônia. Alguns exemplos destes OF são mostrados na **Figura 6**.

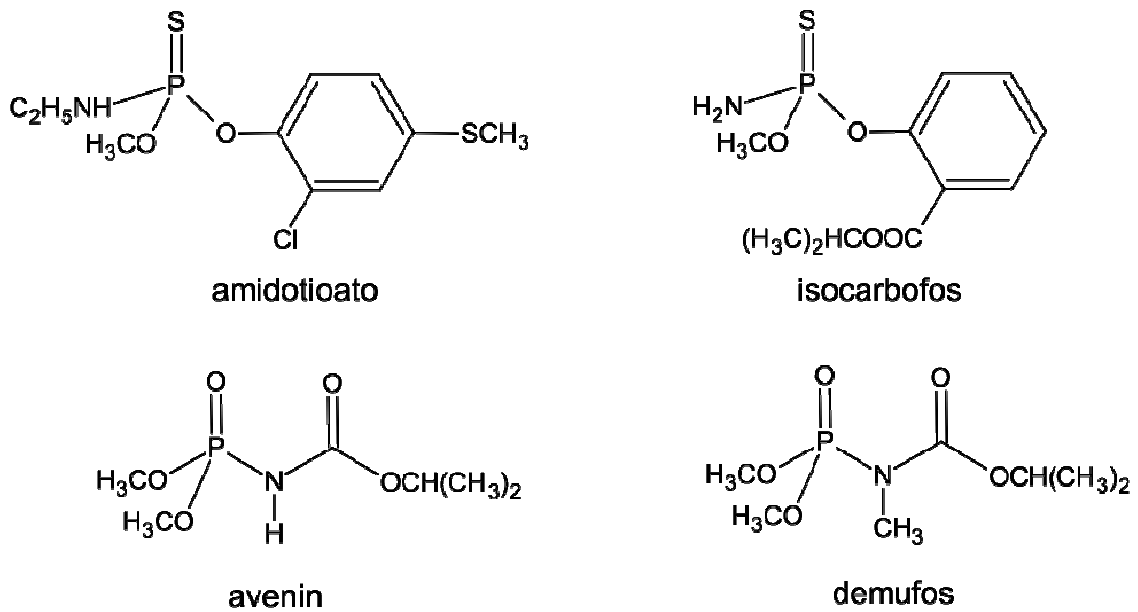


Figura 6 . Inseticidas fosforamidatos

Considerando-se a necessidade de obtenção de inseticidas que fossem cada vez mais fracos inibidores da AChE para mamíferos, novos OF foram desenvolvidos com este propósito e são mostrados na **Figura 7**. (HUDSON *et al.*,1985)

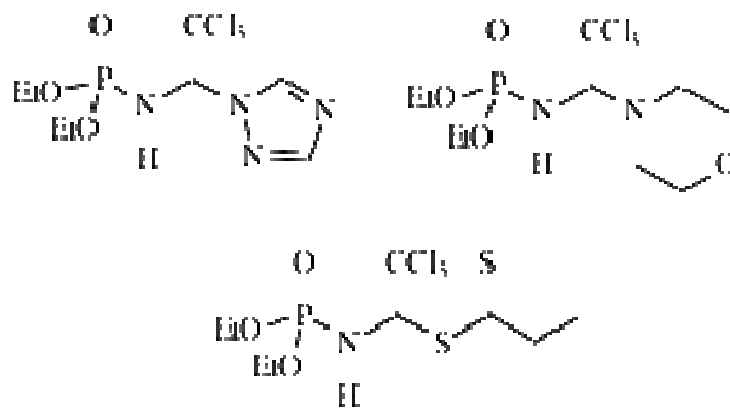


Figura 7 . Inseticidas OF menos tóxicos para mamíferos

Os pesticidas OF são caracterizados pela facilidade de síntese, pela possibilidade de preparação de pró-inseticidas, que sofrem ativação preferencial em insetos e não em mamíferos, e finalmente por sua alta biodegradabilidade, quando comparados a outras classes de pesticidas. Os OF possuem baixa ação residual, baixa estabilidade no meio ambiente e acúmulo limitado em organismos vivos, sendo que 90% dos compostos são eliminados após 48 horas do contato. O risco relativamente baixo dos pesticidas OF para mamíferos é devido à sua seletividade, que é atribuída a diferenças estruturais das moléculas alvos, associadas nos aminoácidos, ativação metabólica preferencial, mecanismos de detoxiação e à sua biodegradabilidade. (CASADA & QUISTAD, 2004)

2.2- Enzimas

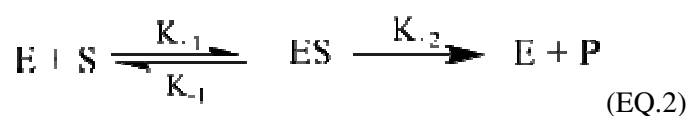
Enzimas são catalizadores biológicos específicos, compostos de uma sequência de aminoácidos. Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por alguma enzima. Com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. Elas aumentam a velocidade da reação por fatores de 10^6 ou mais. Muitas enzimas para serem ativas necessitam de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas pequenas frequentemente derivadas de vitaminas, chamadas de coenzimas (BERG et al., 2002).

A primeira etapa de catalise é a formação de um complexo enzima-substrato que esta representado na **equação 1** (EQ.1). A ligação ocorre em uma região na molécula da enzima chamada sitio ativo ou centro ativo. A interação da enzima com o substrato no sitio ativo promove a formação do estado de transição, diminuindo a energia do estado

de transição e conseqüentemente aumentando a velocidade de reação. Esta interação ocorre por interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, entre outras) onde a estrutura do substrato e complementar ao sitio ativo da enzima. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima (BERG *et al.*, 2002).



Mecanismos de reação detalhados têm sido propostos para muitas enzimas. O estudo da cinética enzimática é uma estratégia importante para a eliciação dos mecanismos de reação. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum, e estas seguem o modelo de Michaelis Menten (MICHAELIS & MENTEN *et al.*, 1913) onde a enzima (E) se combina com o substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES), o que pode prosseguir para formar o produto (P) ou dissociar em enzima (E) e substrato (S) como pode ser observado no **Equação 2**.



A velocidade V_0 de formação do produto é dada pela equação de Michaelis Menten (Eq.3), onde $V_{\text{máx}}$ é a velocidade quando a enzima está saturada de substrato, isto é todas as moléculas de enzimas estão na forma de complexo ES, o K_m é a constante de Michaelis Menten, é a concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima. A medida que aumenta a concentração do substrato a velocidade catalítica da enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima (BERG *et al.*, 2002).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{EQ.3})$$

A equação é caracterizada por um gráfico (**Figura 8**) de V^0 contra $[S]$ chamado de gráfico de Michaelis- Menten, onde é possível obter os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$. (BERG *et al.*, 2002).

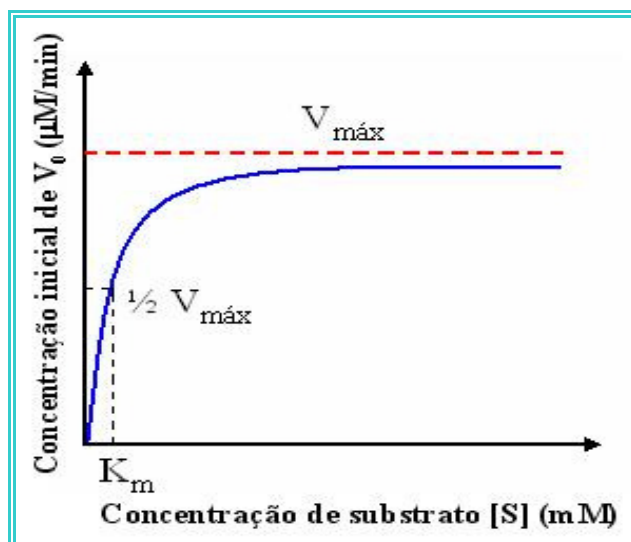


Figura 8. Cinética de Michaelis - Menten

A velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$ é igual ao produto de k_{cat} , pela concentração total da enzima. A concentração cinética k_{cat} , chamada de número de renovação, é o número de moléculas de substrato transformadas em produto por unidade de tempo, em um único centro catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com substrato. Existem enzimas, como as enzimas alostéricas, que não se adaptam à cinética de Michaelis e Menten, pois apresentam múltiplos sítios regulatórios (BERG *et al.*, 2002).

Com o objetivo de obter valores precisos de $V_{\text{máx}}$ e K_m , Lineweaver e Burk inverteram a equação de Michaelis- Menten (Lineweaver & Burk, 1934) , dando origem à equação de Lineweaver-Burk (Eq.4) (BERG *et al.*, 2002):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}} [S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \text{ (EQ. 4)}$$

Através desta equação, pode-se obter um gráfico de $1/V_0$ contra $1/[S]$, chamado de traçado de Lineaweaver e Burk ou duplo recíproco (**Figura 9**), fornecendo uma linha reta, com um intercepto no eixo y que é caracterizado por valores de $1/V_{\text{máx}}$ e uma inclinação de $k_m/V_{\text{máx}}$. O intercepto no eixo x é $-1/k_M$.

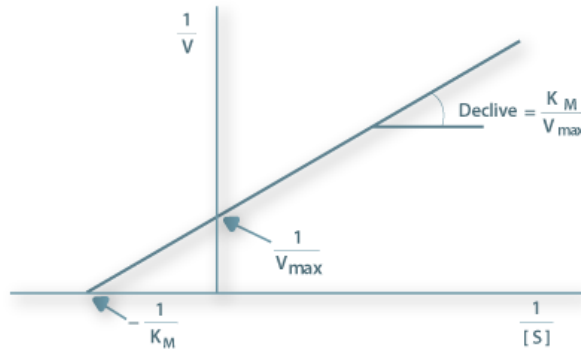


Figura 9. Gráfico de Lineweaver e Burk

2.3. Inibidores Enzimáticos Reversíveis e Irreversíveis

Inibidores enzimáticos têm como característica diminuir a atividade da enzima (LOZANO, 2000; NELSON & COX, 2002). Os processos de inibição enzimática estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica está na formação do complexo enzima-substrato, isto é, na estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002).

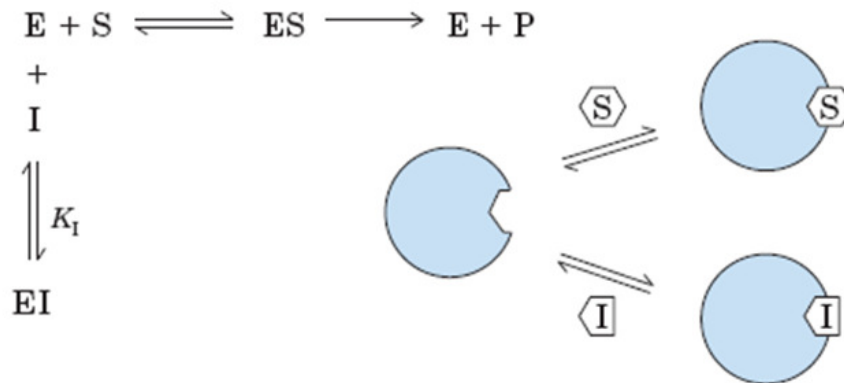
2.3.1. Inibidores Reversíveis

Dentro da classe dos inibidores reversíveis podemos distinguir três tipos de inibição: a inibição reversível competitiva, a não competitiva e a incompetitiva. Todas essas levam à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações da enzima e dos reagentes no meio (inibidor e substrato), permanecendo constante a partir de um determinado tempo. (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002; BERG *et al.*, 2002).

- Inibidores competitivos

Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Estas moléculas apresentam configuração semelhante ao substrato e por isso são capazes de se ligarem ao centro ativo da enzima. Eles produzem um complexo enzima-inibidor (EI) que é semelhante ao complexo enzima-substrato (ES). Como o processo é reversível, a simples adição de uma maior quantidade de substrato pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação do complexo ES, diminuindo a probabilidade de um inibidor se ligar à enzima (CAMPOS, 1999; NELSON E COX,

2002; BERG *et al.*, 2002). O processo de inibição reversível competitiva é descrito no **Esquema 1**.



Esquema 1 Reações envolvidas em uma inibição reversível competitiva.

O valor de K_i no caso de uma inibição reversível competitiva é dado pela **Equação 5**.

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\left(\frac{S}{K_m} + 1\right)} \text{ (EQ.5)}$$

Onde:

K_i = constante de inibição

CI_{50} =concentração de composto que inibe 50% de atividade enzimática

K_m =constante de Michaelis- Menten

S= concentração de substrato.

A **Figura 10** fornece o gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição competitiva, onde as retas interceptam o eixo Y no mesmo ponto (Lineweaver & Burk, 1934)

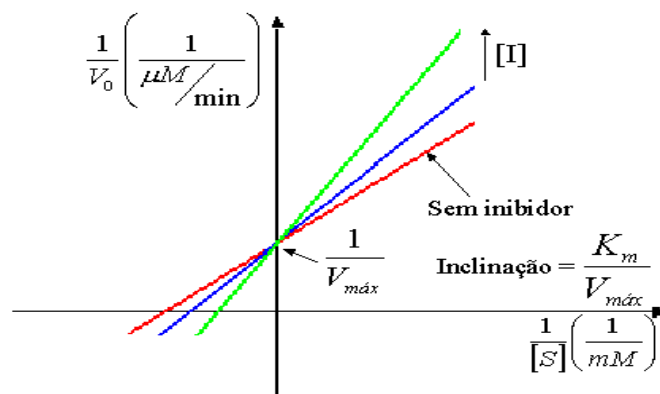
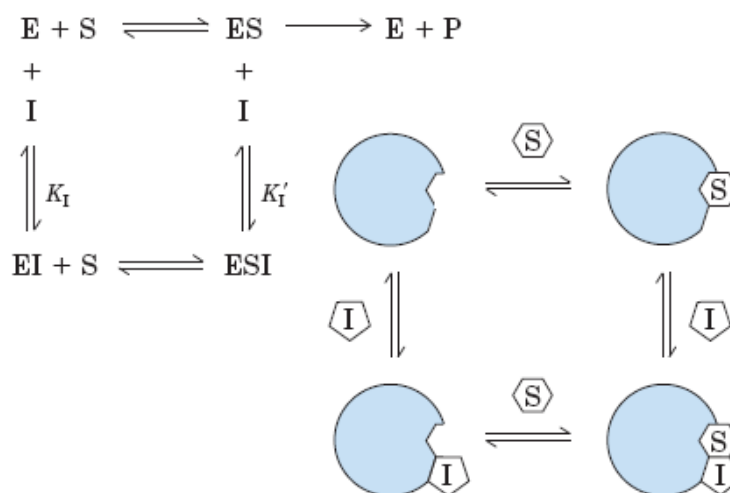


Figura10. Gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição reversível competitiva

- Inibidores não competitivos

Os inibidores não competitivos ligam-se reversivelmente à enzima em um sítio próprio de ligação, que não o sítio ativo, podendo estar ligado ou não ao mesmo tempo que o substrato;

Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002; BERG *et al.*, 2002). O processo de inibição reversível não competitiva é descrito no **Esquema 2**.



Esquema 2. Reações envolvidas em uma inibição reversível não competitiva

A equação que descreve o valor de K_i no caso de uma inibição reversível competitiva é descrita no **Equação 6**.

$$K_i = CI_{50} \text{ (EQ. 6)}$$

Onde:

K_i = constante de inibição

CI_{50} =Concentração de composto que inibi 50% de atividade enzimática

A **Figura 11** representa uma inibição não competitiva segundo o gráfico de Lineweaver-Burk, onde as retas se encontram no mesmo ponto do eixo X, isto é apresentam o valor de K_m não varia e o $V_{máx}$ aumenta (Lineweaver&Burk,1934).

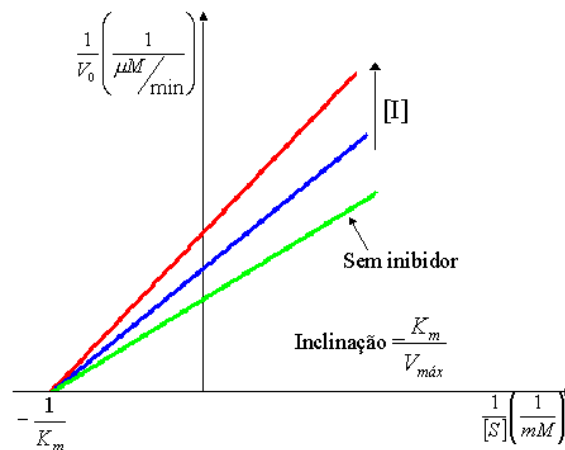
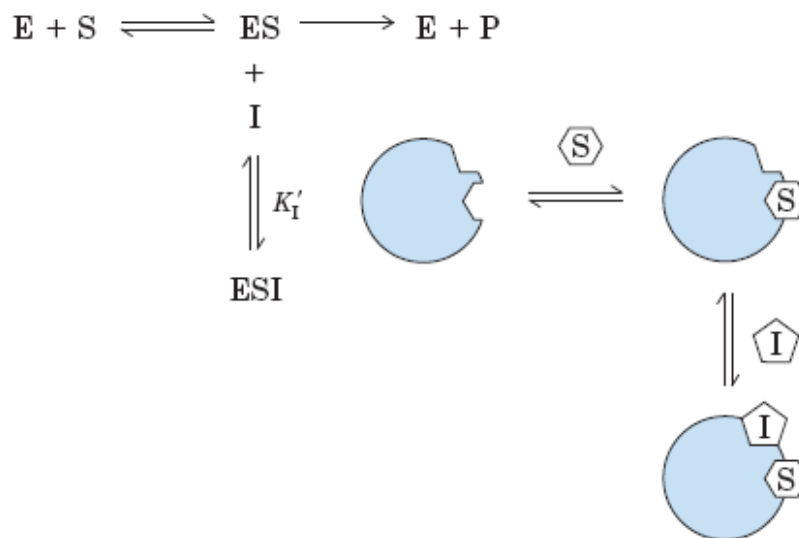


Figura 11. Gráfico de Lineweaver-Burk de inibição reversível não competitiva

- Inibidores incompetitivos

Um inibidor incompetitivo é aquele que se liga somente ao complexo enzima-substrato, isto é tem afinidade somente pelo complexo ES. O **Esquema 3** descreve tal processo.



Esquema 3. Reações envolvidas em uma inibição reversível incompetitiva

A equação que descreve o valor de K_i no caso de uma inibição reversível incompetitiva é descrita na **Equação 7**.

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\left(\frac{K_m}{S} + 1\right)} \text{ (EQ.7)}$$

Onde:

K_i = constante de inibição

CI_{50} =concentração de composto que inibi 50% de atividade enzimática

K_m =constante de Michaelis-Menten

S = concentração de substrato

A **Figura 12** mostra o gráfico de Lineweaver-Burk para uma inibição incompetitiva, onde as retas na ausência e na presença de inibidor são paralelas, isto é o valor de K_m e V_{max} na presença do inibidor diminuem.

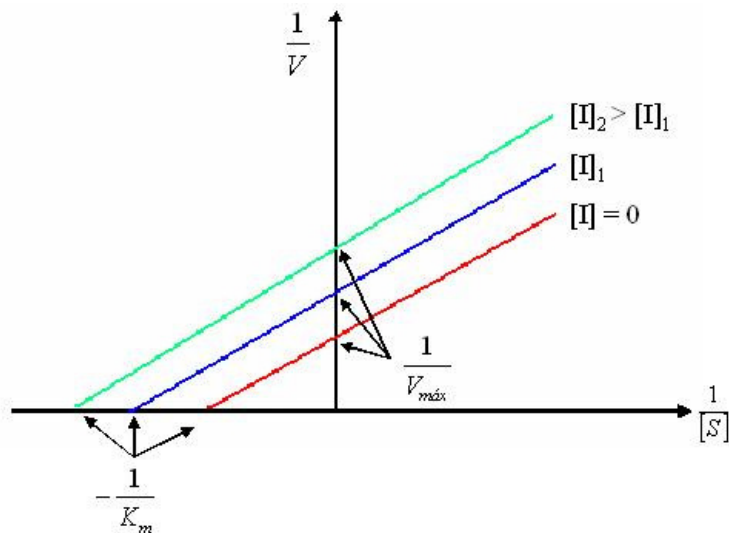
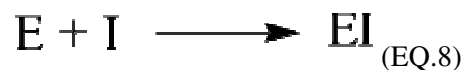


Figura 12. Gráfico de Lineweaver-Burk de inibição reversível incompetitiva

2.3.2- Inibidores irreversíveis.

Neste processo, os inibidores se ligam às enzimas levando à inativação definitiva da mesma, geralmente por formação de ligações covalentes, podendo até promover a destruição de grupos funcionais essenciais para a enzima. A inibição irreversível é progressiva, aumentando com o tempo, até atingir seu máximo. Estes inibidores são muito tóxicos para os organismos pois são capazes de inativar a enzima (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002; BERG *et al.*, 2002). O **Equação 8** representa o processo de modo geral:



2.4. Acetilcolinesterase

Existem dois tipos principais de colinesterase: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), que são estreitamente relacionadas quanto às suas estruturas moleculares, mas que diferem na sua distribuição, especificidade de substrato e funções (RANG *et al.*, 2001). A AChE exibe uma especificidade para a acetilcolina e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular (PATOCKA *et*

al .,2004); já a BChE não é tão específica e catalisa a hidrólise deste neurotransmissor e de outros ésteres (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989)

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Torpedo californica*, que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986; SUSSMAN, 1991) (**Figura 13**). Posteriormente, as seqüências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

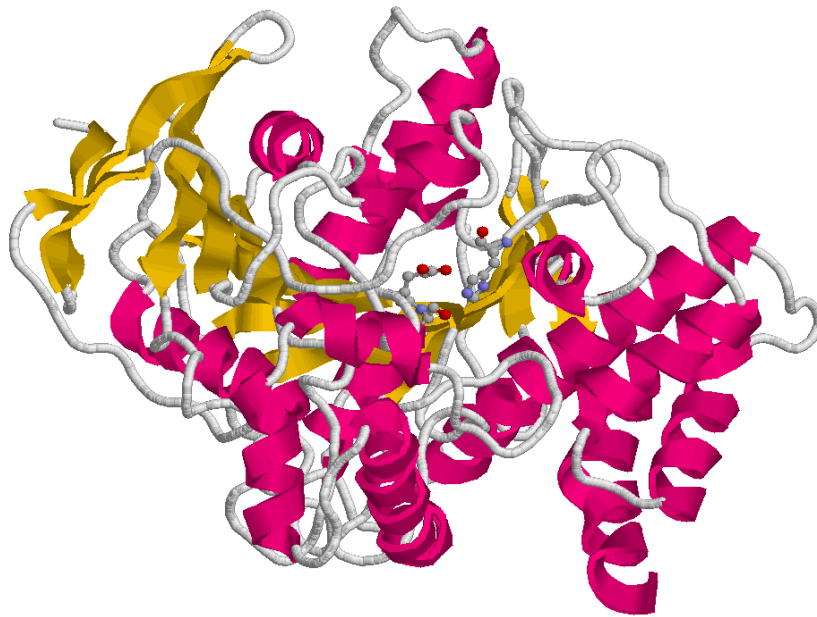


Figura 13. Estrutura tridimensional da acetilcolinaesterase do *Torpedo californica*.

A acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado pela célula transmissora ou pré-sináptica. Ela é armazenada em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas. Isto resulta na entrada de Ca^{2+} , seguida pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. A acetilcolina é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor, a célula pós-sináptica. Aqui, a acetilcolina se liga ao seu receptor, que pode atuar como um canal catiônico. O receptor sofre uma mudança conformacional logo após se ligar à acetilcolina. Esta mudança na estrutura tridimensional resulta em uma entrada de Na^+ , que despolariza a membrana plasmática na célula pós-sináptica. Tem início um potencial de ação. É necessário que a acetilcolina seja removida da fenda sináptica antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal. Isto requer a ação da acetilcolinesterase, que catalisa a hidrólise da acetilcolina. A colina é absorvida pelas

células pré-sinápticas e usada na síntese de mais acetilcolina. O acetato é transportado para outros tecidos e metabolizado (**Figura 14**).

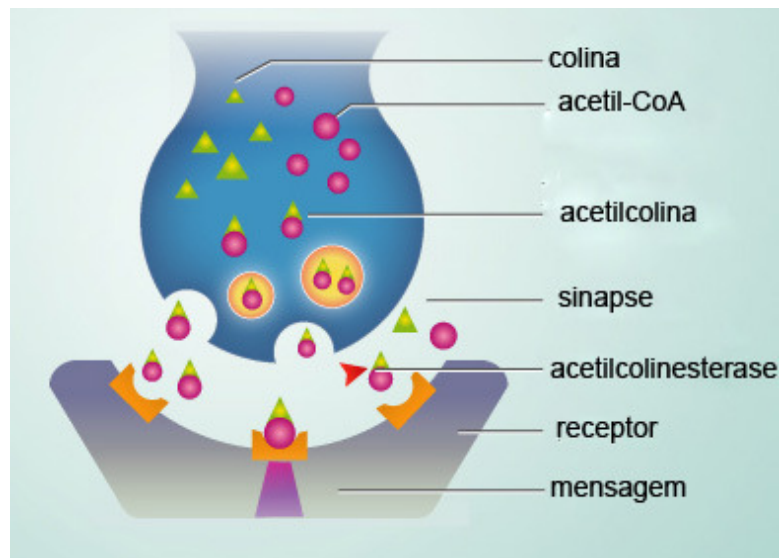
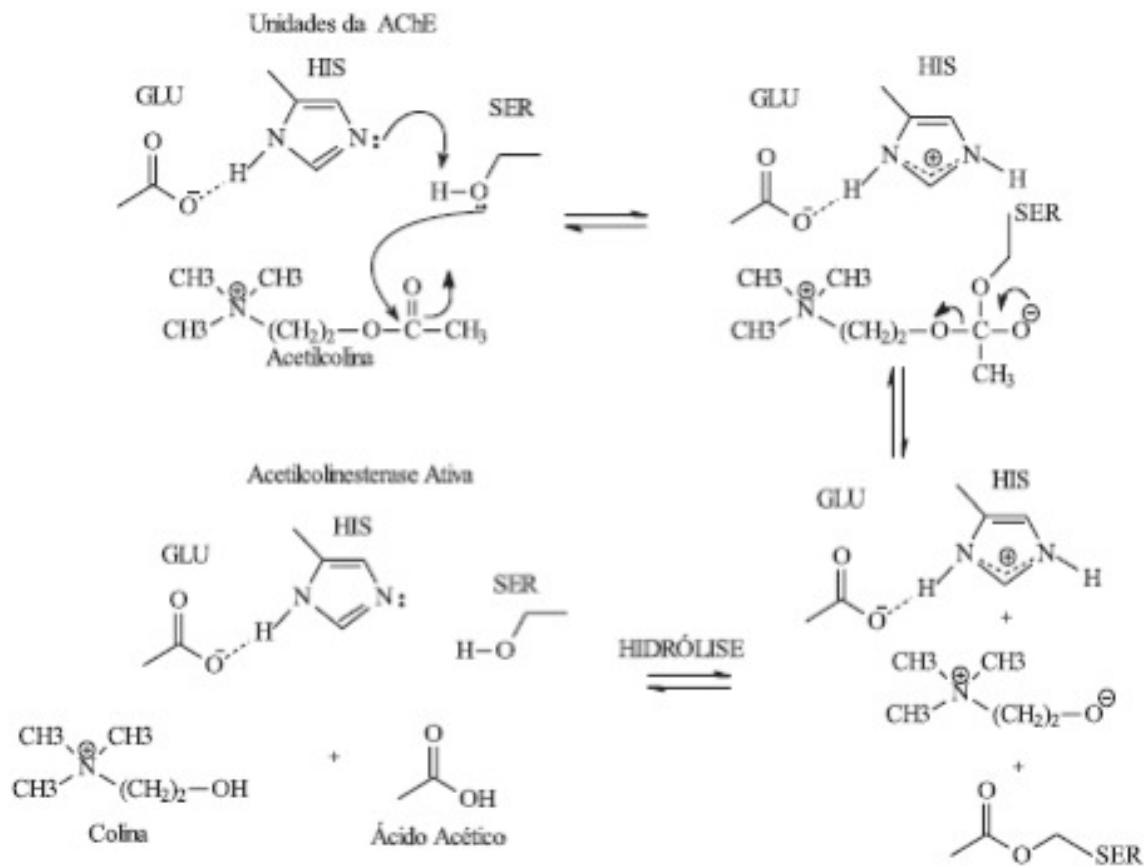


Figura 14. A função da acetilcolina e da acetilcolinesterase na sinapse nervosa
(adaptado de www.dementiaguide.com)



Esquema 4. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE (SANTOS, 2007).

O **Esquema 4** ilustra o mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase que é iniciada pela ligação da acetilcolina ao sítio ativo da acetilcolinesterase. As cadeias laterais de aminoácidos exercem importantes funções na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico. O primeiro passo, em qualquer reação envolvendo catálise enzimática, é a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Isto é facilitado pelas interações entre o substrato e as cadeias laterais amino-acila da enzima. Em geral, estas interações não são covalentes e incluem atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e atrações de van der Waals. Os fragmentos carregados negativamente podem interagir de maneira favorável com os grupos amino, carregados positivamente. No sítio ativo, o fragmento histidina está próximo do fragmento serina e pode estabilizar a conformação do sítio ativo através de ligações de hidrogênio. De fato, a atividade enzimática depende do pH, e tem um valor máximo em um pH consistente com o valor do pK_a de um fragmento histidina. Além dos fragmentos de aminoácidos envolvidos na formação do complexo enzima-substrato,

há aqueles que estão envolvidos mais diretamente na catálise. Pode-se observar que o fragmento serina está localizado no sítio ativo. O seu grupo hidroxila nucleofílico reage com o carbono do grupo acila da acetilcolina. A serina é acetilada e a colina é o grupo de saída.

As enzimas, enquanto catalisadores, precisam ser regeneradas antes que a reação se complete. O fragmento serina acetilado precisa ser hidrolisado antes que a reação se complete, para que a enzima seja capaz de catalisar uma nova reação. A hidrólise do fragmento serina acetilado resulta na formação de acetato. Uma vez que a colina e o acetato tenham deixado o sítio ativo, a enzima é capaz de ligar-se com mais substratos e repetir a reação catalítica.

2.5. Inibidores Reversíveis e Irreversíveis da Acetilcolinaesterase

2.5.1. Inibidores Reversíveis

Os inibidores reversíveis da AChE podem ser utilizados atualmente no tratamento do mal de Alzheimer gerando um aumento nas concentrações da acetilcolina no córtex cerebral; ao mesmo tempo, evitando a degradação da acetilcolina liberada pelos neurônios colinérgicos ainda não danificados pelo processo degenerativo, que continuam funcionando.

O mal de Alzheimer ou doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima dos 65 anos (JUNOR *et al.*, 2004). Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população de idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo.

No mundo todo, o mal de Alzheimer é considerado um grande problema de saúde, devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, famílias, sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que metade dos pacientes são internados em instituições de saúde. O restante recebe tratamento em casa, envolvendo em seu cuidado familiares, parentes e amigos. Invariavelmente, o acompanhamento do paciente traz um enorme estresse emocional, psicológico e financeiro às famílias, uma vez que o tratamento é caro e o paciente perde gradualmente suas funções motoras e de aprendizado, passando a não reconhecer os familiares mais próximos (ZIMMERMAN & SOREQ, 2006; FRANCIS *et al.*, 1999).

O mercado brasileiro dispõe de três medicamentos, licenciados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com essas características: tacrina, donepezil e galantamina (**Figura 15**). (MINETT & BERTOLUCCI, 2000)

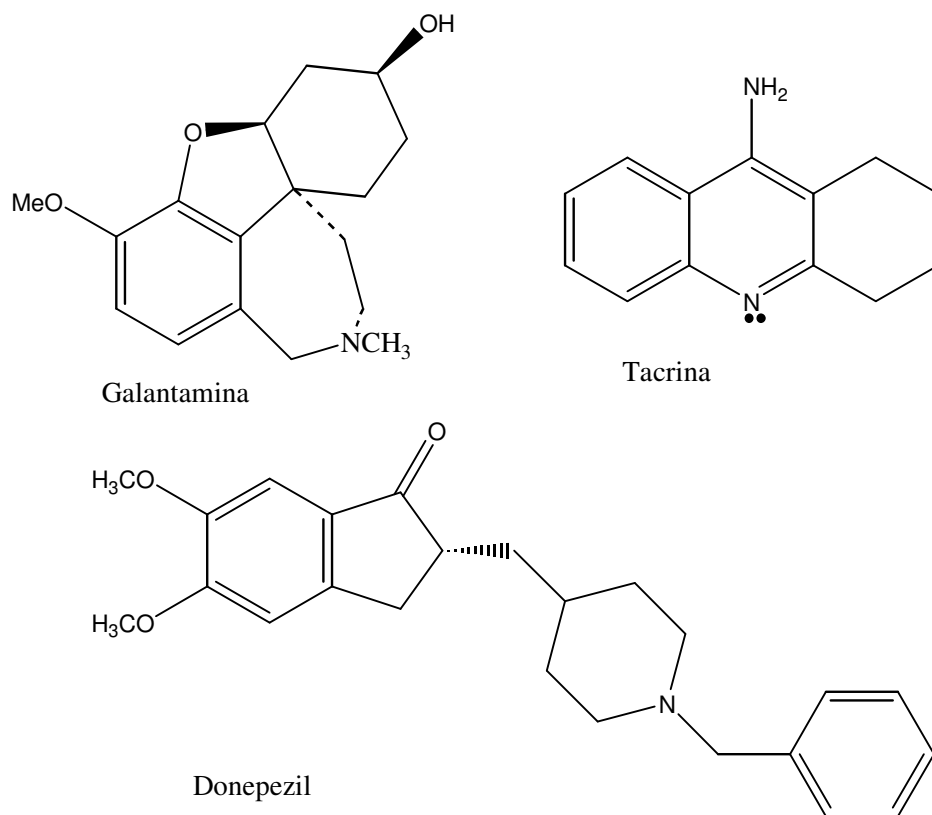


Figura 15. Alguns inibidores reversíveis da AChE

A fisostigmina, apesar de ser um inibidor reversível, não foi incluída na lista aprovada pela ANVISA para o tratamento da DA, pois seu emprego foi limitado pela meia-vida curta, de aproximadamente 30 minutos, necessitando de administrações frequentes, e pela alta incidência de efeitos colinérgicos colaterais tais como: náusea, vômito, cólica abdominal, suor e fasciculações (PETERS & LEVIN, 1979).

A tacrina, cujo nome químico é 1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina, é comercializada pelo nome de Cognex®. Foi sintetizada pela primeira vez por Adrien Albert na Universidade de Sydney. Em 1986 iniciou-se o estudo do potencial farmacológico da tacrina no tratamento da DA, por Summers e colaboradores (SUMMERS *et al.*, 1986). Esse fármaco foi aprovado nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1993 e pela ANVISA em 1994. Contudo, os efeitos colaterais mais frequentemente observados com o uso de tacrina são náuseas/vômitos (28%) e diarreia (16%) (DAVIS & POWCHIK, 1995), embora a complicação mais temida seja a

elevação das transaminases hepáticas (hepatite medicamentosa), observada em 30% a 50% dos casos (QIZILBASH *et al.*, 1998; ROGERS & FRIEGHOFF, 1996).

O donepezil foi o segunda medicamento a ser aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000 para o tratamento de DA pois assim como a tacrina é um inibidor reversível da AChE. Vários estudos provaram sua eficácia terapêutica (ROGERS *et al.*, 1998; ROGERS *et al.*, 1998). Apresenta algumas vantagens em relação à tacrina. Sua meia-vida é longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo dose única diária. Não é hepatotóxica, sendo desnecessária a monitoração laboratorial.

A galantamina é o fármaco mais recente desse grupo, aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001. A galantamina apresenta adicionalmente ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos (ligante potenciador alostérico). Embora não esteja estabelecido com clareza o significado clínico dessa modulação, existe relação entre cognição e receptores nicotínicos. Tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrada em duas doses diárias. (LEVIN & SIMON, 1998; CACABELOS *et al.*, 1999; CARAMELLI *et al.*, 2004).

Vários artigos recentes descrevem compostos organofosforados como inibidores reversíveis (PANGY *et al.*, 2003; ELHANANY *et al.*, 2001; BARAK *et al.*, 2000; SCHULZE *et al.*, 2003; PACI *et al.*, 2001, MORALEV & ROZENGART, 2008; MORALEV & ROZENGART, 2007) e a **Figura 16** mostra dois organofosforados que apresentam uma inibição reversível (GHOLIVAND *et al.*, 2006).

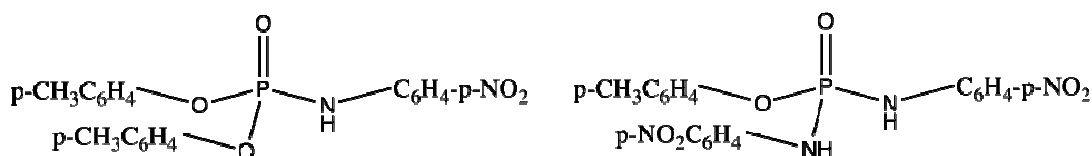


Figura 16 – Fosforamidatos inibidores reversíveis de AChE

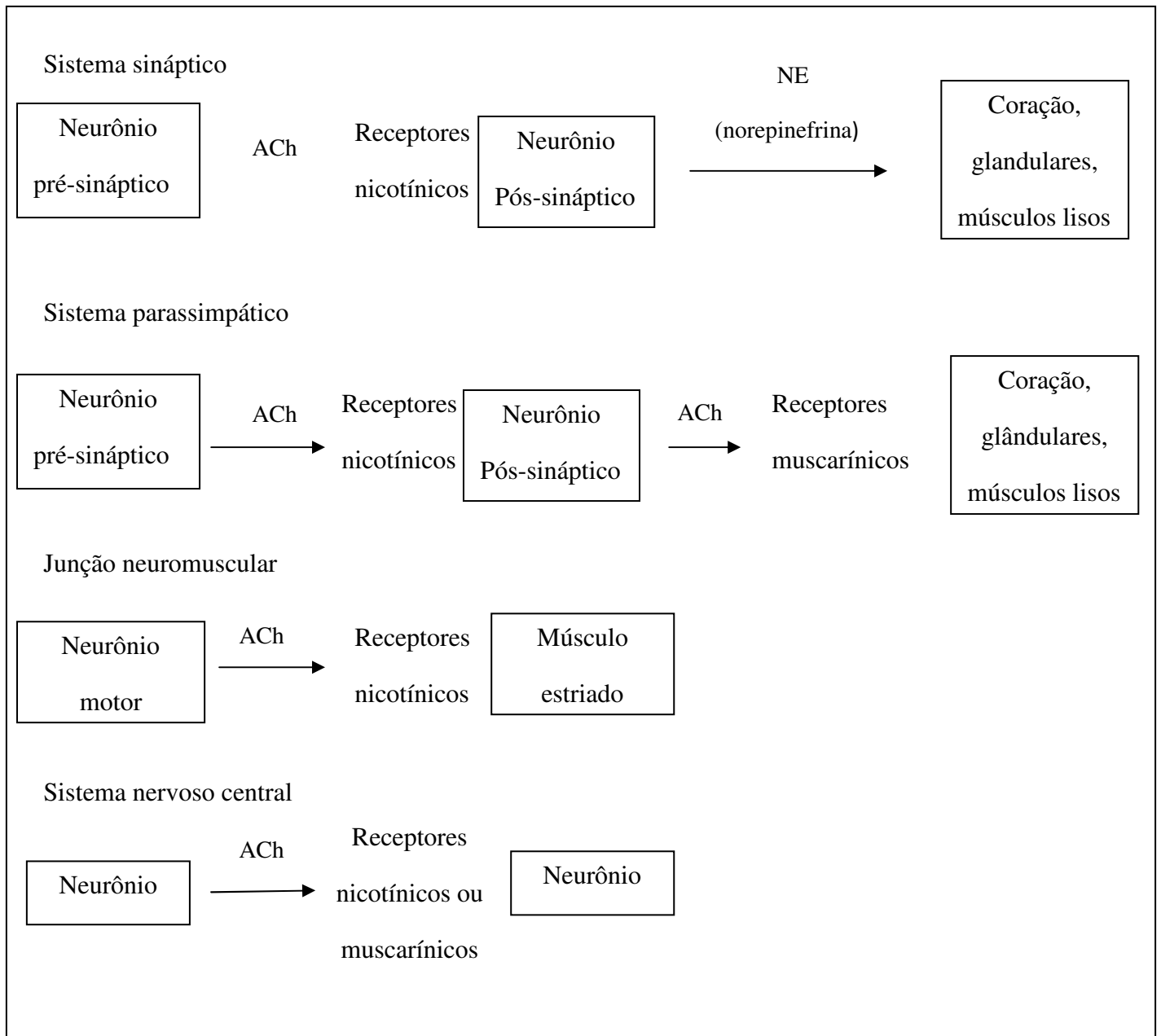
2.5.2. Inibidores irreversíveis

Muitos organofosforados da classe dos fosforamidatos inibem a acetilcolinesterase humana por fosforilação do grupo hidroxila da serina que ativa a acetilcolina nas sinapses colinérgicas de ambos os sistemas nervosos central e periférico (PANGY *et al.*, 2003; ELHANANY *et al.*, 2001). Durante a inibição, a enzima fosforilada sofre um processo pós-inibitório e esta reação é espontânea e muito lenta

(ORDENTLICH *et al.*, 1993). Muitos artigos mostram os fosforamidatos como inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (ELHANANY *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2000; ORDENTLICH *et al.*, 1993; MALLENDER *et al.*, 2000; LOSSITER *et al.*, 2003; HAUX *et al.*, 2002; KAPLAN *et al.*, 2001; HAUX *et al.*, 2000).

Os OFs inibem a enzima AChE, responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh nas fibras colinérgicas do sistema nervoso (CASTRO, 2002). As fibras colinérgicas são responsáveis pela estimulação de vários órgãos do corpo e dos músculos voluntários, ocorrendo no sistema nervoso central e nos sistemas periféricos simpático e parassimpático. Neste tipo de fibra nervosa, a AChE é responsável pela transmissão do impulso nervoso, através da sinapse, até receptores específicos, que podem ser de dois tipos, nicotínicos e muscarínicos (**Esquema 5**). A terminação do impulso nervoso ocorre através da hidrólise da ACh, realizada pela AChE. Desta forma, a inibição da AChE resulta de acúmulo de ACh em todos os sítios de transmissão colinérgica, com consequente superestimulação das estruturas enervadas por aquelas fibras (CASTRO, 2002).

Os efeitos da acumulação da ACh (síndrome colinérgica) podem ser divididos em três tipos: centrais, muscarínicos e nicotínicos. A seqüência dos aparecimentos dos sintomas depende da rota de intoxicação e da quantidade de agente absorvido. Em intoxicações fatais, a morte ocorre por parada respiratória de origem central (depressão do centro respiratório) ou periférica (paralisia dos músculos respiratórios) (CASTRO, 2002).



Esquema 5. Sítios de ação da ACh no sistema nervoso e seus receptores (STINE, 1996)

2.6. Principais Aspectos da Inibição da AChE pelos Organofosforados

A inibição da enzima leva a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses. O grupamento de saída (X) (**Figura 17**) é liberado quando o OF é hidrolisado pela AChE, num mecanismo que envolve um resíduo de serina e um de histidina (Ser200 e His440 na AChE de *Torpedo californica*) presentes no sítio ativo no fim de um canal estreito. A Ser200 é fosforilada após a saída do grupamento X.

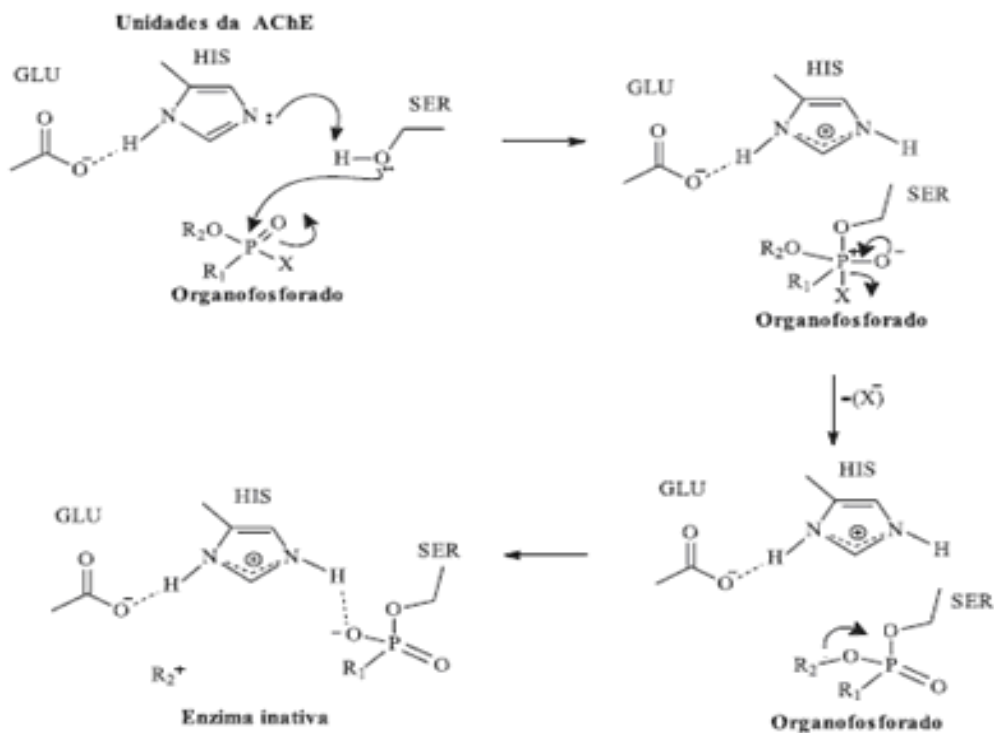


Figura 17. Inibição da AChE

O mecanismo de hidrólise catalisado pela AChE depende da adição de um resíduo de serina à carbonila da acetilcolina. Ao contrário da enzima acetilada, a enzima fosforilada (**Figura 17**) reage lentamente com a água, o que permite a dealquilação do substituinte alcóxila ligado ao átomo de P, num processo conhecido como envelhecimento da enzima. O resultado é o surgimento de uma forte ligação entre o resíduo de histidina protonada, no sítio catalítico e o átomo de oxigênio do inibidor. Esta histidina protonada não pode portanto funcionar como catalisador básico geral para a reativação da AChE. A espectroscopia de RMN de ^{31}P mostra claramente a formação de uma ligação P-O⁻ no sítio ativo de adutos OF-AchE (QIAN & KOACH, 1993). A interação entre a acetilcolinesterase e o OF inibidor parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, sendo que esta estabilidade é relacionada principalmente com a estrutura do OF. Na grande maioria dos casos, a inibição é irreversível, porém há casos em que a inibição é reversível (QIAN & KOACH, 1993).

A reação de inibição da AChE por OFs apresenta três diferenças principais em relação à hidrólise da AChE (BENCURA, 1995):

- Menor influência do grupo de saída X dos OFs em relação à colina;
- Maior estabilidade de estrutura fosforilada em relação à estrutura acetilada;
- A barreira de energia para a desfosforilação se aproxima do valor para a reação não enzimática, enquanto que para a desacetilação esta diferença é bastante significativa.

2.7. Dengue

2.7.1. *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* transmite a febre amarela, a dengue, e a dengue hemorrágica em muitos países tropicais. A incidência da dengue e da dengue hemorrágica continuam aumentando e uma vacina para o combate ainda não foi desenvolvida, deixando o controle desta baseado apenas no controle do vetor.

O controle do *Aedes aegypti* é empreendido com a participação da comunidade na eliminação de locais com água parada que são responsáveis pela proliferação do mosquito; entretanto a ação comunitária sozinha não é suficiente, levando assim a utilização de inseticidas cada vez mais potente para a eliminação do mosquito *Aedes aegypti* (FAKOORZIBA *et al.*, 2009; ORSHAN *et al.*, 2005; POURPARDINA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2008).

O primeiro registro do mosquito *Aedes aegypti* ocorreu em 1985 no oeste paulista, iniciando assim medidas de controle químico e mecânico. Iniciou-se o controle larvário com temefos (AIUB *et al.*, 2002) e controle adulticida de ação residual, também com ação larvicida, por meio de fenitrothion, ambos organofosforados. O malation foi utilizado em pequena quantidade em substituição ao fenitrothion, nos anos de 1987 a 1993, em períodos de falta deste último no mercado. As nebulizações térmicas e atérmicas foram utilizadas desde 1985, sendo vários os inseticidas empregados, destacando-se: propoxur (1986 a 1989), malathion (1985 a 1992) e cipermetrina (1989 até o momento), os quais pertencem respectivamente ao grupo dos carbamatos, organofosforados e piretróides (MACORIS *et al.*, 1999).

O controle do mosquito *Aedes aegypti* obteve um avanço importante com o surgimento de medidas alternativas, proporcionadas por campanhas realizadas com o objetivo de conscientização da população que passou, por exemplo, a não deixar água parada, porém os inseticidas ainda se mantêm como parte vital no controle destes

insetos. Dessa forma, diversos casos de resistência têm sido registrados no Brasil, para populações de *Aedes aegypti* (ANDRADE & MODOLO, 1991; MACORIS *et al.*, 1995; MACORIS *et al.*, 1999). Além da detecção de resistência para a formulação das estratégias de controle, também é fundamental o conhecimento dos seus mecanismos, o que torna cada vez mais importante a síntese de novos inseticidas cada vez mais resistentes ao mosquito *Aedes aegypti*. Devido ao uso no passado, por exemplo, de DDT ou de inseticidas agrícolas clorados, a resistência cruzada pode reduzir a eficácia de piretróides, mesmo antes de sua introdução no combate a um vetor (FAKOORZIBA *et al.*, 2009; ORSHAN *et al.*, 2005).

No Brasil, a partir do fórum Estadual do Rio de Janeiro (setembro/2000), o controle do *Aedes aegypti* passou a ser feito com *Bacillus thuringiensis var. israelensis* e metoprene, devido à detecção de resistência a temephos no Rio de Janeiro. Há vários registros para de resistência de *Aedes. aegypti* a organofosforados em pelo menos oito municípios do Estado de São Paulo (ANDRADE & MODOLO, 1991; MACORIS *et al.*, 1999) e em Goiás. (MACORIS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1997; CAMPOS & ANDRADE, 2001; REY *et al.*, 2001).

A dengue transformou-se em um problema de saúde público crescente no Brasil, na incidência e na severidade. Nas últimas duas décadas o número de casos da dengue aumentou muito : 46.000 foram notificados 1986 no estouro da epidemia, e 790.000 em 2002. A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou em 2008, 230.829 casos suspeitos de dengue, 1.069 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), sendo desta forma considerada uma doença negligenciada, levando a FAPERJ a criar um edital exclusivo para este tipo de doença.(<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>). A dengue é considerada um doença endêmica no país, e aproximadamente 120.000-350.000 povos são afetados cada ano.(SILVA *et al.*, 2002; <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>) além, diversos relatórios apontam ao risco de reurbanização da febre amarela na cidade (MONDET *et al.*, 1996; MASSAD *et al.*,2001) ambas as situações são correlacionadas com a presença e os níveis elevados da infestação de mosquitos do *Aedes aegypti*.(TEIXEIRA *et al.*, 1999; HONÓRIO *et al.*, 2006)

A **Figura 18** mostra os 12 compostos fosforamidatos sintetizados no laboratório de química orgânica da UFRRJ (GONÇALVES, 2009) com os quais foi feito um estudo da atividade anticolinesterásica, usando o acefato e a fisostigmina como controles.

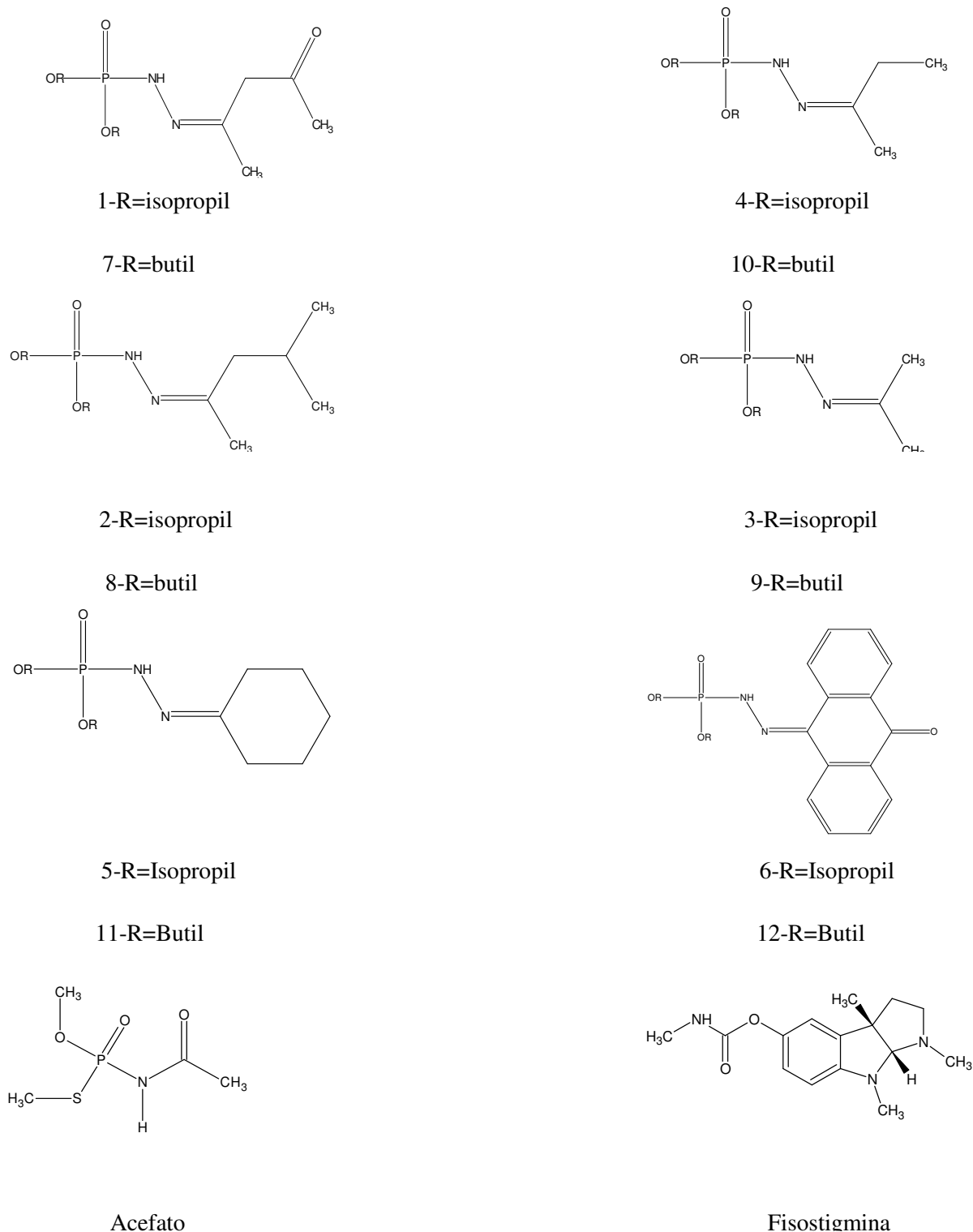


Figura 18 – Fosforamidatos estudados

3. OBJETIVOS

- 1- Realizar uma avaliação com alguns dos compostos OF sintetizados até o momento, a fim de determinar quais interagem com a AChE e em que grau a inibem.
- 2- Investigar a cinética enzimática dos OF que interagem com a AChE, utilizando o método de Ellman.
- 3- Avaliar a atividade larvicida dos compostos organofosforados frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4. 1 - Materiais e métodos

4. 1. a) Equipamento

A atividade da AChE e a cinética enzimática foram determinadas usando leitora de microplaca de 96 poços Bio-Rad 3550 UV, baseando-se numa modificação do método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961)

4. 1. b) Solventes e reagentes utilizados

Os reagentes e solventes listados abaixo foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

-Tris-HCl marca Amresco

-Ácido 5,5'- ditiobis[2-nitrobenzóico] marca Sigma Aldrich

-Iodeto de acetiltiocolina marca Sigma Aldrich

-Acetilcolinesterase marca Sigma Aldrich de *Electrophorus electricus* tipo VI-S

-Albumina bovina sérica marca Sigma Aldrich

-Fisostigmina da marca Sigma Aldrich

-Água deuterada da marca cambridge isotope laboratories.

-Água destilada.

-Metanol marca Merck

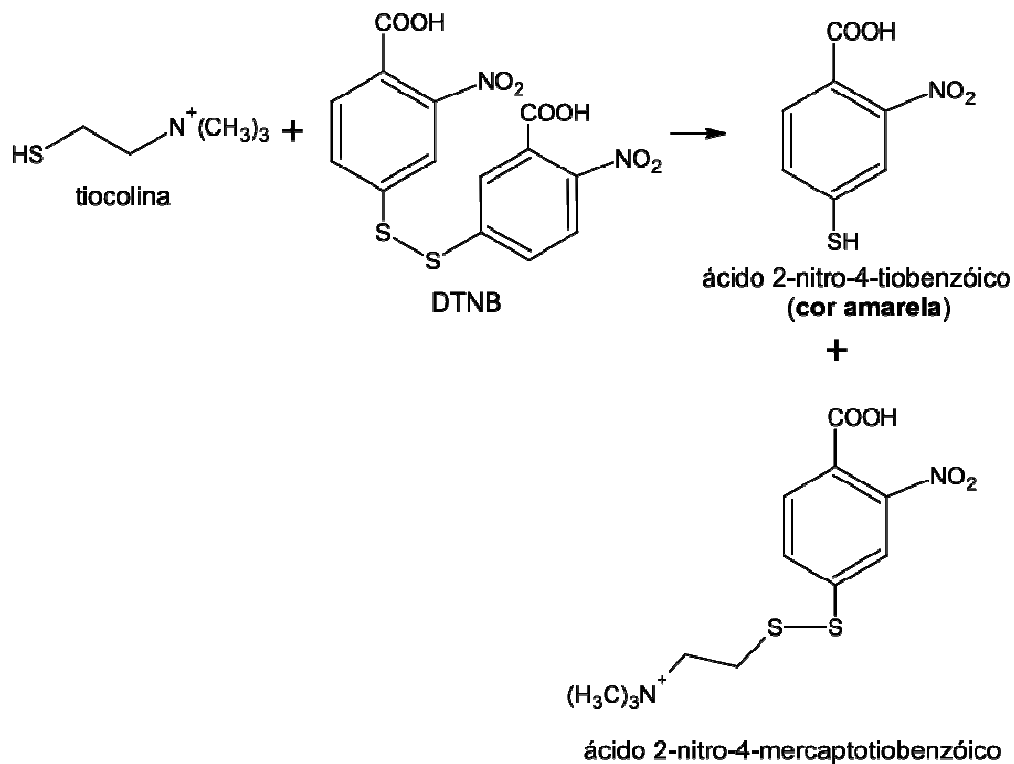
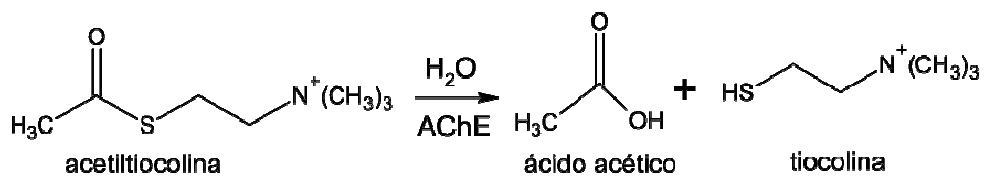
4.2 Ensaio Químico-biológicos

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica utilizando o método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e o posterior estudo cinético, foram realizados em placas de 96 poços, em triplicata na ausência e na presença de compostos organofosforados em diferentes concentrações. A densidade óptica foi medida utilizando leitor de microplaca de 96 poços Bio-Rad 3550, em comprimento de onda de 405 nm. Foram realizados no mínimo 3 ensaios independentes, para desta forma ser calculado o desvio padrão.

4.2.1. Avaliação da atividade anticolinesterásica.

As seguintes soluções foram preparadas: (1) 50mM Tris/HCl pH 8; (2) 50mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA); (3) 0,5mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoíco](DTNB ou reagente de Ellman), (4) 2,5mM de iodeto de acetiltiocolina(ACTI); (5) 0.22U/mL da enzima acetilcolinesterase.

Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados: 25µl de iodeto de acetilcolina dissolvidos no tampão(2); 125µl de DTNB dissolvidos no tampão(2); 50µl de tampão (2); 25µl de fosforamido dissolvido em metanol; 25µl de enzima(0,22U/mL) dissolvida em tampão(1) e foi então medida a absorvância ($\lambda = 405$ nm) a cada 13 segundos por 3 vezes, sendo a fisostigmina e o acefato usados como controles positivos. Como está descrito no Esquema 6 abaixo, a enzima hidrolisa a acetiltiocolina resultando em tiocolina que reage com o reagente de Ellman (DTNB) produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato. As velocidades de reação foram então calculadas utilizando-se o programa de computador Microplate Manager (Bio-Rad).



Esquema 6. Reações envolvidas no método de Ellman

A **Tabela 1** mostra os valores de absorvâncias e concentrações para o composto **5** como exemplo da metodologia de cálculo utilizada para avaliação da atividade anticolinesterásica.

Tabela 1: Valores de absorvâncias e concentrações para o composto **5** para a avaliação da atividade anticolinesterásica.

Concentração do composto 5 (μM)	Absorvâncias			Média
	1°	2°	3°	
	Amostra	+	Enzima	
500	0,162	0,149	0,154	0,155
250	0,453	0,461	0,451	0,455
125	0,634	0,631	0,619	0,628
75	0,697	0,699	0,681	0,692
	Amostra	+	Branco	
500	0,072	0,069	0,07	0,0703
250	0,064	0,061	0,06	0,0616
125	0,055	0,0523	0,056	0,0544
75	0,049	0,048	0,045	0,0473
	Controle			
	0,75	0,68	0,723	0,717

A equação a seguir foi utilizada para cálculo de percentual de inibição:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(A_a - A_b) \times 100}{A_c}$$

Onde:

A_a = absorvância da media da amostra ao reagir com a acetilcolinesterase

A_b = absorvância da media da amostra pura

A_c = absorvância do controle (ausência de inibidor, 100% da atividade enzimática)

Como exemplo, abaixo é dado o procedimento para o cálculo do percentual de inibição para o composto **5** na concentração de 500 μM , sendo que as absorvâncias obtidas neste ensaio estão ilustradas na **Tabela 1**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{100 - (0,155 - 0,0703) \times 100}{0,717} = 88,18\%$$

A partir da porcentagem de inibição calculada para no mínimo três concentrações diferentes foi possível confeccionar os gráficos (concentração x porcentagem de inibição), e utilizando o modelo matemático de regressão linear foram calculados os valores de CI_{50} (concentração efetiva que inibe 50 % da atividade enzimática) conforme ilustrado na **Figura 19** para o composto **5**.

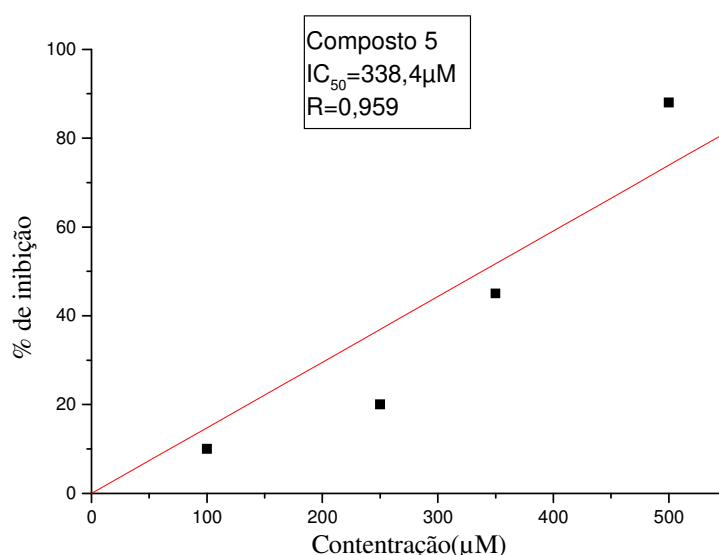


Figura 19- Exemplo de cálculo do valor de CI_{50} (μM) para o composto 5

4.2.2. Cinética enzimática

A cinética de interação dos OF com a acetilcolinesterase foi determinada através de gráficos de Lineweaver e Burk (Lineweaver & Burk, 1934), onde o eixo das abcissas representa o inverso da concentração de acetiltiocolina ($1/S$) e o eixo das ordenadas representa o inverso da atividade enzimática ($1/V_0$). Nas 96 cavidades da placa foram adicionados: 25 μl iodeto de acetiltiocolina (0,04mM - 2,4mM) dissolvido em tampão(2), 125 μl DTNB (0,5mM) dissolvido em tampão (2), 50 μl de tampão (2), 25 μl

do OF testado dissolvido em metanol, 25 µl de AChE (0,022u/ml) dissolvida em tampão (1). A absorvância é medida ($\lambda = 405$ nm) a cada 13 segundos por 3 vezes para desta forma calcular a formação de ácido 2-nitro-4-tiobenzóico. As concentrações de iodeto de acetiltiocolina variaram de 0.04 mM a 2,4 mM na ausência e na presença do composto **10** (13µM e 18µM), composto **5** (250µM e 350µM), composto **3** (350µM e 500µM), composto **9** (250µM e 350µM) e composto **7**(250 µM e 100 µM) (CORREIA *et al.*, 2006). Obtiveram-se os valores de K_m (MICHAELIS & MENTEN, 1913), através do gráfico de $1/V_0$ contra $1/[S]$. Tendo caracterizado a natureza de inibição e de posse dos valores de CI_{50} foram calculados os valores de K_i . No caso de inibição incompetitiva e não competitiva os valor de K_i são calculados, respectivamente, segundo as equações 9 e 10 respectivamente(CHENG & PRUSSOF, 1973).

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\left(\frac{K_m}{S} + 1\right)} \text{ (EQ.9)}$$

$$K_i = CI_{50} \text{ (EQ.10)}$$

A inibição irreversível não possui valor de K_i . A metodologia para investigar a cinética é a mesma já mostrada para calcular o percentual de inibição, sendo que a diferença é que no estudo cinético varia-se a concentração do substrato para uma mesma concentração de inibidor e isto é feito com pelo menos duas concentrações diferentes de inibidor.

A **Tabela 2** mostra os Valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ para o composto **5** como exemplo da metodologia de cálculo utilizado para avaliação da cinética enzimática.

Tabela 2 : Valores de $1/v^{\circ}$ e $1/[S]$ para o composto **5** como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática.

$1/[S]$	$1/v^{\circ}(\text{Branco})\pm dp^*$	$1/v^{\circ}(250\mu\text{M})\pm dp^*$	$1/v^{\circ}(350\mu\text{M})\pm dp^*$
25	$2,88\pm 0,12$	$4,54\pm 0,17$	$8,37\pm 0,10$
20	$2,47\pm 0,23$	$4,13\pm 0,21$	$7,25\pm 0,26$
11,76	$2,1\pm 0,09$	$3,21\pm 0,35$	$5,36\pm 0,30$
10	$1,79\pm 0,30$	$2,94\pm 0,27$	$5,3\pm 0,17$
6,66	$1,46\pm 0,34$	$2,62\pm 0,32$	$4,09\pm 0,28$
5,64	$1,34\pm 0,089$	$2,31\pm 0,24$	$3,98\pm 0,35$
5	$1,33\pm 0,26$	$2,06\pm 0,13$	$4,11\pm 0,10$
4,54	$1,32\pm 0,14$	$2,04\pm 0,21$	$3,8\pm 0,30$
4,16	$1,31\pm 0,19$	$2,03\pm 0,33$	$3,77\pm 0,20$
4	$1,3\pm 0,28$	$2,01\pm 0,30$	$3,71\pm 0,16$

dp*desvio padrão

A partir dos valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ mostrados na tabela foi possível confeccionar um gráfico relativo à cinética enzimática para duas concentrações diferentes de inibidor, conforme ilustrado na **Figura 20**.

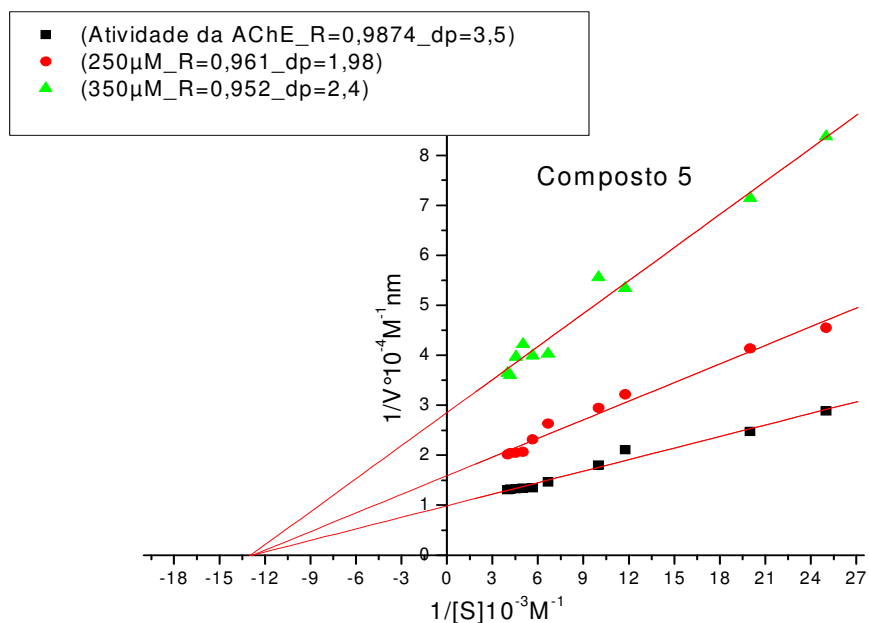


Figura 20. Cálculo de cinética enzimática para o composto **5**

4.2.3) Ensaios de atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*

Uma vez que os compostos estudados neste trabalho pertencem à classe dos organofosforados, que possuem diversas aplicações como pesticidas, resolveu-se realizar um estudo preliminar da atividade tóxica dos fosforamidatos estudados deste trabalho através do bioensaio frente à larva do *Aedes aegypti*.

Os testes com os OF foram realizados nas concentrações de 1,25 mM, 1,062 mM, 0,812 mM, 0,567 mM e 0,312 mM. As amostras foram dissolvidas em 0,3 mL de metanol, completando-se o volume com água e foram utilizadas 15 larvas do mosquito no 3º estágio como pode ser observado na **Figura 21**, até a obtenção de 20 mL. Após 24h e 48h as larvas mortas foram contadas. Realizaram-se os ensaios em duplicatas e em diferentes concentrações para posterior cálculo de DL₅₀ (concentração da amostra capaz de matar 50% da população de larvas). O metanol foi utilizado como controle na mesma concentração utilizada para dissolução da amostra.



Figura 21. Recipiente plástico para teste de atividade larvicida.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os organofosforados são utilizados como inseticidas desde 1944 com a síntese do paration, porém sua atividade está sendo diminuída pela resistência de pragas a estes (ORSHAN *et al.*, 2005; POURPARDINA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2008), o que torna cada vez mais necessário a síntese de novos organofosforados e um estudo mais detalhado sobre seu mecanismo de ação, levando-nos assim a realizar um estudo mais detalhado com esta classe de compostos.

Como já foi mencionado, no tópico de Material e Métodos, os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em placas de 96 poços em triplicata em diferentes concentrações compreendidas entre 25 a 500 μM . Após a adição da enzima foi levada ao leitor de placas e a densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 405 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição. Assim, foram confeccionados os gráficos (concentração x porcentagem de inibição) e calculados os valores de CI_{50} (μM), com os respectivos desvios padrões. Devido à baixa solubilidade em água de alguns compostos desta classe, não foi possível calcular o seu CI_{50} , pois deve-se ter pelo menos quatro pontos para confecção deste gráfico.

A **Tabela 3** mostra os resultados obtidos para os ensaios com os organofosforados de **1 – 12** com o percentual de inibição em diferentes concentrações.

Tabela 3: Percentual de inibição dos compostos em diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões.

OF testados	Percentual de Inibição					
	25 μM	50 μM	100 μM	250 μM	350 μM	500 μM
2	0	11 \pm 1,56	12 \pm 1,06	27,2 \pm 2,5	40 \pm 1,66	*
3	0	10,2 \pm 1,99	15 \pm 2,32	30 \pm 2,65	35 \pm 1,87	50 \pm 1,62
5	0	0	10 \pm 1,52	20 \pm 1,75	45 \pm 2,06	88 \pm 2,09
6	0	2,5 \pm 1,22	3 \pm 1,49	*	*	*
7	39 \pm 1,55	40,3 \pm 1,09	55 \pm 2,26	72 \pm 3,09	*	*
8	25 \pm 2,36	35 \pm 3,5	*	*	*	*
9	13 \pm 1,01	19 \pm 1,77	21 \pm 2,00	29 \pm 1,80	32 \pm 1,91	*
10	57 \pm 3,05	65 \pm 3,51	85 \pm 2,87	99,8 \pm 3,99	*	*
11	0	25 \pm 1,02	26 \pm 1,00	*	*	*
12	0	10 \pm 0,98	30 \pm 0,96	*	*	*
Acefato	15 \pm 1,50	25 \pm 0,92	30 \pm 1,06	42 \pm 0,89	50 \pm 3,09	*

*compostos parcialmente solúveis em água.

A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos com a fisostigmina que funciona como controlo positivo, em concentrações de 2,5nM-40nM .

Tabela 4: Percentual de inibição da fisostigmina em diferentes concentrações e seus respectivos desvios padrões.

Fisostigmina	
Concentração(nM)	%de inibição±dp*
2,5	15,57±0,86
5	18,66±1,23
7,5	27,78±0,99
10	34±0.39
15	43,2±0,579
20	53,61±0,967
40	99,985±1,5

*desvio padrão

Os compostos **1** e **4** não foram capazes de inibir a enzima AChE mesmo em concentrações elevadas de 500µM, sendo assim considerados não inibidores da acetilcolinesterase.

Os compostos **6**, **8**, **11** e **12** apresentam baixa solubilidade em metanol e etanol o que impediu a realização de outros ensaios como o CI₅₀ e a cinética enzimática.

Os compostos **2**, **3**, **5**, **7**, **9**, **10**, apresentam alta solubilidade permitindo calcular o percentual de inibição em diferentes concentrações e desta forma obter os diferentes valores de CI₅₀ que são mostrados nas **Figuras 23 a 30** e na **Tabela 5**.

A partir dos dados da **Tabela 3** e **4** foram construídas as curvas de percentual de inibição x concentração e conseqüentemente foram obtidas as equações correspondentes ao modelo matemático que expressa a relação entre o percentual de inibição e a concentração.

As **Figuras 22 a 29** apresentam a variação do percentual de inibição X concentração, além do valor de CI₅₀ para os compostos **2**, **3**, **5**, **7**, **9**, **10**, **acefato** e **fisostigmina** e seus respectivos desvios padrões.

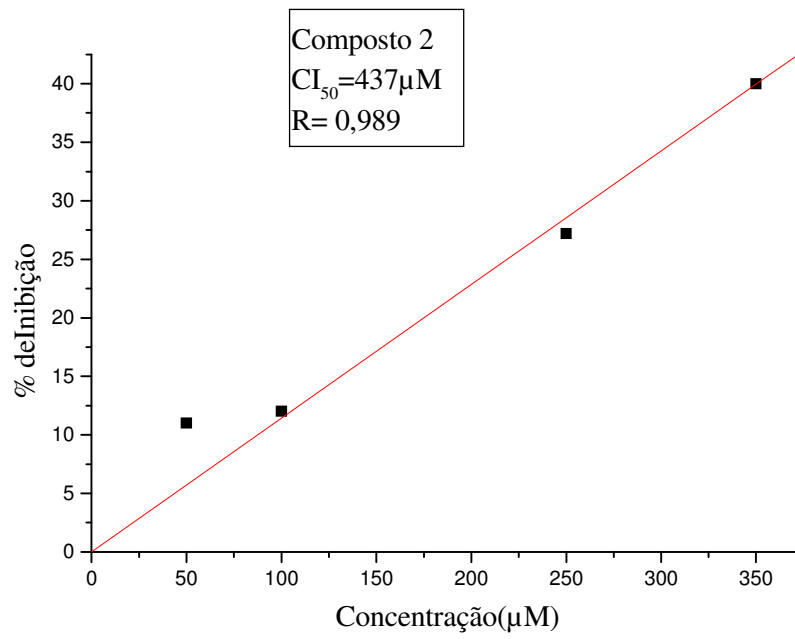


Figura 22. Gráfico de CI_{50} para o composto 2

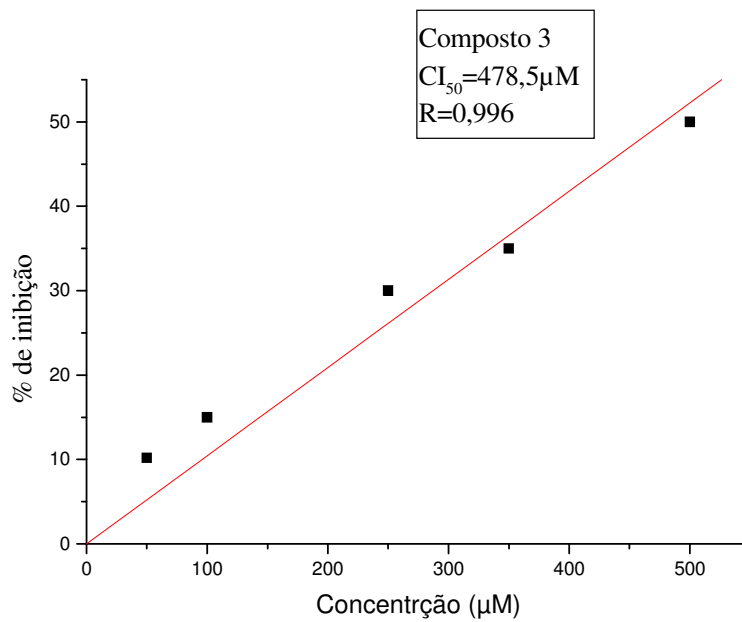


Figura 23. Gráfico de CI_{50} para o compostos 3

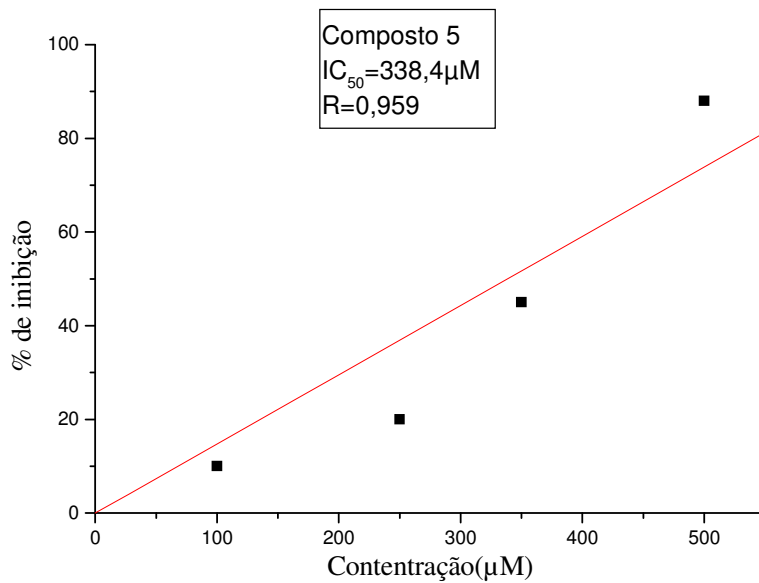


Figura 24. Gráfico de CI_{50} para o composto 5

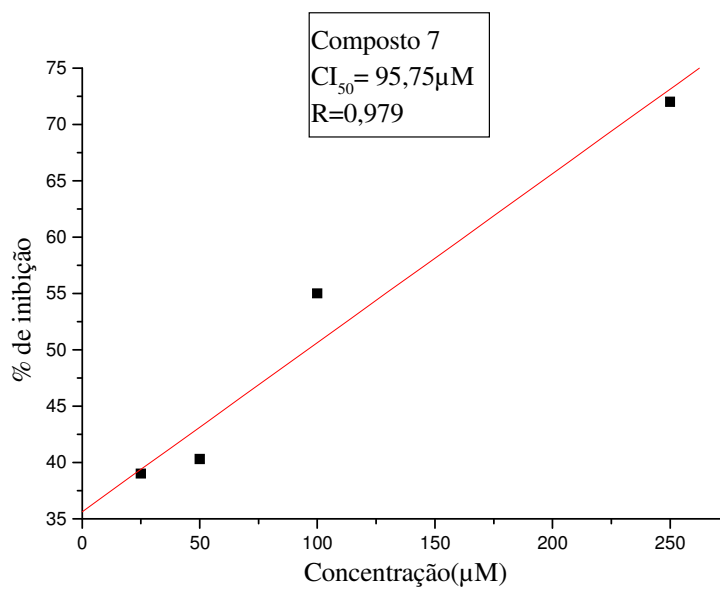


Figura 25. Gráfico de CI_{50} para o composto 7

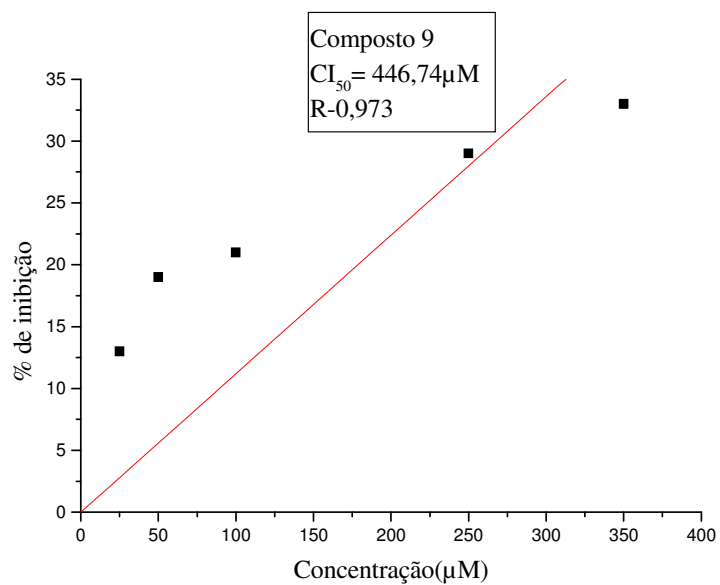


Figura 26. Gráfico de CI_{50} para o composto 9

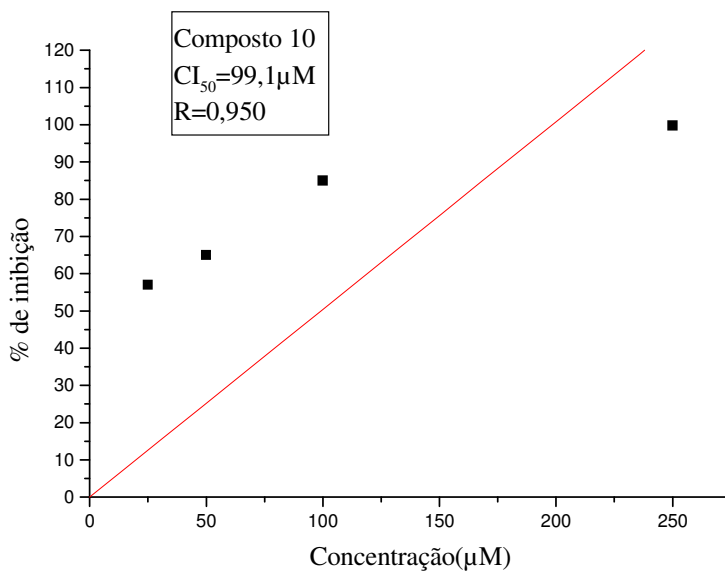


Figura 27. Gráfico de CI_{50} para o composto 10

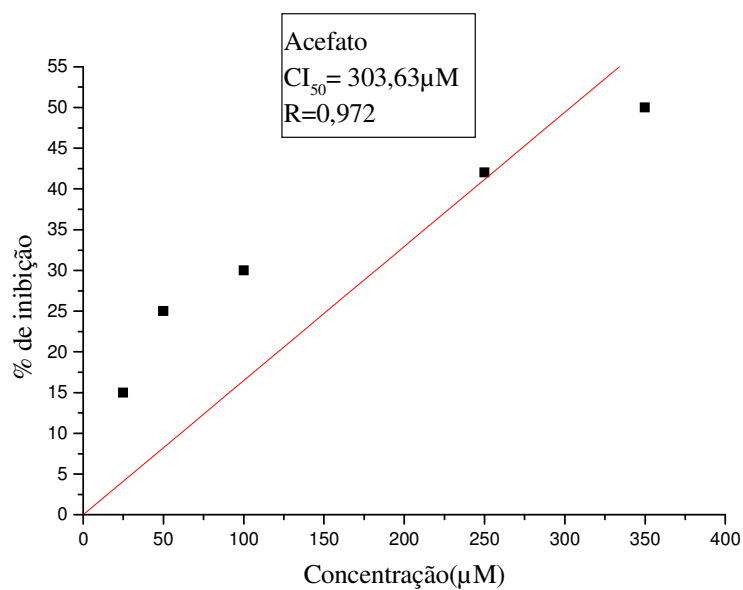


Figura 28. Gráfico de CI_{50} para o acefato

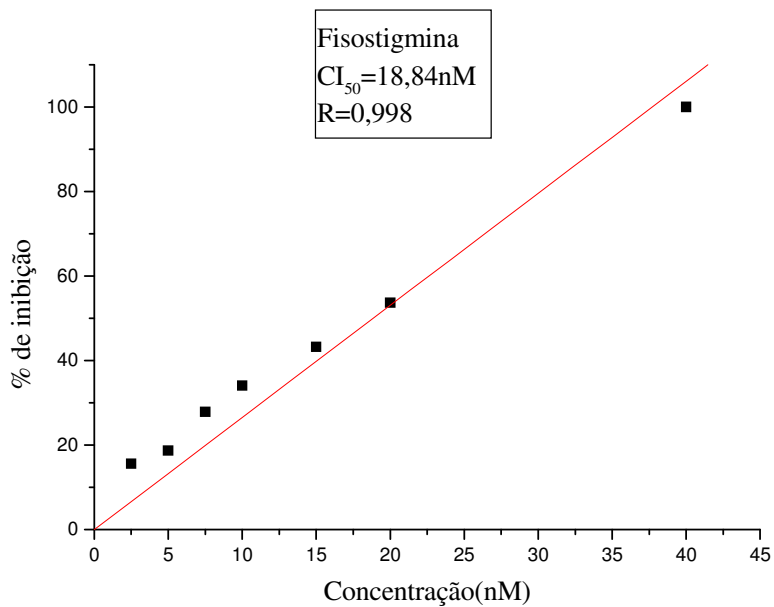


Figura 29. Gráfico de CI_{50} para a fisostigmina

A **Tabela 5** mostra os valores de CI_{50} e seus respectivos desvios padrões, para uma melhor observação e discussão dos dados.

Tabela 5: Valores de CI_{50} para os compostos avaliados quanto à atividade inibitória da acetilcolinesterase.

Compostos	$CI_{50}(\mu M) \pm *dp$
2	437,43 \pm 1,98
3	478,5 \pm 4,21
5	338,4 \pm 3,57
7	95,75 \pm 2,33
9	446,74 \pm 0,99
10	99,1 \pm 1,65
Acefato	303,63 \pm 2,42
Fisostigmina	0,0188 \pm 1,57

dp: desvio padrão

Através dos valores de CI_{50} presentes na **Tabela 5** e os valores de percentual de inibição presentes na **Tabela 3**, podemos observar que a ordem crescente de inibição é: **12<3<9<2<11<5<7<10**. Em consequência da pequena variedade de estruturas não foi possível correlacionar o percentual de inibição com a estrutura dos compostos.

5.2. Cinética enzimática

A cinética anticolinesterásica foi realizada segundo o método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) já descrito na parte experimental deste trabalho. A velocidade máxima da enzima e a sua constante de Michaelis-Menten K_m (MICHAELIS & MENTEN, 1913) foi deduzida a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934), $1/V_0$ em função de $1/[S]$ que pode ser observado na **Figura 30**. Este gráfico de Lineweaver-Burk, referente atividade da AChE, fornece o valor K_m da enzima. A **Tabela 6** mostra os 10 pontos que compõem o gráfico, e através deste chegamos ao valor aproximado de K_m da enzima AChE, $0,085 \pm 0,10 \times 10^{-4}M$, que está muito próximo do K_m encontrado na literatura (CORREIA *et al.*, 2006).

Tabela 6: Valores de concentração do substrato (mM), ABS, $1/V_0$ e $1/[S]$ para a realização de dados para cálculo dos parâmetros cinéticos da AChE e seus respectivos desvios padrões.

[S]	AE	$1/[S]$	$1/V_0 \pm dp^*$
0,04	0,304	25	$3,28 \pm 0,15$
0,05	0,335	20	$2,98 \pm 0,13$
0,085	0,475	11,76	$2,10 \pm 0,21$
0,1	0,533	10	$1,87 \pm 0,15$
0,15	0,59	6,66	$1,69 \pm 0,26$
0,177	0,628	5,65	$1,59 \pm 0,15$
0,2	0,664	5	$1,50 \pm 0,12$
0,22	0,679	4,54	$1,47 \pm 0,22$
0,24	0,685	4,16	$1,44 \pm 0,055$
0,25	0,688	4	$1,35 \pm 0,13$

dp* desvio padrão

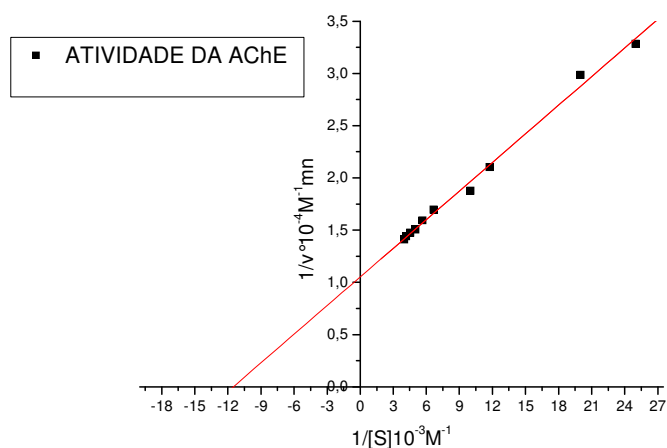


Figura 30. Gráfico de Lineweaver-Burk para a interação da acetilcolinesterase com a acetiltiocolina.

Foi realizada uma investigação cinética dos compostos **3**, **5**, **9** e **10**, que apresentam estruturas diferentes, com o objetivo de correlacionar sua estrutura com o

tipo de inibição enzimática. As **Figuras 31 a 34** mostram os gráficos cinéticos relativos aos compostos **3, 5, 9 e 10**, em duas concentrações diferentes para cada um. A análise do perfil destes gráficos permite caracterizar a natureza da inibição.

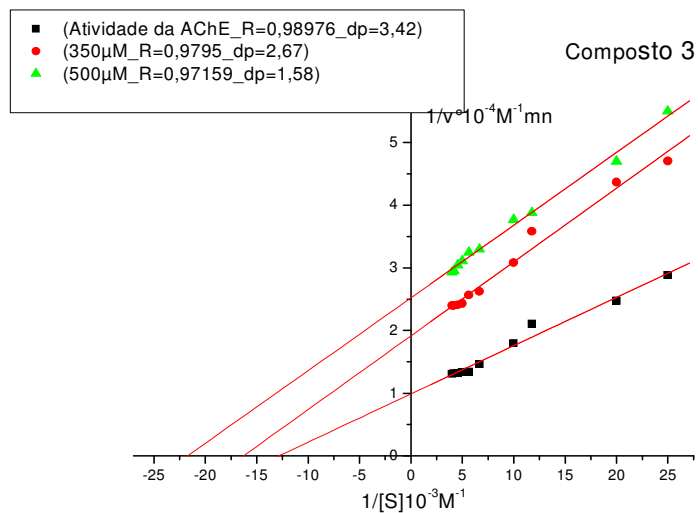


Figura 31.Gráfico de cinética de inibição de ACThe pelo composto 3

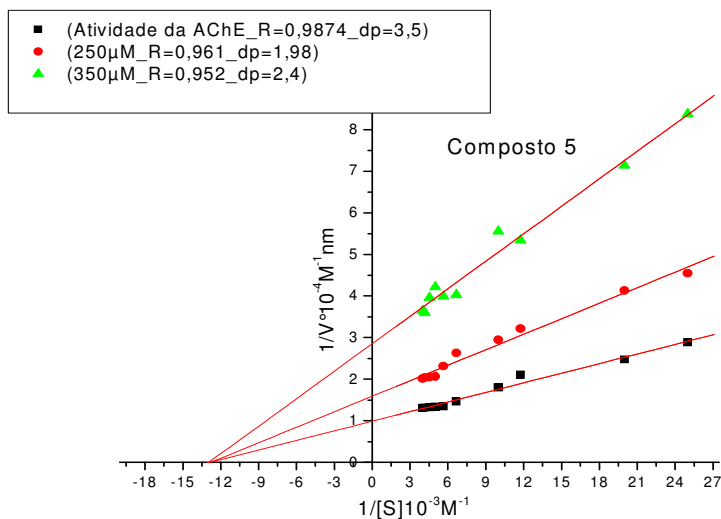


Figura 32 .Gráfico de cinética de inibição de ACThe pelo composto 5

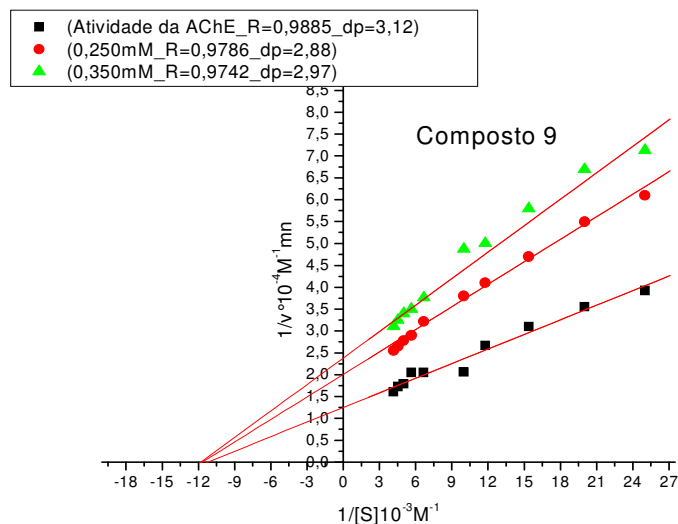


Figura 33 .Gráfico de cinética de inibição de ACThE pelo composto 9

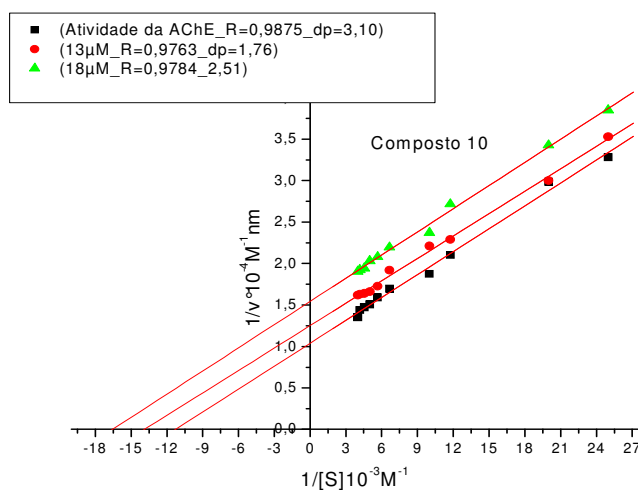


Figura 34 .Gráfico de cinética de inibição de ACThE pelo composto 10

Foi também realizado um estudo cinético do composto 7 porém esse se comportou de forma diferente dos compostos 3, 5, 9 e 10 não apresentou diferença na velocidade catalítica da enzima quando variamos a concentração do substrato, porém quando variamos o tempo de reação o percentual de atividade da enzima diminui mostrando desta forma que se trata de uma inibição irreversível. Este tipo de inibição pode ser detectada através dos dados das Tabelas 7 e 8.

A **Tabela 7** correlaciona a concentração do substrato com a velocidade catalítica da enzima, para o composto **7** na concentração de 250 μ M e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 7: valores de concentração do substrato e velocidade catalítica da enzima na presença do composto **7** na concentração de 250 μ M e seus respectivos desvios padrões.

[S]	AE	1/[S]	1/V $^{\circ}$ \pm dp*
0,085	0,201	11,764	4,97 \pm 0,32
0,1	0,205	10	4,88 \pm 0,28
0,15	0,2051	6,66	4,87 \pm 0,19
0,177	0,207	5,649	4,83 \pm 0,25
0,2	0,209	5	4,78 \pm 0,21

*dp: desvio padrão

A **Tabela 8** correlaciona o percentual de inibição em 10, 20 e 30 minutos na presença do composto **7** nas concentrações de 250, 100 e 50 μ M e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 8: valores de variação do percentual de inibição com a variação de tempo em minutos para três concentrações diferentes do composto **7** e seus respectivos desvios padrões.

Conc.(μ M)	Percentual de Inibição \pm dp*		
	Tempo (min)		
	10	20	30
250	55 \pm 1,43	67 \pm 2,53	72 \pm 2,98
100	44 \pm 2,4	48 \pm 2,76	55 \pm 1,96
50	28 \pm 1,87	33 \pm 1,88	41 \pm 1,23

*dp: desvio padrão

Com base neste estudo cinético podemos observar que os compostos organofosforados estudados agem como inibidores reversíveis não competitivos, incompetitivos e, num caso apenas, como inibidor irreversível.

A **Tabela 9** correlaciona a natureza de inibição e o valor de CI₅₀ com o valor de K_i.

Tabela 9: Tabela de correlação da natureza de inibição e o valor de IC₅₀ com o valor de Ki

Composto	Natureza de		
	inibição	K _i (mM)	IC ₅₀ (mM)
3	incompetitiva	0,227	0,5031
5	não-competitiva	0,394	0,394
9	não-competitiva	0,666	0,666
7	irreversível	-	0,0959
10	incompetitiva	0,108	0,024

5.3. Ensaio de atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*

Os ensaios para a avaliação da atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti* foram realizados em triplicatas e em diferentes concentrações para o posterior cálculo de DL₅₀. Esta atividade foi medida após 24 horas e no caso da não mortalidade das larvas foi então medida após 48 horas.

Dentre os compostos testados somente o composto **7** apresentou a DL₅₀ dentro da faixa de concentração estudada que foi de 1,25 mM-0,312 mM. Os demais compostos possuem DL₅₀ acima da concentração máxima de 1,25mM.

A DL₅₀ do composto **7** foi encontrada através da equação da reta obtida a partir do gráfico de percentual de atividade larvicida contra a concentração utilizada.

Os dados de percentual de atividade larvicida frente às larvas do *Aedes aegypti* no bioensaio do composto **7**, assim como as concentrações utilizadas para o teste estão mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10: Dados de percentual de atividade larvicidas e concentração do composto **7** testada.

% de atividade larvicida	Concentração do composto 7(mM)
100	1,25
53,33	1,062
40	0,812
20	0,567
0	0,312

A partir dos dados da **Tabela 10** foi construída a curva de % de atividade larvicida X concentração e, conseqüentemente, foram obtidas as equações correspondentes ao modelo matemático que expressa a relação entre o percentual de inibição e a concentração, assim como foi feito o calculo de CI_{50} .

A **Figura 35** apresenta a variação da percentagem de inibição larvicida X concentração, além do valor de DL_{50} para o composto **7**.

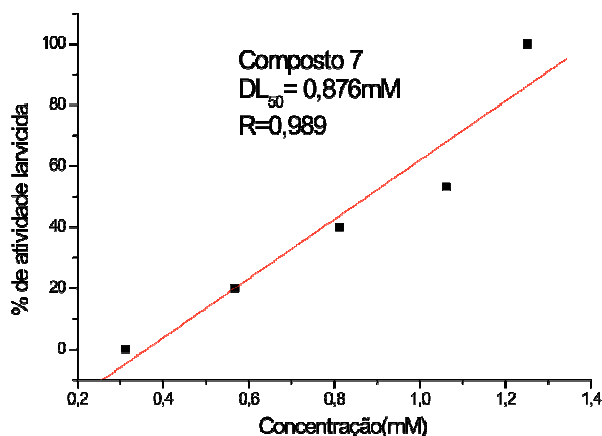


Figura 35. Gráfico de DL_{50} para o composto 7

Após 48 horas foi observada atividade larvicida de 53,33% para o compostos **5**, e 20 % de atividade larvicida para o composto **10** na concentração de 1,25mM

Os compostos **6, 8, 9, 11 e 12** apresentaram atividade pesticida, porém devido à baixa solubilidade em água não foi possível obter um valor confiável desta atividade. Os compostos **1, 2, 3 e 4** não apresentaram atividade larvicida mesmo na concentração de 1,25mM após 48 horas.

6- CONCLUSÕES

Uma vez que os compostos mais ativos são **10** e **7**, nota-se que estes dois possuem em comum o grupo butila e se diferenciam pela presença de uma carbonila de cetona no composto **10**, que é mais ativo que o composto **7**, pois este ultimo possui menores valores de CI_{50} e constante de inibição (K_i). Assim, pode-se concluir que esses dois grupamentos são importantes para a atividade inibitória, fato este que é

corroborado por resultados obtidos por Gholivand e colaboradores, que observaram atividade elevada em fosforamidatos com grupos carbonila (GHOLIVAND *et al.*, 2006), este pode ser justificado pela melhor interação que a nuvem eletrônica π da carbonila exerce com a AChE, isto pode ser observado com os inibidores da AChE utilizados no tratamento da DA onde todos possuem anel aromático. É de interesse observar que enquanto o composto **7** é ativo, o composto **1** é inativo e a diferença é que **7** possui um grupamento butil e **1** possui isopropil, o que significa que provavelmente há um impedimento estérico (vide também a diferença entre **6** que possui isopropil e atividade menor do que **12** substituído com butil e maior atividade e o mesmo efeito ocorre entre **2** e **8** e entre **4** e **10**) para a interação de **1** com o sítio alostérico, o que já foi observado com cálculos teóricos (SILVA, 2009). Esperava-se que **6** e **12** fossem bons inibidores uma vez que apresentam estruturas semelhantes à da tacrina, mas a baixa solubilidade em água impediu a determinação do tipo de inibição e dos valores de K_i ou CI_{50} . Além disso, a inclusão de 2 inibidores incompetivos, na classe de compostos estudada, é de interesse para a pesquisa, pois é um tipo de inibição menos comum, embora já tenha sido descrita na literatura (MORALEV & ROZENGART, 2008). Os compostos **5** e **9** são inibidores reversíveis não competitivos, isto é, interagem com um sítio da AChE diferente do sítio ativo. Já os compostos **3** e **10** são inibidores incompetivos e portanto, interagem com o complexo enzima-substrato. Pode-se observar que apenas o composto **7** apresentou inibição irreversível e conseqüentemente foi o único composto que apresentou atividade larvicida, visto que inibidores irrversíveis inativam a enzima, este fato pode ser justificado pela presença de um bom grupo de saída, pois a presença da carbonila estabiliza a carga negativa sobre o átomo de carbono β de uma das estruturas de ressonância e assim a enzima permaneceria fosforilada, gerando a inibição irreversível, e que pode ser corroborado pela observação da menor atividade dos compostos **2** e **8** que não apresentam carbonila quando comparados com o composto **7** que apresenta carbonila.

A concentração que inibe 50% da atividade anticolinesterásica do composto **7** é 95,95 μ M, já sua atividade larvicida é 876 μ M, ou seja, mais de nove vezes maior o que mostra a diferença de especificidade, ou seja, a atividade inibitória é um reflexo da interação direta entre organofosforado e enzima enquanto que a atividade larvicida representa uma interação mais limitada uma vez que o organofosforado necessita atravessar algumas barreiras até ser capaz de interagir com a enzima.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIUB, F.A.C.; COELHO, A.C.E.; SODRÉ, E.; PINTO, R.F.L.; FELZENSWALB, I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. **Genetics and Molecular Research**. v. 2, p. 159-166, 2002.

ANDRADE, C.F.S.; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. **Rev Saúde Pública**.v.25,pp.184-187,1991.

BAYNES, J. W. – Bioquímica médica. Tradução da 2ª Edição. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 1991. ISBN: 978-85-352-2298-2

BENCURA, A.; ENYEDY, I.; KOVACH, I.M. Origins and diversity of the aging reaction in phosphonate adducts of serine hydrolase enzymes: what characteristics of the active site do they probe? **Biochemistry**. v. 34, p. 8989- 8999, 1995.

BOSGRA, S.; JAN,C.H.; EIJKEREN,V.; VAN DER SCHANS, M. J.; LANGENBERG P. J.; SLOB, W. Toxicodynamic analysis of the inhibition of isolated human acetylcholinesterase by combinations of methamidophos and methomyl in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology** .v.236, p. 1–8, 2009

BRECKER, L., STRAGANZ, D.G.; TYL; E.C. Saturation-transfer-difference NMR to characterize substrate binding recognition and catalysis of two broadly specific glycoside hydrolases J. **Mol. Catalysis B-Enzymatic**. v.42, pp. 85-89,2006.

CAMPOS, L.S – Entender a Bioquímica. 2ª Edição Lisboa: Escolar Editora, 1999. ISBN: 972-592-108-9.

CAMPOS, J. ; ANDRADE, S. F. C. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**. V. 35. , nº 3. , 2001.

CARAMELLI, P.; CHAVES, M.L.F.; Engelhardt E, et al. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimers disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GAL-BRA-01). **Arq Neuropsiquiatr**.v.62,PP.379-384,2004.

CASTRO, A. T. Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos. 121 f. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2002.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal**, Londres, v.260, n.3, p.625-634,1989.

CACABELOS,R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimers disease. *Int J Geriat Pshychiatry*.v.14,pp.33-47,1999.

CHENG.Y & PRUSOF W.H.. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** v.22,pp.3099–3108,1973.

COREY-BLOOM, J.; Anand R, Veach J, group ftEBs. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int J Geriatric Psychopharmacol*, 1:55- 65, 1998.

CORREIA.I; RONZANI.NELLO; PLATZER.N; DOAN.B.T.; BELOEIL.C.J.J. Study of a potential inhibitor of acetylcholinesterase using UV spectrophotometry, NMR spectroscopy and molecular modeling. **phys.che.** v.19,pp.148-156, 2006.

CUMMINGS,J.L.; Cyrus PA, Bieber F, Mas J, Orazem J, Gulanski B. Metrifonate treatment of the cognitive deficits of Alzheimer's disease. Metrifonate Study Group. *Neurology*, v.50,pp.1214-1221, 1998.

DAVIS, K.L.; POWCHIK, P. Tacrine. **Lancet.** v. 345,pp.625-630,1995.

DE CLEMONT. **Comptes Rend**, v.39, pp.338-340, 1854

ELHANANY, E.; ORDENTLICH, A.; DGANY, O.; KAPLAN, D.; SEGALL,Y.; BARAK, R.; VELLAN, B.; SHAFFERMAN, A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts **Chen Res Toxicol**,v.14, pp.912-918, 2001.

ELLMAN. GL; COURTNEY.KD; ANDRES. V. JR; FEATHERSTONE. RM; A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. **Biochem Pharmacol**, v.7, pp.88-95, 1961.

EMBRAPA. Cultivo de arroz no Brasil. Embrapa clima tempo, 2003. Disponível em <HTTP: WWW.cpact.embrapa .br> acesso em 12 de setembro de 2009.

FAKOORZIBA, M. R.; EGHBAL, F.; VIJAYAN, V. A. Synergist Efficacy of Piperonyl Butoxide with Deltamethrin as Pyrethroid Insecticide on *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquito Species. **Environmenta Toxicology**. v. 24, pp. 19-24, 2009.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. J. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress **Neurol. Neurosurg. Psychiatry** .v.66, pp.137-147, 1999.

FULTON, M.H. &KEY, B.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects **Eviron toxicol che**. v.20, pp. 37-45, 2001.

GÉLINAS, I.; GAUTHIER, S.; CYRUS PA, Ruzicka BB, Gulanki B. The efficacy of metrifonate in enhancing the ability of Alzheimer's disease patients to perform basic and instrumental activities of daily living. **Neurology**, v.50, pp.A90-A91, 1998.

GHOLIVAND, K.; MOJAHED, F.; SALEHI, A.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K. J. Synthesis, characterization and inhibitory potency of two oxono and thiono analogues of phosphoramidate compounds on acetylcholinesterase **Enz. Inhib. and Med. Chem**, v.21, pp. 521-525, 2006.

GONÇALVES, T.V. Novas dialquilfosforilidrazonas: Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biológica. 210 f. Dissertação (mestrado em área envolvida)-UFRRJ, Rio de Janeiro, 2009.

HAUX, J. E.; LOCKRIDGE, O.; CASIDA, J. E. Specificity of ethephon as a butyrylcholinesterase inhibitor and phosphorylating agent **Chem Res Toxicol**, v.15, pp.1527-1533, 2002.

HAUX, J. E.; QUISTAD, G. B.; CASIDA, J. E. Phosphobutyrylcholinesterase: Phosphorylation of the esteratic site of butyrylcholinesterase by ethephon [(2-chloroethyl)phosphonic acid] dianion **Chem Res Toxicol**, v.13, pp.646-651, 2000.

HONÓRIO, N.A.; CABELO, P.H.; CODEÇO, C.T.; OLIBEIRA, L. R., Preliminary data on the performance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* immatures developing in waterfilled tires in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v.101., pp225-228, 2006.

HUDSON, R.H.; MAVROMATIS, N.C.; PIANKA, M. Organophosphorus compounds as potential fungicides .4. The preparation and properties of some novel N-(1-substituted-

2,2,2-trichloroethyl)phosphoramidates **Phosphorus, Sulfur and Silicon**, v.108, pp. 141-153, 1995.

JUN, D.; MUSILOVAC, L.; KUCA, K.; KASSA, J.; BAJGAR, J. Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon in vitro. **Chemico-Biological Interactions**.v. 175, p. 421–424, 2008.

JUNOR, C. V.; BOLZONI, V .S.; FUREAN, M.; FRAGO, C. A. M.; BARRETO, E. J. **Quím.Nova**, v.27, pp. 655-660, 2004.

KAMAL.A.M; GREIG.H.N; ALHOMIDA.S.A.;AL-JAFARI.A.A. Kinetics of human acetylcholinesterase inhibition by the novel experimental Alzheimer therapeutic agent, tolserine **Biochemical Pharmacology**, v.60, pp.561-570, 2000.

KAPLAN, D.; ORDENTLINCH, A.; BARAK, D.; ARIEL, N.; KRONMAN, C.; VALAN, B.; SHAFFERMAN, A. Does "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? **Biochemistry**, v.40, pp.7433-7445, 2001.

KAUSHIK, P; KAUSHIK, G. An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides- journal of hazardous material, v.147, p. 102-111, 2007.

KNAPP, M.J.; KNOPMAN, D.S.; SOLOMON, P.R.; PENDLEBURY, W.W; DAVIS, C.S.; GRACON, S.I. Week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. **J Am Med Assoc** 1994;271:985-991.

LEVIN, E.D., SIMON, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. **Psychopharmacology**.v.138,pp.217-230,1998.

LINEWEAVER H, BURK D. J. **Am. Chem.Soc.** v. 56; pp. 658-666; 1934.

LIN, J.; YU, C. ; ZHOU, Y. **Acta Chim. Sin.** v.44 ,pp. 1035,1986.

LI, Y., LI, Q., SUN, M.; SONG, G.; JIANG, S. ; ZHU, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* ¹H NMR relaxation investigation of acetylcholinesterase inhibitors from huperzine A and derivative. V.14 pp.,pp. 1585-88,2004.

LOSSITER, T. L.; MARSHALL, R. S.; JACKSON, L. C.; HUNTER, D .L.; VU, J.

LOZANO, J.A. et al. –Bioquímica y Biología Molecular para ciencias de la salud. 2º Edición. Madrid: Mc Graw- Hill- Interamericana de España, S. A. U; 2000. ISBN: 84-486-0292-7.

MACORIS, M.L.G.; CAMARGO, M.F.; SILVA, I.G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M.T.; Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. **Rev Patol Trop**; v.24, pp.31-40, 1995.

MACORIS, G.L.D.M.; LOURDES, M.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSERI M.C.; GARBELOTO, C.V.; CIRINO, B.C.V. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. V. 33., nº.5 ,1999.

MACNAUGHTAN, A.M.; KAMAR, M. ; ALVAREZ-MANILLA, G. V .NMR structural characterization of substrates bound to N-acetylglucosaminyltransferase. **J. Mol. Biol.** v.366, pp. 1266-81 ,2007.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.; GARBELOTO, V.C.; CIRINO, C.B.; Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v.33, pp.521-21, 1999.

MALLENDER, W. D.; SZEGLETES, T.; ROSENBERRY, T. L. Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway **Biochemistry**, v.39, pp.7753-7763, 2000.

MARTINS, J.A.; BELINATO, A.T.; LIMA, B.J.; , VALLE, D. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest Management Science Pest Manag Sci**. v.64., pp.676–680, 2008.

MASSAD, E., COUTINHO, F.A., BURATTINI, M.N.; LOPEZ, L.F., The risk of yellow fever in a dengue-infested area. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 95., pp370–374, 2001.

MICHAELIS .L.; MENTEN. ML.; **Biochem.** ; v.49; PP.333-369, 1913.

MINETT, T.S.C. & BERTOLUCCI, P.H.F. – Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer **Rev. Neurociências**, V.8, pp.11-14, 2000.

MONDET, P.B., ROSA,T.A.P.A., VASCONCELOS,P.F.C., Les risques d'epid'emisation urbaine de la fi`evre jaune au Br'esil par les vecteurs de la dengue *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. **Bull Soc Path Exot.** v.89.,pp107–114, 1996.

MORALEV.N.S. & ROZENGART.V.E. Comparative Analysis of Sensitivity of Cholinesterases of Different Origin to Bis_Onium Reversible Inhibitors. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, V. 44, pp. 414-429, 2008.

MORALEV.N.S. & ROZENGART.V.E. Comparative Analysis of Sensitivity of Cholinesterases of Different Origin to Monoonium Reversible Inhibitors. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, V. 43, pp. 223-239, 2007.

MORRIS, J.C., Cyrus PA, Ozarem J *et al.* Mefenoxate benefits cognitive, behavioral, and global function in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 50:1222-1230, 1998.

NELSON, N.L . ; COSC, M.M; “ Lehninger Principles of Biochemistry” – 4° Edição; W.H. Freeman, 2005. IBSN: 978-0716743392;

OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. Bases e Técnicas do Manejo de Insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, Pallotti, 2000. p.30-49.

ORDENTLICH, A.; KRONMAN, C.; BARAK, D.; STEIN, D.; ARIEL, N.; MARCUS, D.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Engineering Resistance to Aging of phosphorylated human Acetylcholinesterase- Role of Hydrogen-Bond Network in the ActiveC-center. **FEBS lett**, v.334, pp.215-220, 1993.

ORSHAN, L.; KELBERT, M.; PENER, H. Patterns of insecticide resistance in larval *Culex pipiens* populations in Israel: dynamics and trends. **Journal Of Vector Ecology**. v. 30, p. 289-294, 2005.

OZMEN, M.; SENER,S.; METE,A.; KUCUKBAY,H. In vitro and in vivo acetylcholinesterase-inhibiting effect of new classes of organophosphorus compounds. **Eviron toxicol chem.** v.18, pp. 241-246, 1999.

OZEN, C.; MALEK, J. C. e SERPESU, H.E. Dissection of aminoglycoside-enzyme interactions: A calorimetric and NMR study of neomycin B binding to the aminoglycoside phosphotransferase(3')-IIIa. **J. Am. Chem. Soc.** v.128, pp. 15248-54, 2006.

PACI, A.; MARTENS, T.; ROYER, J. Anodic oxidation of ifosfamide and cyclophosphamide: A biomimetic metabolism model of the oxazaphosphorinane anticancer drugs **Bioorgan Medi Chem Lett.** v.11, pp.1347-1349, 2001.

PADILLA, S.T.; Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v.186, pp.241-253, 2003.

PANG, Y-P.; KOLLMEYER, T.M. ; HONG, F. ; LEE, J-C.; MAMMOND, P. I.; HAUGALO, K. S.; BRIMJOIN, .S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumalidoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. **Biochem Biol**, v.10, pp.491-502, 2003

PARDIO, V. T.; IBARRA, RODRIGUES, M. A. J. Use of cholinesterase activity in monitoring organophosphate pesticide exposure of cattle produced in tropical areas. **Agric.food chem**, v.49, pp.6057-6062, 2001.

PAPANDREOUA, A.M.; DIMAKOPOULOU, A.; LINARDAK, I. Z.; CORDOPATIS, P.; KLIMIS-ZACASC, D.; MARGARITY, M.; LAMARI, N.F. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. **Behavioural Brain Research**.v. 198,p. 352–358, 2009

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. **Acta Medica**, Hradec Králové, v.47, n.4, p.215- 228, 2004.

PETERS, B.H.; LEVIN, H.S. Effects of physostigmine and lecithin on memory in Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, 24:140-145, 1979.

POON, Y. K. D.; LUDWICZEK, L.M. ; SHUBERT.M. NMR spectroscopic characterization of a beta-(1,4)-glycosidase along its reaction pathway: Stabilization upon formation of the glycosyl-enzyme intermediate **Biochemistry**.v. 46, pp. 1759-1770,2007.

POURPARDINA, R.; REYNAUDA,S.; STRODEB, C.; RANSOMB, H.; VONTASC, J.; DAVIDA, P.; Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biolog**.v. 38., pp. 540–551, 2008

QIAN, N. & KOACH, I. M. **Febs Lett**, v. 336, pp. 215-228, 1993

QIZILBASH, N.; WHITEHEAD, A.; HIGGINS, J.; et al. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. **JAMA**. v.280, pp.1777-1782, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4^aed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp.110, 2001.

RAO.V.J.; KAVITHA.P.; JAKKA.M.N.; SRIDHAR.V.; USMAN.K.P.; Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina* **Arch.Envirion.contam.toxicol**, v.53, pp.227-232, 2007.

REY, D.; DAVID, P.J.; BESNARD, G.; JULLIEN, L. J.; LAGNEAU, C. ; MEYRAN C.J. Comparative sensitivity of larval mosquitoes to vegetable polyphenols versus conventional insecticides. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 98., pp. 361–367, 2001.

RYDBERG.H.E.;BRUMSHTEIN.B.;GREENBLATT.M.H.;WONG.M.D.;SHAYA.D.; WILLIAMS.D.L.; CARLIER.R.P.; PANG.P-Y.; SILMAN.I.; SUSSMAN.L.J.; *J. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with Torpedo californica acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge* **Med. Chem.**, v.49, pp.5491-5500, 2006.

RUSSO.P.R.,**Revista Brasileira de anesthesiologia**, n°3, 1977.

ROGERS,S.L.; FRIEDHOFF, L.T. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimers disease: results of a US multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **The Donepezil Study Group. Dementia**.v.7,pp.293-303,1996.

ROGERS,S.L.; DOODY, R.S.; MOHS, R.C., Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, doubleblind doubleblind, placebo-controlled study. **Arch Int Med**, v.158,pp.1021-1031,1998.

ROGERS, S.L.; Farlow MR, Mohs R, Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. week, double-blind, placebocontrolled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **Neurology**.v. 50,pp.136-145, 1998.

SANCHES, S .M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. Pesticidas: **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**. v.13, pp. 53-58, 2003.

SCHULZE, H.; VORLOVA, S.; VILLATTE, F.; BACHMANN, T. T.; SCHMID, R. D. Design of acetylcholinesterases for biosensor applications. **Biosens Bioelectron**, v.18, pp.201-209, 2003.

SILVA, I.G.; CAMARGO, M.F.; ELIAS, C.N.; SILVA, H.H.G.; IRATA, Y.; ANTUNES, S.M.; Provas biológicas para verificar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. **Rev Patol Trop**.v.26,pp.31-35,1997.

SILVA, D.B.J.; Jr, SIQUEIRA, J.B., Jr, COELHO, G.E., VILARINHOS, P.T. and PIMENTA, F.G., Jr, Dengue in Brazil: current situation and control activities. **Epidemiol Bull**. v.23.,pp.3–6, 2002.

SILVA, D. R., comunicação pessoal.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. **Proceedings of the Nacional Academy of Science**. v. 87, pp. 9688-9692, 1990.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; PROLOW. F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**. v. 253, pp. 872-879, 1991.

SUMMERS, W.K.; MAJOVSKI, L.V.; MARSH, G.M.; TACHIKI, K.; KLING, A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia Alzheimer type. **N Engl J Med**.v.315,pp.1241-1245,1986.

TAYLOR, P. **Neurology**, Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease v.51, pp.S30-S 35, 1998.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z., Epidemiologia e medidas de prevenç~ao do dengue. **Informe Epidemiol'ogico do SUS**.v. 8.,pp5–33, 1999.

VERLAG GMBH & CO.KGA; Enzyme kinetics. Principles and methods. 2º Edição Hans Bisswanger, 2008. IBSN: 978-3-527-31957-2

ZIMMERMAN,G.;SOREQ, H.;Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res*;326:655–69, 2006.

<http://scienceblogs.com.br/ecodesenvolvimento/2008/10/blogagem-coletivadescobertas-cientificas.php>. 1/10/2009.

<http://www.diaadia.pr.gov.br/tvpendrive/modules/mylinks/viewcat.php?cid=1&letter=D&min=90&orderby=titleA&show=10>. 1/10/2009.

<http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=83274>;

<http://www.aged.ma.gov.br/2009/1/21/Pagina245.htm>. 4/10/2009

http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399. 4/10/2009

http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves_p.html

http://neuromed88.blogspot.com/2008_09_01_archive.html

<http://www.saude.gov.br/svs/2009>, acessada novembro 2009.

[Hpp://www.biostat.wustl.edu/alzheimer/](http://www.biostat.wustl.edu/alzheimer/), acessada maio 2008.

WOREK, F.; AURBEK, N. ; WETHERELL, J. ; PEARCE, P. ; MANN,T.; THIERMANN, H. Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: Pig versus minipig acetylcholinesterase. **Toxicology**. v. 244, p. 35–41, 2008.

.

