

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GRAZIANY LEITE MOREIRA MARQUES

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ATROPINA E PRALIDOXIMA NA
INTOXICAÇÃO AGUDA POR CLORPIRIFÓS E DESENVOLVIMENTO
DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS E SEUS ANTÍDOTOS
POR HPLC-MS/MS.**

VITÓRIA

2016

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ATROPINA E PRALIDOXIMA NA
INTOXICAÇÃO AGUDA POR CLORPIRIFÓS E DESENVOLVIMENTO
DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS E SEUS ANTÍDOTOS
POR HPLC-MS/MS.**

Graziany Leite Moreira Marques

Karla Nívea Sampaio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção de título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Karla Nívea Sampaio.
Coorientador: Dr. Fabrício Souza Pelção.

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M357a Marques, Graziany Leite Moreira, 1983 -
Avaliação da eficácia de atropina e pralidoxima na
intoxicação aguda por clorpirifós e desenvolvimento de
metodologia analítica para identificação e quantificação de
organofosforados e seus antídotos por HPLC-MS/MS / Graziany
Leite Moreira Marques – 2016.
130 f. : il.

Orientador: Karla Nívea Sampaio.
Coorientador: Fabrício Souza Pelicão.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Clorpirifós. 2. Compostos Organofosforados.
3. Terapêutica. 4. Atropina. 5. Compostos de Pralidoxima.
I. Sampaio, Karla Nívea. II. Pelicão, Fabrício Souza.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 615

GRAZIANY LEITE MOREIRA MARQUES

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ATROPINA E PRALIDOXIMA NA
INTOXICAÇÃO AGUDA POR CLORPIRIFÓS E DESENVOLVIMENTO
DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS E SEUS ANTÍDOTOS
POR HPLC-MS/MS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Karla Nívea Sampaio
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFES
Orientadora

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr.^a. Rita Gomes Wanderley Pires
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia – UFES

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua misericórdia e graça; por ter me sustentado e me permitido chegar até este momento.

À Prof.^a Dr.^a Karla Nívea Sampaio por me acolher em seu laboratório apesar das minhas limitações, por sua orientação valiosa e sua resiliência. Algumas lições suas vou levar para a vida!

Ao Dr. Fabrício Souza Pelição pelo aceite desta coorientação, apesar de tantas outras atribuições. Obrigada pela generosidade em dividir um pouco do seu conhecimento.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Bruno Spinosa de Martinis e Dr.^a Rita Gomes Wanderley Pires, por se disponibilizarem em contribuir com o momento da defesa.

À Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Corrêa de Faria por promover meu encontro com a toxicologia forense e com a pesquisa. Obrigada pela inspiração e pela oportunidade.

À FAPES pelo apoio financeiro.

À instituição Polícia Civil pelo convênio firmado junto à Universidade Federal do Espírito Santo, que nos permitiu realizar este trabalho em cooperação com o Serviço de Laboratório Médico-Legal (SLML).

Aos Peritos Bioquímicos Toxicologistas do SLML pelo acolhimento, apoio e paciência, em especial à Dr.^a Josidéia Barreto Mendonça, que além disso, foi fundamental na concretização do convênio.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) pela disponibilização de equipamentos fundamentais à realização do projeto.

À Prof.^a Dr.^a Vanessa Benjamini Harres pelo auxílio em diversos momentos, principalmente nas análises estatísticas do estudo.

Às professoras Daniela Amorim, Cristiane Giuberti e Cláudia Jamal por colaborarem com seus conhecimentos específicos, espaço e equipamentos.

À Luciana Passamani pela ajuda na dosagem da colinesterase plasmática e aos demais conhecimentos transmitidos.

Novamente agradeço à Prof.^a Dr.^a Rita Gomes Wanderley Pires, assim como à aluna Tamara pela generosidade na transmissão de seus conhecimentos quanto à dosagem da acetilcolinesterase cerebral.

À amiga Alciene Siqueira pela companhia em todos os momentos, principalmente, nos experimentos nas madrugadas, nos horários de almoço e noites adentro. Eu não teria conseguido sem sua ajuda.

Ao aluno de iniciação científica, Vitor Sampaio, pela parceria e pela ajuda na execução dos experimentos, sem você e Alciene, eu não conseguiria terminar meus experimentos a tempo.

Aos demais colegas alunos do Mestrado em Ciências Farmacêuticas e do Mestrado em Farmacologia e Bioquímica, os quais represento através do amigo Eduardo, pelo companheirismo e pelas experiências trocadas.

Aos meus pais por serem meu exemplo de persistência e honestidade e aos meus irmãos pelo apoio incondicional. Agradeço à toda minha família, por me apoiar em tudo e por entender minhas ausências ao longo destes dois anos. O seu amor é minha força para prosseguir.

Ao meu marido precioso por seu apoio, compreensão e paciência. Eu não teria chegado até aqui se não tivesse aceitado este desafio junto comigo, se não aceitasse adiar planos, se não quisesse sonhar meus sonhos.

Meu sincero obrigada a todos!

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas Graças a Deus, não somos o que éramos.”

Martin Luther King

RESUMO

Os organofosforados (OFs) são, provavelmente, os praguicidas mais utilizados no mundo. No Brasil, esses compostos são considerados um dos principais responsáveis por intoxicações. Um OF de ampla utilização nacional é o clorpirifós (CPF), que assim como os demais OFs promove a inibição das colinesterases (ChEs), provocando acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas centrais e periféricas. O tratamento dessa intoxicação envolve o uso combinado de antagonistas muscarínicos, como a atropina (ATR); reativadores da ChE, oximas, representadas principalmente pela pralidoxima (2-PAM); e benzodiazepínicos, geralmente diazepam, para tratamento de eventuais convulsões. Entretanto, a eficácia das oximas em humanos é duvidosa, principalmente devido a sua diferença de polaridade quando comparada aos OFs, o que leva a uma pobre penetração do fármaco no sistema nervoso central (SNC). Este trabalho, portanto, visa investigar a eficácia dos antídotos sobre os sinais clínicos e sobre a reativação da atividade das ChEs na intoxicação aguda por CPF, assim como validar método de análise para identificação e quantificação de vários OFs, ATR e 2-PAM, de forma conjunta, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS). Para isso, ratos adultos (n=280) foram divididos em 8 grupos: Salina (SAL), CPF, SAL+ATR, CPF+ATR, SAL+2-PAM, CPF+2-PAM, SAL+ATR+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM. O tratamento com ATR (10mg/kg); 2-PAM (40mg/Kg) ou ATR (10mg/kg) + 2-PAM (40mg/kg) foi realizado por injeções intraperitoneais (i.p.) uma hora após a administração de CPF (30mg/kg; i.p.) ou SAL (0,9%, i.p.) e os animais foram observados quanto aos sinais de toxicidade aguda por até 5 horas. Decorridos períodos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 24 horas após a administração do tratamento (ATR, 2-PAM ou ambos), os animais foram decapitados e amostras de sangue e encéfalo (com exceção do cerebelo) foram coletadas para posteriores dosagens das ChEs, assim como para análise do CPF e CPF-oxon por HPLC-MS/MS. O método desenvolvido para análise de OFs e antídotos se mostrou rápido e eficiente para o que se propõe, atendendo os critérios de validação da RDC nº 27 da ANVISA (BRASIL, 2012). Os dados obtidos demonstram que a concentração de CPF inalterado no sangue sofre intensa queda ao longo das primeiras 24 horas após a administração. O CPF causou

inibição da ChE plasmática e o tratamento com 2-PAM foi capaz de reverter essa inibição por até 1 hora após sua administração. Entretanto, sobre a atividade da AChE cerebral, a 2-PAM promoveu somente uma pequena reativação a partir da segunda hora da sua administração. Apesar de não terem sido completamente eficazes, os tratamentos com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM preveniram ou reverteram, em diferentes níveis, as manifestações colinérgicas típicas da intoxicação por OFs.

Palavras-chave: Clorpirifós, organofosforados, tratamento, atropina, pralidoxima.

ABSTRACT

Organophosphorus insecticides (OP) are probably the most widely used pesticides in the world. In Brazil, these compounds are considered one of the main responsible for poisoning. Chlorpyrifos (CPF), an OP compound highly used, promotes, similarly to other OP, inhibition of the cholinesterases (ChEs) leading to the accumulation of acetylcholine in the central and peripheral cholinergic synapses. The treatment for OP poisoning involves a combination of muscarinic antagonists, such as atropine (ATR); oximes for reactivating the ChEs, mainly represented by the pralidoxime (2-PAM) and benzodiazepines, generally diazepam, for treatment of occasional seizures. However, the effectiveness of oximes in humans is still doubtful, mainly due to the polarity of these compounds, which leads to poor penetration of these drugs into the central nervous system (CNS). Therefore, this study aims to investigate the efficacy of the antidotes adopted in the OP poisoning, over the clinical signs and on the reactivation of the ChEs inhibition induced by the acute poisoning with CPF, as well as validate analytical method for identifying and quantifying various OPs, ATR and 2-PAM, using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Adult male rats (n=280) were divided into 8 groups: saline (SAL), CPF, SAL+ATR, CPF+ATR, SAL+2-PAM, CPF+2-PAM, SAL+ATR+2-PAM and CPF+ATR+2-PAM. The antidotes treatment with ATR (10 mg/kg); 2-PAM (40 mg/kg) or ATR (10mg/kg) +2-PAM (40 mg/kg) was delivered by intraperitoneal injections (i.p.) one hour after the administration of CPF (30 mg/kg, i.p.) or SAL (0.9%, i.p.) and the animals were observed for acute toxicity signs for up to 5 hours. In periods of 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours and 24 hours after the antidotes treatment administration, the animals were decapitated for collecting blood and brain (except cerebellum) samples for measurements of ChEs activity, as well as for CPF and CPF-oxon analysis by HPLC-MS/MS. The method developed for the OPs and antidotes analysis proved to be efficient and fast, attending the validation criteria stated in the RDC nº 27 of ANVISA (BRASIL, 2012). The analysis demonstrates that the CPF blood concentration significantly decreased over the first 24 hours after administration. The CPF caused inhibition of plasma ChE and treatment with 2-PAM was capable of reversing this inhibition for up to 1 hour after administration. However, when

considering the brain AChE the 2-PAM only induced a small reactivation of the enzyme from the second hour of the treatment administration. Although not fully effective, the treatments with ATR, 2-PAM or ATR+2-PAM employed prevented or reverted, at different levels, the typical cholinergic symptoms of the OP poisoning.

Keywords: Chlorpyrifos, organophosphorus, treatment, atropine, pralidoxime.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCh	Acetilcolina
ATR	Atropina
BChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChE	Colinesterase
CPF	Clorpirifós
CPF-oxon	Clorpirifós-oxon
CQ	Controle de qualidade
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250
CV	Coeficiente de variação
CYP	Pigmento celular, do inglês <i>Cytochrome pigment</i>
DFP	Diisopropilfosforofluoridato
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>

i.p.	Intraperitoneal
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas, do inglês <i>Liquid chromatography with mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
OF	Organofosforado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Padrão interno
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SH	Grupo sulfidrílico
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SLML	Serviço de Laboratório Médico Legal
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TCP	3,5,6 Tricloro-2-piridinol
TEPP	Tetraetilpirofosfato
TJs	Junções apertadas, do inglês <i>tight junctions</i>
TMB-4	Trimedoxima
TPP	Trifenilfosfato
TRs	Tempos de retenção
Trp	Receptores de potencial transitório
TrpC	Receptores de potencial transitório canônicos
UV	Ultravioleta
ZO	Zona occludens
2-PAM	Pralidoxima

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 AGROTÓXICOS.....	20
1.2 ORGANOFOSFORADOS	21
1.3 MECANISMO DE TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS.....	22
1.4 CLORPIRIFÓS	26
1.5 TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS.....	27
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS	29
1.7 TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA.....	30
1.8 HIPÓTESES.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 GERAL	34
2.2 ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	36
3.1.1 Animais	36
3.1.2 Tratamentos empregados.....	36

3.1.2.1 Clorpirifós	36
3.1.2.2 Atropina e Pralidoxima	37
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	37
3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	41
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA	42
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL	44
3.6 TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA.....	47
3.6.1 Analitos pesquisados	48
3.6.2 Padrões de referência e padrões internos	49
3.6.3 Procedimento de extração das amostras de sangue	50
3.6.4 Condições cromatográficas e da espectrometria de massas	51
3.6.5 Parâmetros de validação analítica	52
3.6.5.1 Limite de Detecção.....	54
3.6.5.2 Limites de Quantificação	54
3.6.5.3 Especificidade	54
3.6.5.4 Efeito matriz	55
3.6.5.5 Linearidade.....	56
3.6.5.6 Efeito Residual (<i>Carryover</i>)	56
3.6.5.7 Precisão	56
3.6.5.8 Exatidão	59
3.6.5.9 Recuperação	59
3.6.5.10 Estabilidade.....	60
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS.....	63
4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	63
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA	69

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL	72
4.4 VALIDAÇÃO DE TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA	75
4.4.1 Limite de detecção e limites de quantificação.....	77
4.4.2 Especificidade	78
4.4.3 Efeito Matriz	80
4.4.4 Linearidade	81
4.4.5 Efeito residual (<i>Carryover</i>)	86
4.4.6 Precisão	86
4.4.7 Exatidão	88
4.4.8 Recuperação.....	90
4.4.9 Estabilidade	90
4.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO CLORPIRIFÓS E DO CLORPIRIFÓS-OXON.....	91
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÕES.....	106
7. REFERÊNCIAS.....	109
8. ANEXOS	119
8.1 ANEXO 1.....	119
8.2 ANEXO 2.....	120
8.3 ANEXO 3.....	124
8.4 ANEXO 4.....	128
8.5 ANEXO 5.....	129
8.6 ANEXO 6.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação toxicológica dos organofosforados previstos no método analítico.....	49
Tabela 2: Eluição por gradiente utilizada no método analítico.	52
Tabela 3: Valores de CQB, CQM, CQA de cada analito.	58
Tabela 4: Íons de identificação, quantificação e TRs dos analitos.	76
Tabela 5: LD, LIQ e LSQ de cada analito.....	77
Tabela 6: Recuperação média (%) e efeito matriz (%) de cada analito.....	80
Tabela 7: Padrões internos, faixa de linearidade e coeficiente de determinação de cada analito.....	81
Tabela 8: Precisão Intra-ensaio e Inter-ensaio.....	87
Tabela 9: Exatidão Intra-ensaio e Inter-ensaio.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas básicas dos organofosforados	23
Figura 2: Representação da neurotransmissão colinérgica.....	24
Figura 3: Mecanismo de inibição da AChE por OFs.....	25
Figura 4: Biotransformação do clorpirifós gerando metabólito ativo clorpirifós-oxon e demais metabólitos	26
Figura 5: Estruturas químicas da pralidoxima e da atropina.....	27
Figura 6: Protocolo Experimental	40
Figura 7: Representação da reação envolvida na determinação da atividade da ChE plasmática através do método proposto por Dietz et al.,1973.....	43
Figura 8: Representação da reação envolvida na determinação da atividade da AChE cerebral, de acordo com método descrito por Ellman e colaboradores (1961)	44
Figura 9: Curva de calibração para quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	46
Figura 10: Fórmulas estruturais dos analitos previstos na técnica de análise.....	48
Figura 11: Fórmulas estruturais dos padrões internos utilizados na técnica de análise..	50
Figura 12: Média de intensidade do sinal clínico ataxia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM.	63
Figura 13: Média de intensidade do sinal clínico tremor apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	64
Figura 14: Média de intensidade do sinal clínico tetania apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM.	65

Figura 15: Média de intensidade do sinal clínico micção apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM.	66
Figura 16: Média de intensidade do sinal clínico diarreia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	67
Figura 17: Média de intensidade do sinal clínico sialorreia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	68
Figura 18: Média de intensidade do sinal clínico lacrimejamento apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	68
Figura 19: Atividade da colinesterase plasmática de ratos salina (SAL) e clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	70
Figura 20: Atividade da acetilcolinesterase cerebral de ratos salina (SAL) e clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM..	73
Figura 21: Cromatograma de uma amostra de sangue total adicionada dos analitos de interesse e padrões internos na concentração correspondente ao controle de qualidade médio (CQM).	79
Figura 22: Curvas de calibração de acefato, atropina, pralidoxima e metamidofós. .	82
Figura 23: Curvas de calibração de azinfós, clorpirifós, dimetoato e etiona.....	83
Figura 24: Curvas de calibração de malationa, metidationa, ometoato e pirimifós....	84
Figura 25: Curvas de calibração de profenofós e pirazofós.	85
Figura 26: Curva de calibração do clorpirifós oxon.	85
Figura 27: Cromatograma de uma amostra de sangue total coletada dos animais do grupo intoxicado com CPF adicionada do padrão interno TPP.....	91
Figura 28: Concentração de CPF no sangue de ratos tratados agudamente com CPF 30 mg/Kg e decapitados nos tempos preconizados.	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas ou biocidas são termos utilizados para designar produtos químicos utilizados na produção agrícola, nas pastagens, na proteção de florestas e de outros ecossistemas, assim como de ambientes urbanos, hídricos e industriais, com o objetivo de preservar fauna ou flora da ação danosa de outros seres vivos (BRASIL, 1989). Essas substâncias podem ainda ser dessecantes, desfolhantes ou interferir no crescimento de plantas (BRASIL, 1989). São muito importantes no controle de vetores de doenças, além de contribuírem na prevenção da perda de cultura de alimentos devido à ação de pragas (CALDAS; SOUZA, 2000).

Os agrotóxicos se diferenciam quanto a finalidade do uso e quanto à sua eficácia frente às diferentes pragas, podendo ser classificados, basicamente, como inseticidas, fungicidas, rodenticidas, herbicidas, acaricidas, moluscicidas, larvicidas e pediculicidas (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014; O'MALLEY, 1997).

Apesar dos benefícios e de sua ampla gama de aplicações, esses produtos têm sido fontes de riscos para a saúde dos seres humanos em todo o mundo (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007). O Brasil é considerado um dos líderes mundiais no consumo de agrotóxicos (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Como consequência, também possui alta incidência de intoxicações associadas a essas substâncias (SINITOX, 2012). No ano de 2012, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) classificou os agrotóxicos, como os principais agentes envolvidos em casos de óbitos relacionados a intoxicações, na maioria das regiões brasileiras, o que confirma o perigo potencial da exposição a esses compostos (SINITOX, 2012).

Essas intoxicações estão relacionadas, principalmente, a inseticidas carbamatos e organofosforados (OFs), fungicidas de ditiocarbamato, herbicidas e organoclorados (DELGADO; PAUMGARTTEN, 2004; YE et al., 2013). No entanto, a maior

porcentagem dessas intoxicações é atribuída, aos OFs, principalmente em episódios de intoxicações agudas (ROBERTS; AARON, 2007).

1.2 ORGANOFOSFORADOS

Os primeiros compostos OFs foram preparados por alquimistas na Idade Média, entretanto seu estudo aprofundado se deu por Lassaigne em 1820, com a esterificação do ácido fosfórico (TOY *apud* SANTOS et al., 2007). Em 1845, Thnard e colaboradores foram responsáveis pela preparação de uma série de derivados de fosfinas (TOY *apud* SANTOS et al., 2007).

A primeira síntese de um OF foi realizada no meio do século XIX por Moschnine no laboratório do Professor Wurtz em Paris (KARCZMAR *apud* ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007). O primeiro OF sintetizado foi o tetraetilpirofosfato (TEPP) e o processo foi publicado pela primeira vez em 1854 por Phillipe de Clermont (KARCZMAR *apud* ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007).

Gerhard Shrader e colaboradores foram os primeiros a sintetizarem OFs tipo éster, como o paraoxon e o paration (KARCZMAR *apud* ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007). Em 1935, a Alemanha nazista, já vislumbrando a 2ª Guerra Mundial, viu nos OFs desenvolvidos por Shrader, potenciais agentes que poderiam ser utilizados na guerra química (KARCZMAR *apud* ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007). Foi desenvolvido então o diisopropilfosforofluoridato (DFP), assim como vários compostos como tabun (GA), sarin (GB) e soman (GD) a fim de serem usados como agentes neurotóxicos (KARADE et al., 2014). Esses agentes são considerados os mais perigosos agentes químicos de guerra devido a sua alta toxicidade aguda (KASSA; SEPSOVA; TUMOVA, 2014).

Após a Segunda Guerra Mundial, os OFs foram reintroduzidos em todo o mundo para uso como agrotóxicos, como inicialmente previsto (ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007), substituindo os organoclorados devido a sua eficácia e não persistência no meio ambiente (MARRS, 1993). Atualmente, os OFs são utilizados, principalmente, como inseticidas, largamente utilizados na agricultura (MARRS, 1993).

Apesar da ampla gama de benefícios na agricultura e no controle de vetores, a utilização indiscriminada dos OFs contribuiu para que seus malefícios fossem percebidos, a ponto de seu uso ser amplamente restringido em todo o mundo (KARADE et al., 2014; WOREK; THIERMANN, 2013). Entretanto, essa classe de agrotóxicos ainda permanece em uso nos países em desenvolvimento, devido a sua alta eficácia e baixo custo, de modo que o envenenamento por OFs nesses países constitui em potencial causa de mortalidade (KARADE et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 3 milhões de pessoas estão voluntariamente ou acidentalmente intoxicando-se com esses compostos todos os anos, sendo que cerca de 250.000 evoluem a óbito (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Estima-se uma incidência de cerca de 200.000 casos de auto envenenamentos por ano somente em países em desenvolvimento (NURULAIN et al., 2014).

1.3 MECANISMO DE TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS

O grau de intoxicação por OFs varia muito de acordo com a via de exposição, sendo bem absorvidos através da pele, do trato gastrointestinal, da conjuntiva e das vias respiratórias (KWONG, 2002).

Outro fator que interfere na intensidade da intoxicação diz respeito à estrutura química do agente (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Estruturalmente, esses compostos são ésteres ou tióis derivados do ácido fosfórico, ácido fosfônico, ácido fosfínico ou fosforamídico que possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente, com grupos arila ou alquila ligados diretamente ao fósforo ou através de um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfinatos, fosfatos, fosforotioatos, fosfonotioatos e fosfonatos (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011; SANTOS et al., 2007) conforme Figura 1.

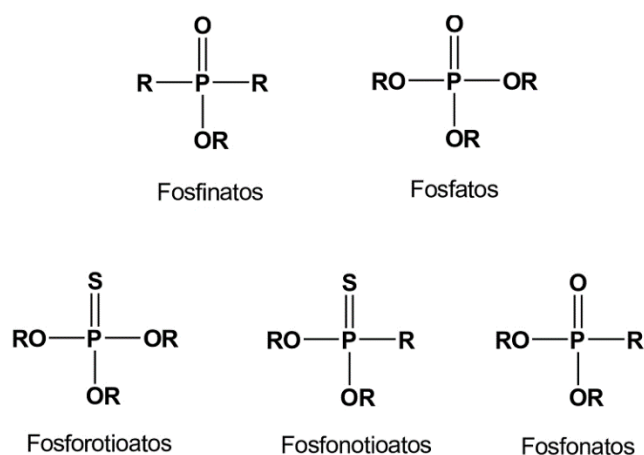


Figura 1: Estruturas básicas dos organofosforados. Fonte: Adaptado de PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011.

A ação tóxica dos OFs se deve, principalmente, à inibição das colinesterases (ChEs), em especial, da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE) (AMITAI et al., 1998; KWONG, 2002). Essas enzimas se diferenciam por sua localização no organismo, substrato, especificidade e função (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

A BChE ou pseudocolinesterase está presente no plasma e é sintetizada pelo fígado (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Além de ser encontrada no próprio fígado, esta enzima também está presente em outros locais como pulmões, coração e sistema nervoso central (SNC) (BONO et al., 2015; CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Seu papel fisiológico ainda não está bem esclarecido, entretanto, parece estar relacionada à hidrólise dos fármacos succinilcolina e ácido acetilsalicílico, da cocaína e do hormônio grelina, mostrando um papel fisiológico importante para essa enzima, com potenciais implicações em humanos (CHEN et al., 2015; VOICU et al., 2010a). A BChE possui grande importância no diagnóstico da intoxicação por OFs, por ser utilizada como marcador da intoxicação quando dosada no plasma (EATON et al., 2008).

A AChE está presente no SNC, sistema nervoso periférico (SNP), junção neuromuscular e eritrócitos (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014). Seu papel é realizar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, finalizando assim, a sinalização nas sinapses colinérgicas, conforme

demonstrado na Figura 2 (KWONG, 2002; MCHARDY et al., 2014; SANTOS et al., 2007).

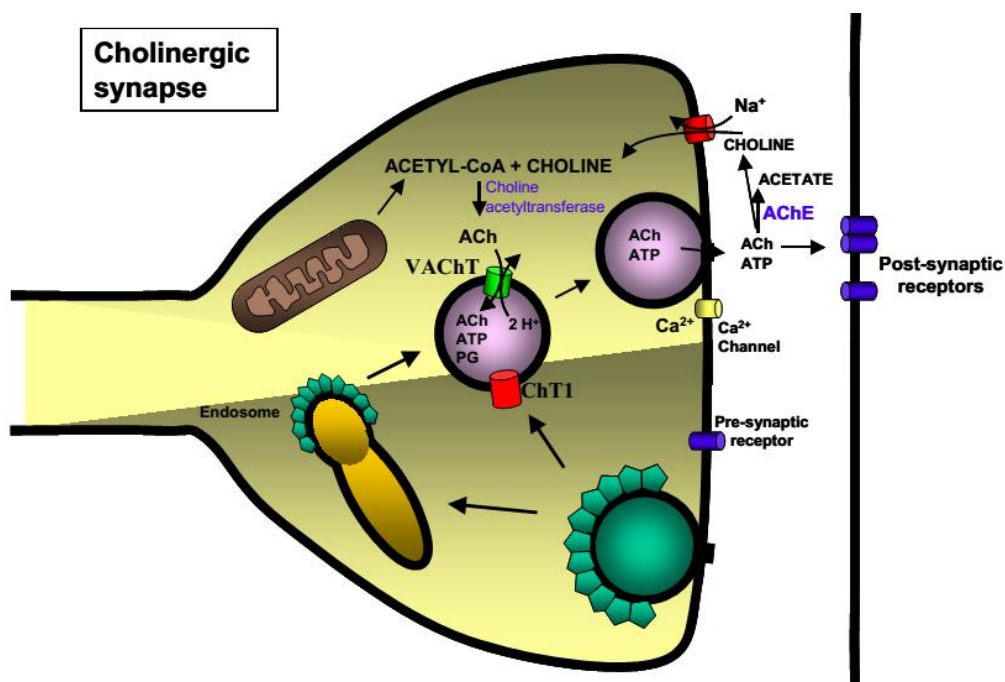


Figura 2: Representação da neurotransmissão colinérgica. Fonte: Adaptado de MARTINS SILVA, 2008.

A ACh é encontrada, principalmente, nos gânglios do sistema nervoso simpático e parassimpático, nas junções neuromusculares esqueléticas, nas terminações pós-ganglionares dos nervos parassimpáticos e em diversas terminações nervosas no SNC e o seu acúmulo nas sinapses, promove excesso de ativação dos receptores colinérgicos, desencadeando efeitos tóxicos característicos (CANNARD, 2006; KASSA; SEP SOVA; TUMOVA, 2014).

A inibição da AChE é o mecanismo de toxicidade primário dos OFs e se dá através da formação de uma ligação covalente entre o resíduo de serina do sítio ativo da AChE e o átomo de fósforo do OF, de forma irreversível (KARADE et al., 2014; NURULAIN et al., 2014). Após à formação do complexo OF-AChE, a AChE pode sofrer um processo espontâneo, tempo-dependente, chamado "envelhecimento enzimático", que consiste na quebra da ligação oxigênio-alquil, do fósforo conjugado do OF, através de uma desalquilação espontânea, resultando em um complexo aniônico bastante estável, conforme representado na Figura 3 (CARLETTI et al., 2008; SANTOS et al., 2007).

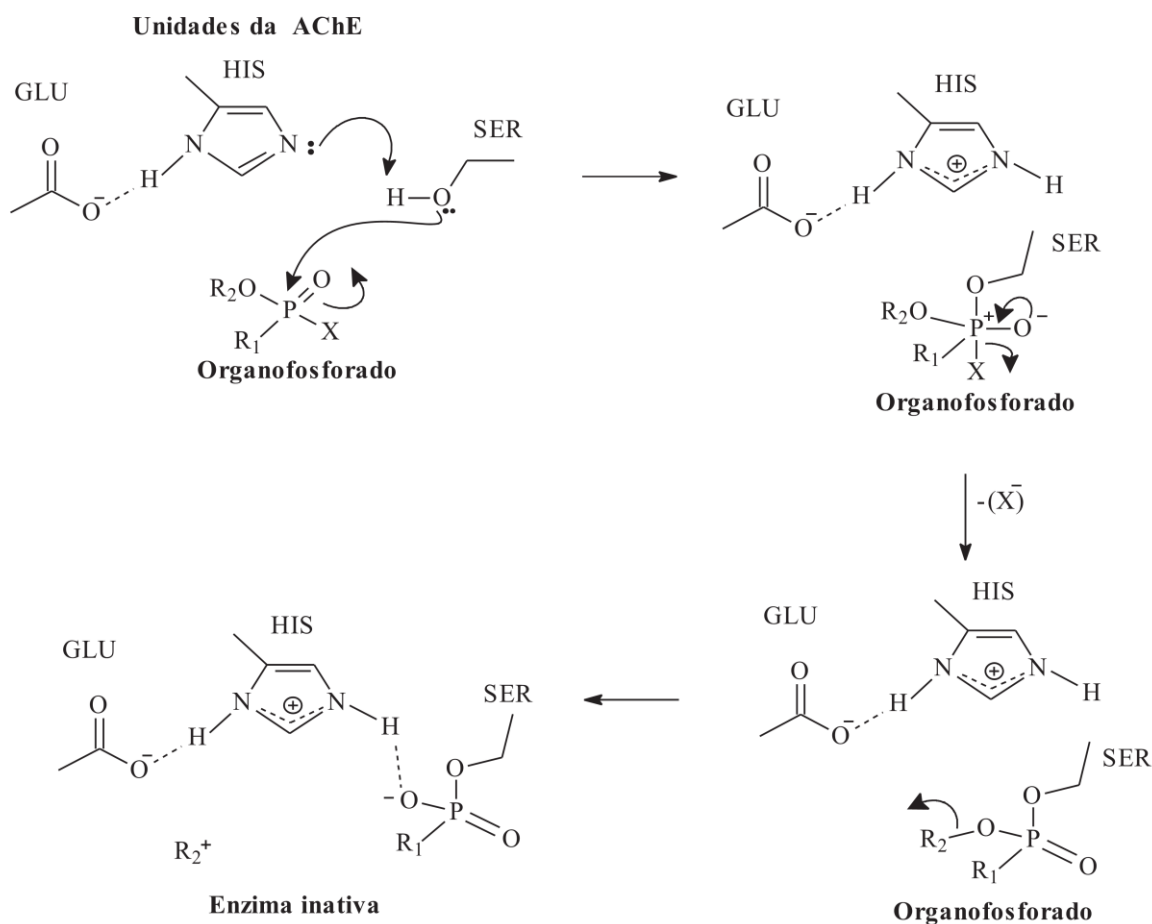


Figura 3: Mecanismo de inibição da AChE por OFs. Fonte: SANTOS et al., 2007

Os sintomas observados na intoxicação aguda por OFs podem ser divididos de acordo com o receptor colinérgico envolvido e sua localização no tecido nervoso (CLARK, 2006; MALLEY, 1997). Os sintomas que envolvem os receptores nicotínicos neuroniais (N_n) no SNC incluem ansiedade, agitação, ataxia, confusão e coma, enquanto que a hiperestimulação dos receptores nicotínicos musculares (N_m) a nível periférico pode desencadear fraqueza muscular, fasciculação, tremor, paralisia, hipertensão, taquicardia e parada cardiorrespiratória (CLARK, 2006; MALLEY, 1997). No entanto, são as manifestações muscarínicas, devido à superestimulação principalmente de receptores tipo M_2 e M_3 , as mais características da intoxicação, e incluem, salivação, lacrimejamento, micção e defecação involuntárias, vômitos, diarreia, cólicas abdominais, sialorreia, sudorese, broncoconstrição, broncorreia, hipertensão e bradicardia (CLARK, 2006; KWONG, 2002; MALLEY, 1997).

1.4 CLORPIRIFÓS

O clorpirifós (CPF) [0,0-dietil-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosforotioato], comercializado sob o nome Lorsban 480 BR[®], Fersol 450 EC[®] e Dursban[®], dentre outros, é um dos OFs mais utilizados no mundo (CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010). Trata-se de um produto altamente tóxico, (toxicidade classe II) segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2015a).

A toxicidade do CPF está em grande parte associada à sua metabolização hepática via citocromo P450, que através de uma reação de dessulfuração oxidativa, gera como metabólito ativo, o clorpirifós-oxon (CPF-oxon), conforme pode ser observado na Figura 4 (CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010).

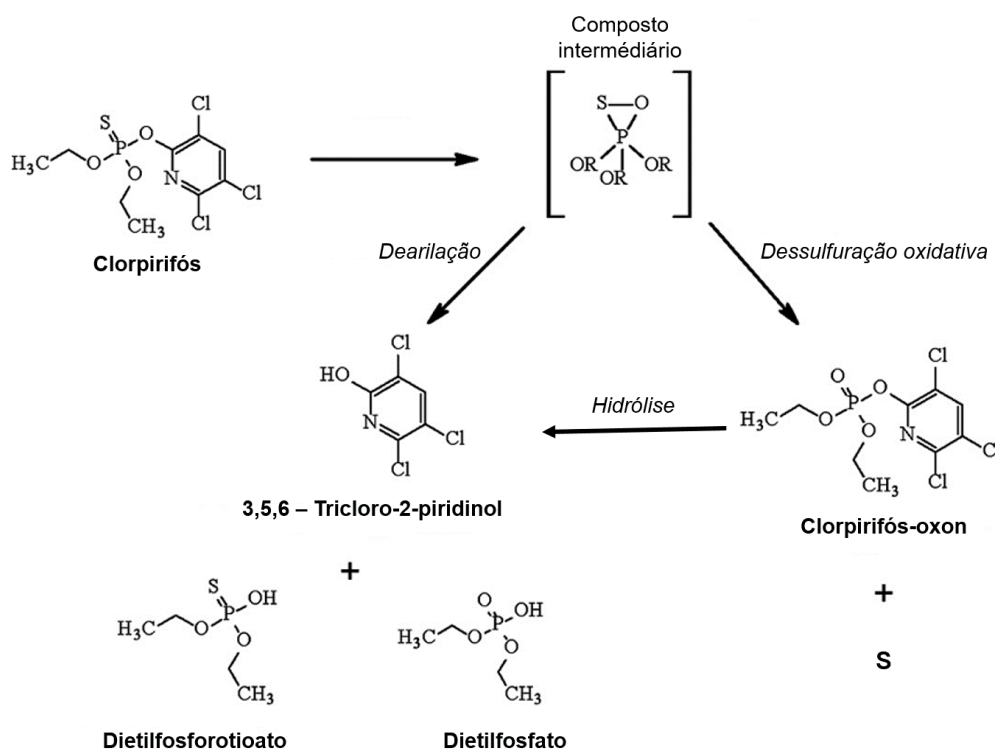


Figura 4: Biotransformação do clorpirifós gerando metabólito ativo clorpirifós-oxon e demais metabólitos. Fonte: Adaptado de CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010.

O padrão de manifestações clínicas observado em decorrência da inibição enzimática envolvida, incluem síndromes colinérgicas, desordens no SNC e desordens cardiovasculares (WANG et al., 2014). As manifestações cardiovasculares estão

A ação periférica desse fármaco tem por objetivo antagonizar os efeitos da hiperestimulação parassimpática decorrente do excesso de ACh presente nas fendas sinápticas, atenuando, principalmente, a secreção traqueobrônquica e salivar, broncoconstrição, miose, hipermotilidade gastrointestinal e bradicardia (LALLEMENT et al., 1997; WANG et al., 2014).

Já os reativadores de ChEs são os únicos antídotos capazes de atuar diretamente na causa da intoxicação, usados contra os OFs (NURULAIN et al., 2014). São capazes de realizar um ataque nucleofílico no fósforo do OF e deslocá-lo para fora da serina da AChE reativando-a, antes que ocorra o envelhecimento da enzima (SINGH et al., 2007).

As oximas são compostos quaternários de mono ou bi-piridinas que transportam o grupo hidroximinometil como agente nucleófilo e incluem a 2-PAM, a trimedoxima (TMB-4), a HI-6 e a obidoxima (KARADE et al., 2014). No entanto, apesar de terem sido desenvolvidas com base no conhecimento do mecanismo básico de toxicidade aguda dos OFs, a prática clínica e estudos recentes demonstram que sua eficácia é limitada (ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007; KASSA; SEPSOVA; TUMOVA, 2014; WOREK; THIERMANN, 2013).

Nos Estados Unidos, a oxima de escolha é a 2-PAM, que foi a primeira oxima disponibilizada clinicamente para o tratamento da intoxicação por OFs e ainda é recomendada pela OMS, inclusive no caso de intoxicação pelo CPF (ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007; SINGH et al., 2007). No Brasil, a 2-PAM está prevista na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) na forma de mesilato de pralidoxima 200 mg (pó para solução injetável), constando do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2015b).

As diferentes estruturas dos OFs existentes e sua ligação com as diferentes enzimas ChEs, resultam em variação de eficácia de reativação de 2-PAM e outras oximas (KARADE et al., 2014). Considerando essa variabilidade e a inexistência de um reativador de amplo espectro, supõe-se que cada OF necessitaria de um reativador de ChE específico (KARADE et al., 2014). Diante dessa problemática, o desenvolvimento de novos reativadores ou a introdução de outros tratamentos têm sido estudados (SOUKUP et al., 2011). As indústrias farmacêuticas vem desenvolvendo novas oximas a fim de aprimorarem sua eficácia, mas, até o momento,

nenhuma possui amplo espectro contra todos os OFs (ANTONIJEVIC; STOJILJKOVIC, 2007).

Quimicamente, as oximas possuem o inconveniente de possuírem uma carga positiva permanente (nitrogênio quaternário), elevando sua polaridade e dificultando sua passagem pela barreira hematoencefálica (BHE), diminuindo sua eficácia na reativação da AChE no SNC (MERCEY et al., 2012).

Inversamente às oximas, o CPF e demais OFs são compostos pouco polares, que possuem, portanto, grande facilidade em atingir o SNC, sendo que sua toxicidade pode estar relacionada justamente a sua ação neste local (RISHER; NAVARRO, 1998). A baixa taxa de penetração da 2-PAM através da BHE, em contraste à alta lipofilicidade dos OFs pode explicar, em parte, a baixa eficácia desse tratamento.

Percebe-se, portanto, que a utilidade das oximas na rotina de tratamento de pacientes intoxicados com OFs como o CPF ainda é cercada por muitas dúvidas, visto que alguns estudos clínicos demonstraram a falha de seus efeitos benéficos diante da intoxicação por OFs (KUCA ET AL., 2007).

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

Considerando que o mecanismo de ação do CPF e demais OFs envolve a inibição das ChEs, a determinação da atividade dessas enzimas pode corroborar para o diagnóstico da intoxicação. De fato, esse ensaio é utilizado como padrão-ouro para determinação da inibição da enzima na intoxicação por OFs (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

Em uma intoxicação severa, as determinações das atividades da AChE e da BChE podem ser usadas para a monitorização da intoxicação (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014; EATON et al., 2008). A determinação da atividade dessas enzimas é usada como marcador de exposição, diagnóstico, monitoramento e prognóstico de casos de intoxicação por agentes anticolinesterásicos (EATON et al., 2008).

Desse modo, estudos experimentais para a avaliação das atividades de BChE e AChE na exposição aguda ao CPF, podem fornecer informações valiosas sobre os efeitos tanto do toxicante quanto dos antídotos empregados no tratamento.

1.7 TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA

Diante de uma real intoxicação por OFs, a identificação do agente causador em sangue ou tecidos é importante (1) para a elaboração de uma terapêutica adequada, no caso de indivíduos vivos e (2) para a elucidação da causa da morte em cadáveres. No campo experimental, o desenvolvimento de técnicas de análise de OFs e seus antídotos é importante para que se possa investigar a ação do agente tóxico, assim como possibilitar a definição da relação entre as concentrações de OFs em amostras biológicas e a gravidade de suas manifestações clínicas (INOUE et al., 2007). Os dados obtidos são importantes na obtenção de diagnósticos mais precisos, assim como para a avaliação dos tratamentos clínicos (INOUE et al., 2007).

A análise de amostras biológicas geralmente envolve uma etapa de pré-tratamento da amostra (extração) para sua posterior análise por técnicas analíticas específicas, frequentemente a cromatografia (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A extração se faz necessária devido, principalmente, à complexidade das matrizes biológicas nas quais se encontram os compostos a serem analisados, à existência de proteínas incompatíveis com as colunas cromatográficas e à baixa concentração dos analitos nessas matrizes (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Técnicas de extração comumente utilizadas incluem: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração de fase sólida, microextração em gota única, microextração de fase líquida com fibra oca, microextração líquido-líquido dispersiva e extração por líquidos iônicos (ATAPATTU; ROSENFELD, 2013).

Após o tratamento da amostra, técnicas analíticas devem ser utilizadas na identificação e quantificação dos compostos de interesse. Dentre essas técnicas, destaca-se a cromatografia, em especial, a cromatografia líquida de alta eficiência, mais conhecida no meio científico como HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*. Trata-se de uma técnica muito empregada na atualidade e capaz de

separar misturas com grande número de compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007). As vantagens da HPLC incluem a possibilidade de realizar análises quantitativas de uma grande variedade de compostos de diferentes polaridades e, por vezes, bastante similares entre si, rapidez, além da alta resolução, eficiência, boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, o que não é possível com a cromatografia gasosa (TONHI et al., 2002).

A HPLC pode ser utilizada acoplada a um espectrômetro de massas (MS, do inglês *mass spectrometer*) para detecção e identificação dos elementos presentes na amostra (ARDREY, 2003). A espectrometria de massas é utilizada para identificar os elementos presentes em amostras de interesse e determinar suas concentrações (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Trata-se de um instrumento que produz íons e os separa de acordo com suas razões massa/carga (m/z) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

No caso de substâncias com diferentes características físico-químicas, a utilização de uma eluição com programação de gradiente na HPLC-MS/MS se apresenta como a melhor alternativa metodológica para separação, identificação e quantificação conjunta desses compostos (LORKE et al., 2008).

De fato, vários estudos já se propuseram a analisar OFs através de diversas técnicas de extração e de cromatografia. Alguns estudos utilizaram a extração em fase sólida, extração em fase sólida com headspace ou extração líquido-líquido em associação à cromatografia gasosa (BRZAK et al., 1998; MUSSHOF; JUNKER; MADEA, 2002; NAMERA; YASHIKI; NAGASAWA, 1997; PAPOUTSIS et al., 2012; RAPOSO et al., 2010; TSOUKALI et al., 2004, 2005). Outros estudos utilizaram para o tratamento da amostra, a extração em fase sólida ou extração líquido-líquido seguida de análise por HPLC com diferentes detectores (BEIKE et al., 2002; DAVIS et al., 2013; GUTIÉRREZ VALENCIA; GARCÍA DE LLASERA, 2011; INOUE et al., 2007; ODETOKUN et al., 2010; SALM et al., 2009; SHARMA et al., 1990).

Na literatura, também são encontrados métodos de análise e quantificação de oximas por HPLC-MS (ABBARA et al., 2008; PETROIANU et al., 2007; SINGH et al., 2007; TEKES et al., 2006).

Esses estudos diferem, portanto, basicamente, quanto ao tipo de amostras, dos analitos pesquisados, do modo de extração e do aparato de análise instrumental

utilizado (ABBARA et al., 2008; BEIKE et al., 2002; DAVIS et al., 2013; GUTIÉRREZ VALENCIA; GARCÍA DE LLASERA, 2011; INOUE et al., 2007; ODETOKUN et al., 2010; PETROIANU et al., 2007; SALM et al., 2009; SHARMA et al., 1990; SINGH et al., 2007; TEKES et al., 2006).

Todavia, a despeito da existência de métodos de análise já desenvolvidos, não foi identificado nenhum estudo até o momento que tenha desenvolvido um método para identificação simultânea de 12 OFs, ATR e 2-PAM em amostras biológicas.

1.8 HIPÓTESES

Considerando a alta polaridade da 2-PAM e sua dificuldade em atravessar a BHE, este estudo tem como hipótese a impossibilidade da 2-PAM reativar a AChE cerebral em intoxicações agudas causadas por CPF, e que por consequência, o tratamento preconizado envolvendo reativadores de ChE e antagonistas muscarínicos não é eficaz na prevenção e reversão das manifestações colinérgicas típicas da intoxicação causada pelo CPF.

Considerando ainda a inexistência de técnica de análise conjunta entre OFs e antídotos, este estudo tem como hipótese que é possível se realizar a validação de uma técnica única para a análise de vários OFs, assim como de ATR e 2-PAM, utilizando o HPLC-MS/MS.

Este estudo servirá, portanto, como ferramenta para ampliar o conhecimento acerca da eficácia dos antídotos ATR e 2-PAM nas intoxicações agudas causadas pelo CPF.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a eficácia dos antídotos (ATR e 2-PAM) sobre os sinais clínicos e sobre a atividade da ChE em sangue e cérebro de ratos, diante de uma intoxicação aguda por CPF, assim como validar método para análise simultânea de OFs, ATR e 2-PAM em sangue de ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os sinais de toxicidade aguda em animais intoxicados com CPF com e sem o emprego do tratamento com ATR e 2-PAM.
- Avaliar a atividade da ChE plasmática e da AChE cerebral em ratos intoxicados agudamente com CPF com e sem o emprego do tratamento com ATR e 2-PAM.
- Validar método de análise e quantificação conjunta de OFs e dos antídotos ATR e 2-PAM em sangue de ratos.
- Identificar e quantificar o CPF e o CPF-oxon no sangue de ratos utilizando a metodologia desenvolvida.

***MATERIAIS E
MÉTODOS***

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados 280 ratos Wistar machos adultos, com peso médio entre 300 e 350 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e mantidos em número máximo de 5 por gaiola de polipropileno, com controle de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e com ração e água livremente disponíveis.

Todos os ensaios biológicos respeitaram as normas de proteção aos animais e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES), sob Protocolo n° 056/2014 (Anexo 1).

3.1.2 Tratamentos empregados

3.1.2.1 Clorpirifós

O CPF foi utilizado na indução da intoxicação. A solução de trabalho do CPF (Lorsban 480 BR[®], 48% m/v, Dow Agrosiences Industrial Ltda) foi preparada adicionando-se 625 µL do composto na forma comercial Lorsban[®] 480BR em 10 mL de solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9%) qsp, de forma a obter solução a 30 mg/mL.

Esta diluição foi realizada, tendo como base estudos previamente realizados, onde foi adotada a dose de 30 mg/kg de CPF para a indução da intoxicação por administração intraperitoneal (i.p.) (CUNHA, 2014). A administração do CPF foi feita em injeções únicas de 1 mL/kg de peso corporal do rato e os animais dos grupos controle receberam somente o veículo (solução fisiológica) nas mesmas condições.

No intuito de evitar variações na concentração por possível evaporação de solventes ou degradação do composto, a solução de tratamento foi preparada e utilizada no mesmo dia.

A escolha do CPF em grau comercial, para tratamento dos animais, justifica-se por mimetizar, em certo grau, a condição de intoxicação observada em humanos e, portanto, permitir a extrapolação dos resultados observados neste projeto para entender os efeitos observados na clínica.

3.1.2.2 Atropina e Pralidoxima

A ATR (Sulfato de atropina, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) e a 2-PAM (metocloreto de 2-piridina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizadas no tratamento da intoxicação provocada pelo CPF. Com base em sua utilização na clínica e no estudo anterior foi adotada a dose de 40 mg/kg de 2-PAM e de 10 mg/kg de ATR administradas 1 (uma) hora após a intoxicação (KOSE et al., 2009).

Para preparação da solução de ATR, 51,5 mg da droga foram diluídos em 5 mL de solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9%) em balão volumétrico com capacidade para 5 mL, de forma a obter solução a 10 mg/mL.

Para preparação da solução de 2-PAM, 206 mg da droga foi diluída em 5 mL de solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9%) em balão volumétrico com capacidade para 5 mL, de forma a obter solução a 40 mg/mL.

A administração de ATR e 2-PAM foi realizada em injeções únicas de 1 mL/kg de peso corporal do rato, por via intraperitoneal.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os 280 animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos de tratamento e grupo controle. O efeito do CPF, da salina (SAL) e do tratamento proposto na clínica ATR e 2-PAM, foram avaliados em oito grupos experimentais conforme descrito a seguir: I) SAL (n =35); II) CPF (n=35); III) SAL+ATR (n=35); IV) CPF + ATR (n=35); V) SAL+2-

PAM (n=35); VI) CPF+2-PAM (n=35); VII) SAL + ATR + 2-PAM (n=35); VIII) CPF + ATR + 2-PAM (n=35).

Os animais dos grupos tratados com CPF ou SAL receberam o agrotóxico na dose de 30 mg/kg ou volume equivalente de SAL (0,9%), respectivamente e foram acompanhados por 1 hora quanto aos sinais e sintomas de toxicidade aguda. Após esse tempo foram administrados os tratamentos com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM nos respectivos grupos (IV, VI e VIII para os animais tratados com CPF e III, V e VII para os animais tratados com SAL).

O intervalo de 1 hora entre a intoxicação e a administração dos tratamentos foi adotado baseado no estudo de Cunha (2014) no qual foi observado que os animais expostos ao CPF manifestavam os primeiros sinais de intoxicação em torno de 1 hora após a exposição.

Os animais foram monitorados quanto à toxicidade aguda, conforme metodologia descrita por Salazar (2011) com adaptações, por período máximo de 5 horas.

As amostras de sangue foram coletadas em diferentes tempos após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM ficando assim constituídos os diferentes subgrupos em função do tempo: 15 minutos. (n=5); 30 minutos. (n=5); 1 hora (n=5); 2 horas (n=5); 3 horas (n=5); 4 horas (n=5) e 24 horas (n=5).

Após o tempo preconizado para cada subgrupo, os animais foram mortos por decapitação para coleta das amostras de sangue e cérebro. Os animais foram mortos sem o uso de anestésicos, uma vez que evidências apontam para a interferência de anestésicos sobre a atividade da AChE (GOMEZ; GOMEZ; PRADO, 2000; PASTUSZKO, 1980; SILVA et al., 2005; VALADÃO et al., 2013; VAN RIJN et al., 2011).

Uma amostra de sangue do tronco foi coletada em microtubo plástico heparinizado para dosagem da ChE plasmática e outra foi coletada em tubo contendo EDTA + fluoreto de sódio em volume de aproximadamente 4 mL para análises por HPLC-MS/MS.

As amostras de cérebro foram coletadas mediante a exposição da calota craniana a baixas temperaturas. Após a retirada do encéfalo, foi realizada a remoção do cerebelo, que foi desprezado, e o conjunto cérebro e tronco encefálico foi dividido em duas

partes simétricas, que foram acondicionadas em microtubos plásticos e imediatamente congeladas. Uma parte simétrica do tecido foi utilizada na dosagem da AChE cerebral e outra foi armazenada.

Todas as amostras biológicas foram mantidas em ultrafreezer a -80°C até o momento da análise.

O sangue coletado em microtubo plástico heparinizado foi submetido à centrifugação a 1.792 G por 10 minutos a 4°C , utilizando uma microcentrífuga (SL-5AM[®] - Spinlab Scientific, Coréia do Sul) e o plasma obtido foi armazenado até o momento da dosagem, em temperatura de -80°C .

As atividades enzimáticas plasmáticas foram testadas através do método de Dietz e colaboradores (1973) conforme anteriormente descrito. As amostras que sofreram hemólise ou que não foram possíveis de serem coletadas em quantidade suficiente foram descartadas.

As amostras de sangue coletadas em tubo EDTA e fluoreto de sódio foram processadas de acordo com a técnica desenvolvida em HPLC-MS/MS anteriormente descrita.

As amostras dos tecidos cerebrais foram extraídas e a dosagem da ChE cerebral foi realizada pelo método de Ellman e colaboradores (1961), com quantificação de proteínas pelo Método de Bradford ambos descritos anteriormente (BRADFORD, 1976).

A figura 6 representa o protocolo adotado neste estudo.

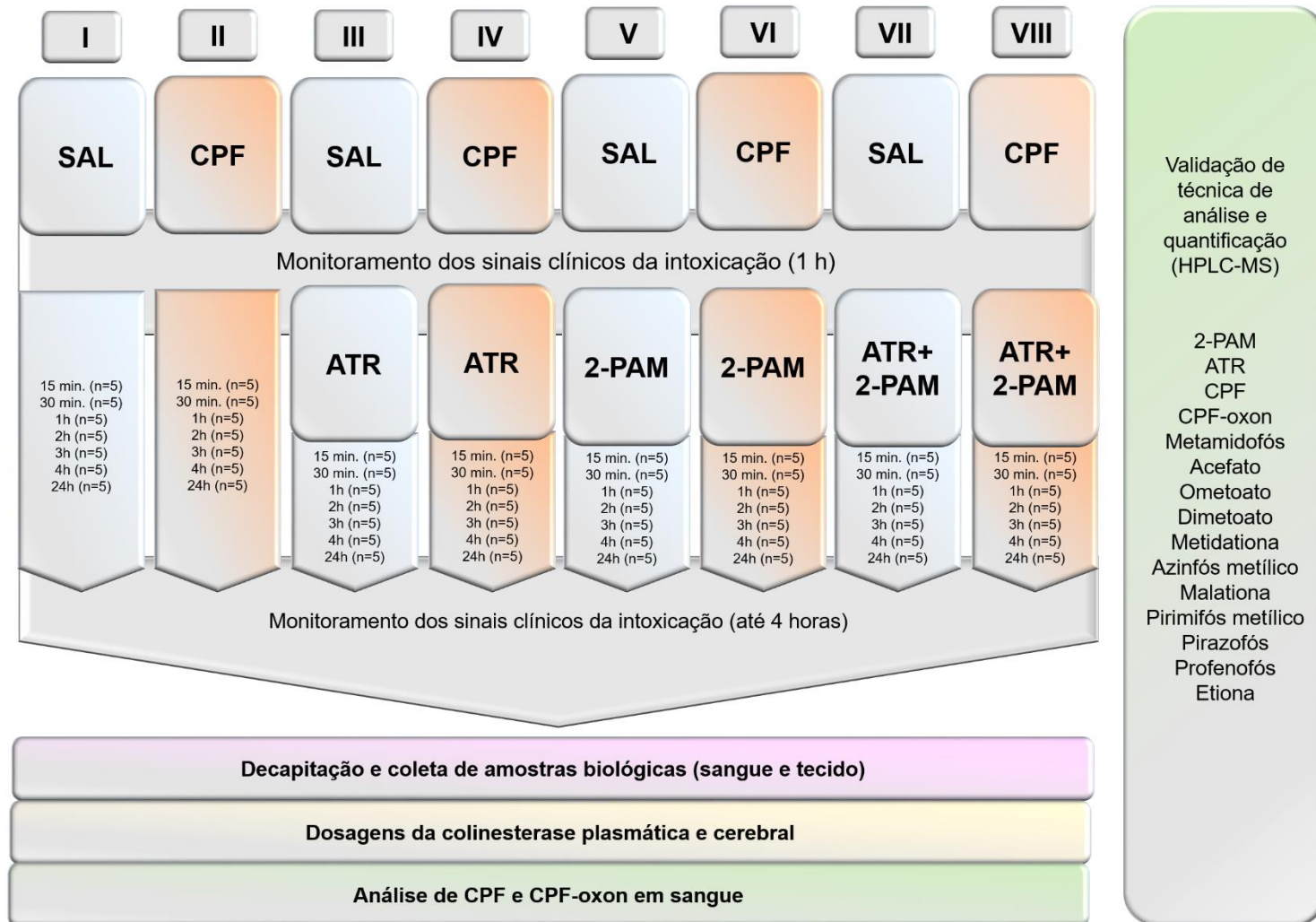


Figura 6: Protocolo Experimental

3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O ensaio de toxicidade aguda seguiu metodologia descrita por Salazar (2011) com adaptações.

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas de polipropileno e observados por até 5 horas. Os eventos foram registrados em intervalos pré-determinados. Essa observação se deu quanto à detecção das prováveis manifestações colinérgicas decorrentes da intoxicação com OFs: ataxia, tremores, tetania, lacrimejamento, micção, diarreia, sialorreia ou morte. Cada sinal clínico registrado recebeu uma pontuação, em uma escala de 0 a 4, onde 0 = ausência; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso e 4 = muito intenso.

Ao avaliar o parâmetro ataxia, foi verificado se os animais apresentavam perda da capacidade em coordenar os movimentos durante a marcha (SALAZAR, 2011).

Para avaliação da tetania, foi observado se os animais apresentavam manifestações musculares bruscas, como espasmos; e quando analisado o parâmetro tremores, foi verificado se os animais apresentavam movimentos musculares involuntários, rítmicos, envolvendo movimentações oscilatórias de uma ou mais partes do corpo (SALAZAR, 2011).

Quando verificados os parâmetros lacrimejamento e salivação, foi analisado se os animais apresentavam secreção lacrimal abundante ou salivação abundante, respectivamente, nitidamente diferentes do normal (SALAZAR, 2011).

Quanto ao parâmetro micção, foi verificado a frequência de micções; já quanto ao parâmetro diarreia, foi verificado se os bolos fecais dos animais, encontravam-se inconsistentes e/ou se houve aumento do número de evacuações (SALAZAR, 2011).

O quadro 1 exhibe o modelo de relatório que foi utilizado para o registro desses sinais durante os testes.

Quadro 1: Quadro para coleta de dados de ensaios de toxicidade aguda

Parâmetros	0 min. (CPF ou SAL)	10 min.	30 min.	45 min.	1 h (ATR ou 2-PAM ou ATR+2-PAM)	1h 15 min.	1h 30 min.	2 h	3 h	4 h	5 h
Ataxia											
Tremores											
Tetania											
Lacrimagem											
Micção											
Diarreia											
Sialorreia											

Os animais foram monitorados por período máximo de 5 horas. Para alguns grupos, o tempo de monitoramento da intoxicação foi menor que 5 horas visto que, de acordo com o protocolo experimental (ver item 3.2), as amostras de sangue e tecido deveriam ser coletadas em diferentes tempos após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Desse modo, alguns grupos de animais foram monitorados por 1h15min., 1h30min., 2 horas, 3 horas, 4 horas, ou por, no máximo, 5 horas.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA

A atividade da ChE foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Dietz et al. (1973), com modificações, utilizando o kit para determinação de colinesterase da marca Doles® (Goiânia, Brasil) (DIETZ; RUBINSTEIN; LUBRANO, 1973).

O plasma utilizado foi obtido a partir do sangue total, mediante decapitação dos animais em guilhotina (EB-271 Insight, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Após decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 1.792G por 10 minutos a 4°C utilizando microcentrífuga (Mikro 120, Hettich®, Tuttlingen, Alemanha) e armazenados até o momento a -80°C.

Para cada amostra de plasma, foram utilizados dois tubos de ensaio (um branco e um teste) (DOLES, 2015). Em ambos os tubos foram adicionados 0,5 mL de substrato (iodeto de propioniltiocolina) e 1,5 mL de reagente de cor (DTNB) e mantidos em banho-maria, a 37°C, durante 3 minutos (DOLES, 2015). Ainda com os tubos em banho-maria, foram adicionados 10 µL de plasma no tubo teste e os tubos continuaram em incubação por mais 2 minutos e 30 segundos (DOLES, 2015). Após o tempo de incubação e ainda em banho-maria foi adicionado 1,5 mL da solução inibidora (solução de sulfato de quinidina 0,5%) no tubo teste (DOLES, 2015). Os tubos (branco e teste) foram retirados do banho-maria e ao tubo branco foi adicionado 1,5 mL de solução inibidora (solução de sulfato de quinidina a 0,5%) (DOLES, 2015). Em seguida, acrescentou-se 10 µL de amostra no tubo branco (DOLES, 2015). Após a devida homogeneização, a absorbância do tubo teste foi lida em espectrofotômetro (SP-220, Biospectro®, Curitiba, Paraná, Brasil) em 410 nm, acertando o zero com o branco (DOLES, 2015).

O princípio do método utilizado, consiste na hidrólise da propioniltiocolina pela ChE presente na amostra de plasma, formando tiocolina e ácido propiônico. O grupo sulfidrílico (SH) livre da tiocolina reage com ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzólico - DTNB (reagente de cor) levando à formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzólico, um composto amarelo, de absorção máxima em torno de 410 nm (DIETZ; RUBINSTEIN; LUBRANO, 1973). A intensidade da cor amarela é proporcional à atividade da ChE (DIETZ; RUBINSTEIN; LUBRANO, 1973).

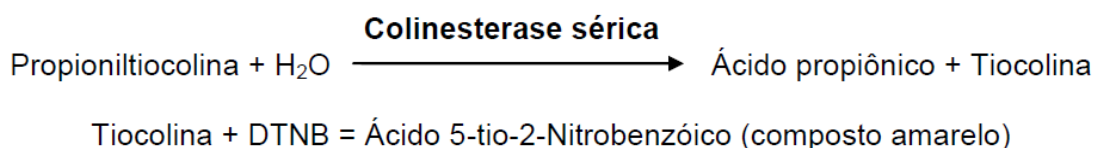


Figura 7: Representação da reação envolvida na determinação da atividade da ChE plasmática através do método proposto por Dietz et al., 1973. Fonte: Dietz et al., 1973.

O resultado do ensaio foi determinado mediante confecção de curva de calibração a partir de uma solução padrão do kit e cálculo do fator de calibração (F) de acordo com a Lei de Beer (DOLES, 2015). A curva de calibração foi representada graficamente pela relação entre os valores de absorbâncias obtidas com os diferentes valores das concentrações da solução padrão (DOLES, 2015).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL

A atividade da ChE cerebral foi realizada conforme metodologia de Ellman e colaboradores (1961), com adaptações propostas por Pires e colaboradores (2001) e Lassiter e colaboradores (2003). Esse método tem sido usado para estudar a ChE humana nas hemácias e em homogenatos de cérebro, rins, pulmões e músculos de ratos (LASSITER et al., 2003).

Neste trabalho, foi determinada a atividade da AChE em homogenato de cérebro e tronco encefálico. Para melhor compreensão, esses tecidos serão citados ao longo do texto somente como “cérebro”.

Para obtenção do homogenato, o tecido cerebral foi macerado juntamente com solução tampão fosfato (pH=8,0; 0,1M) com 1% de Triton (Triton X-100) (v/v), na proporção de 1 mL para cada 20 mg de tecido cerebral (LASSITER et al., 2003). A maceração dos tecidos foi realizada em Potter-Elvehjem (TE-099, Tecnal®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por um tempo total de 5 minutos, em períodos de 30 segundos com intervalo de 10 segundos (LASSITER et al., 2003). Após, o homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 7800G a 4°C (Universal 320, Hettich®, Tuttlingen, Alemanha) (LASSITER et al., 2003). O sobrenadante obtido foi recolhido e armazenado a -20°C por até uma semana ou a -80°C por até um mês (LASSITER et al., 2003).

O método utilizado consiste na hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATCh) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) pela AChE presente no homogenato, formando acetato e tiocolina como produtos. A tiocolina se complexa com o DTNB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) produzindo uma cor amarela.

As reações envolvidas no método são apresentadas a seguir.

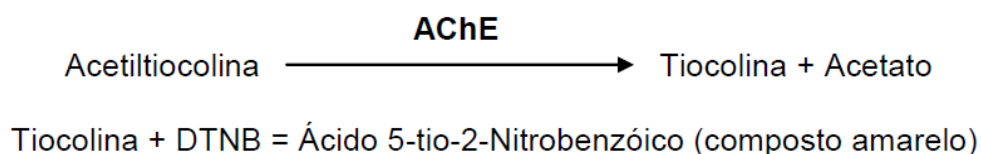


Figura 8: Representação da reação envolvida na determinação da atividade da AChE cerebral, de acordo com método descrito por Ellman e colaboradores (1961). Fonte: modificado de Ellman et al., 1961.

No dia do ensaio, os homogenatos foram descongelados à 4°C e mantidos em caixa térmica com gelo. Uma alíquota de 135 µL do homogenato foi adicionado a cubeta para espectrofotômetro contendo 35 µL de DTNB 5 mM e 820 µL do tampão fosfato utilizado na maceração. A mistura foi submetida à incubação em bancada por 10 minutos a aproximadamente 23°C. A cubeta já com esses adicionados foi inserida no espectrofotômetro (Evolution 300 PC, Thermo Scientific®, Madison, Wisconsin, EUA), e foram adicionados 10 µL de ATCh 75 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), utilizado como substrato para a reação. A intensidade de cor amarela, que é proporcional a atividade da AChE, foi lida sob o comprimento de onda de 412 nm e as absorbâncias foram registradas durante 120 segundos em intervalos de 10 segundos (LASSITER et al., 2003).

A absorbância obtida no ensaio anteriormente descrito foi correlacionada à quantidade de proteína nas amostras de tecido cerebral. Para tanto, foi realizada a determinação da quantidade de proteína nas amostras cerebrais, através do método de Bradford, com o uso do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Esse reagente, que é capaz de ligar-se às proteínas, é constituído principalmente pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) em solução ácida (BRADFORD, 1976).

O CBB G-250 liga-se completamente com as proteínas da amostra dentro de aproximadamente 2 minutos, sendo que a estabilidade colorimétrica do complexo formado é constante por 1 hora (BRADFORD, 1976). Essa interação com a proteína estabiliza a forma iônica do corante, alterando o máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm (BRADFORD, 1976). A alteração é visivelmente observada através da mudança de cor do CBB G-250, inicialmente castanho na ausência de proteínas para diferentes tons de azul, de acordo com a concentração de proteína presente na amostra (BRADFORD, 1976).

A quantificação foi realizada a partir de uma curva padrão construída com as concentrações de 1 µg, 3 µg, 5 µg, 7 µg e 10 µg de solução padrão de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA). Os pontos foram obtidos pela adição do padrão de albumina 1 µg/mL, de forma a se obter as concentrações anteriormente descritas, à água destilada em qsp 1200 µL e 300 µL de reagente de

Bradford. Após a adição dos reagentes, as soluções correspondentes aos pontos da curva foram homogeneizadas em agitador vórtex (AP-59, Phoenix[®], Araraquara, São Paulo, Brasil). O espectrofotômetro (Evolution 300 PC, Thermo Scientific[®], Madison, Wisconsin, EUA) foi zerado a partir do branco (constituído por somente 1200 µL de água destilada e 300 µL de reagente de Bradford) e as absorbâncias foram obtidas sob o comprimento de onda de 595 nm. Um exemplo de curva obtida pode ser visualizado a seguir na figura 8.

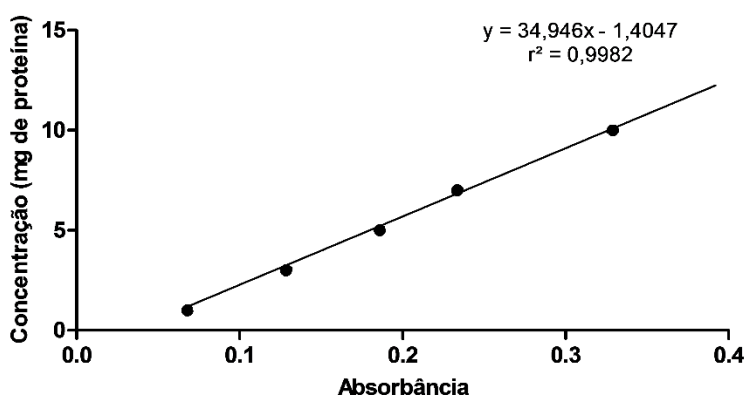


Figura 9: Curva de calibração para quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Fonte: BRADFORD, 1976; PIRES et al., 2001.

Para a determinação da quantidade de proteína, as amostras foram diluídas na forma de 10 µL do homogenato em 190 µL de água destilada. Desta diluição, foram aliqüotados 10 µL, os quais foram adicionados a 1190 µL de água destilada e 300 µL de reagente de Bradford e sua absorbância determinada imediatamente sob o comprimento de onda de 595 nm. As concentrações de proteína nas amostras foram obtidas mediante a curva de calibração confeccionada inicialmente.

A cada cinco amostras lidas no espectrofotômetro, fez-se necessário o preparo de outro branco, uma vez que o reagente de Bradford é altamente precipitável.

Todas as leituras realizadas pelo método de Bradford foram realizadas em duplicata.

A determinação da concentração de proteína na amostra foi utilizada para correlação da atividade da AChE cerebral com a quantidade de proteína total presente no homogenato cerebral a partir da fórmula a seguir:

$$\text{Atividade AChE cerebral: } \frac{(1000 * \Delta \text{Abs} * 60)}{(13,6 * 135 * X)}$$

Onde,

Δ abs: Variação de absorbância no ensaio de determinação da atividade da AChE cerebral

1000: Volume total da reação

X: Concentração de proteína em mg;

60: minutos (1 hora);

13,6: Coeficiente de extinção;

135: Volume da amostra.

O resultado obtido foi expresso em mmol de acetilcolina/hora/mg de proteína.

3.6 TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA

A técnica de análise para identificação e quantificação de OFs, 2-PAM e ATR foi desenvolvida de modo a subsidiar pesquisas do Laboratório de Investigação Farmaco-Toxicológica da Função Cardiovascular, com ênfase na toxicidade do CPF. A utilização do método será importante tanto neste trabalho quanto em trabalhos futuros.

Para desenvolvimento do método, foi firmada parceria na forma de convênio entre a Universidade Federal do Espírito Santo e o Serviço de Laboratório Médico Legal (SLML) da Polícia Civil do Espírito Santo, que é dotado de conhecimento e meios técnicos a respeito da análise toxicológica forense.

O convênio firmado estimulou a criação de um grupo de trabalho a desenvolver um método analítico para aplicação neste projeto de pesquisa, mas que também fosse amplo o suficiente para que pudesse ser aplicado na rotina do SLML, a fim de contribuir com o aprimoramento das análises em amostras de casos suspeitos de envenenamento por OFs.

O desenvolvimento de um método mais amplo também foi previsto a fim de disponibilizar-se uma técnica validada, capaz de detectar outros OFs que, apesar de atualmente não serem estudados por nosso grupo de pesquisa, futuramente podem ser objetos de estudo de outros trabalhos.

3.6.1 Analitos pesquisados

Os analitos pesquisados incluem o CPF e seu metabólito ativo, CPF-oxon, além da ATR e da 2-PAM e mais 11 OFs, a saber: acefato, azinfós metílico, dimetoato, etiona, malationa, metamidofós, metidationa, ometoato, pirimifós metílico, profenofós, pirazofós.

Portanto, ao todo, o método é capaz de identificar e quantificar 15 analitos, cujas estruturas podem ser visualizadas na figura 10.

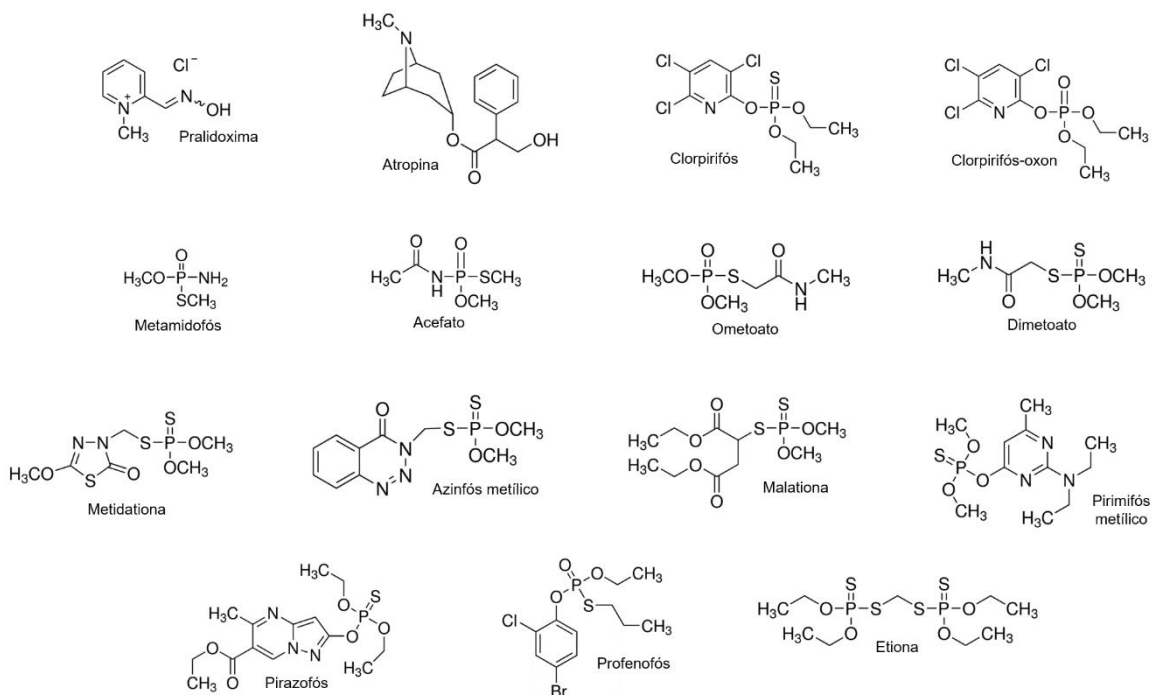


Figura 10: Fórmulas estruturais dos analitos previstos na técnica de análise. Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2016.

Todos os organofosforados previstos no método possuem classificação toxicológica II ou III, ou seja, são considerados produtos altamente ou medianamente tóxicos, conforme Portaria Nº 3 de 16 de janeiro de 1992 do Ministério da Saúde, conforme detalhado na tabela a seguir (BRASIL, 1992).

Tabela 1: Classificação toxicológica dos organofosforados previstos no método analítico. Fonte: BRASIL, 1992.

Classificação toxicológica	DL 50 mg/Kg/dose letal (rato)		Analitos pesquisados
	Sólidos	Líquidos	
I – Extremamente tóxicos	DL 50 ≤ 5	DL 50 ≤ 20	-
II – Altamente tóxicos	5 < DL 50 ≤ 50	20 < DL 50 ≤ 200	azinfós metílico clorpirifós dimetoato etiona metamidofós metidationa ometoato profenofós
III – Medianamente tóxicos	50 < DL 50 ≤ 500	200 < DL 50 ≤ 2000	acefato, malationa, pirazofós pirimifós metílico
IV – Pouco tóxicos	DL 50 > 500	DL 50 > 2000	-

3.6.2 Padrões de referência e padrões internos

Os padrões de referência de todos os analitos foram preparados na forma de soluções de trabalho nas concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL a partir das soluções-mãe descritas abaixo:

- Clorpirifós 100 µg/mL, (Restek®, State College, PA, EUA);
- Clorpirifós-oxon 100 µg/mL, (Restek®, State College, PA, EUA);

- Mix de organofosforados, (Restek®, State College, PA, EUA) com concentrações de 500 µg/mL de metamidofós, diclorvós e pirazofós; 200 µg/mL de acefato, dimetoato, malationa, profenofós, etiona e metidationa; 1.000 µg/mL de ometoato; 100 µg/mL de pirimifós-metílico e clorpirifós e 400 µg/mL de azinfós-metílico.
- Trifenilfosfato 100 mg (TPP), (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). O TPP foi diluído em metanol em grau HPLC (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) para obtenção de solução de trabalho a 1 µg/mL e foi utilizado como padrão interno de todos os OFs
- Diazepam D5 100 µg/mL (Cerilliant®, Round Rock, TX, EUA). O diazepam D5 foi diluído em metanol para obtenção de solução de trabalho a 0,1 µg/mL e foi utilizado como padrão interno da ATR e da 2-PAM.

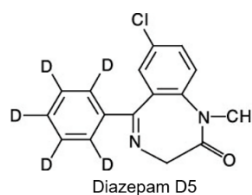
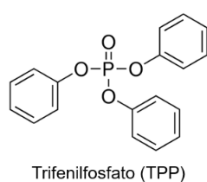


Figura 11: Fórmulas estruturais dos padrões internos utilizados na técnica de análise. Fonte: CERILLIANT, 2015; SIGMA-ALDRICH, 2016.

3.6.3 Procedimento de extração das amostras de sangue

Foi utilizada extração líquido-líquido, por se tratar de uma técnica clássica de preparação de amostras, simples e rápida. O processo fora adaptado de Abbara e colaboradores (2008) e Inoue e colaboradores (2007).

Em microtubo plástico de 2 mL foram adicionadas as soluções de padrões de referência e padrões internos e evaporados à secura sob fluxo de nitrogênio com grau de pureza 2.0 (White Martins®, Aracruz, ES, Brasil). Após, alíquotas de 100 µL de sangue total provenientes de animais livres de tratamentos anteriores foram adicionadas ao mesmo microtubo, seguidos de 850 µL de acetonitrila grau HPLC (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) mantida a -20°C como agente precipitador de proteínas (ABBARA et al., 2008; INOUE et al., 2007). O tubo com a amostra foi agitado em

vórtex por 3 minutos e submetidos à ultra-centrifugação (SL702 Solab[®], Piracicaba, SP, Brasil) a 4480 G por 10 min., sendo recolhidos 750 µL do sobrenadante que foram então transferidos para fresco de vidro para injeção de 5 µL no sistema de HPLC/MS-MS.

3.6.4 Condições cromatográficas e da espectrometria de massas

A análise foi realizada em HPLC modelo 1290, acoplado a espectrômetro de massas, modelo 6430, ambos da marca Agilent[®] (Santa Clara, CA, EUA). A separação dos analitos foi realizada em coluna C18 (Kinetex 2,6u – 100 x 2,1 mm) (Phenomenex[®], Torrance, CA, EUA). Foi utilizada eluição por gradiente onde a fase móvel foi composta por uma solução A (formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico 0,5% em água) e uma solução B (0,1% ácido fórmico em metanol).

A fase móvel A foi preparada adicionando-se 500 µL de formiato de amônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 500 µL de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em 500 mL de água ultrapura obtida em equipamento Milli Q, (Millipore[®], Bedford, MA, EUA). Após, a solução foi filtrada em membrana filtrante sob sonicação e vácuo, em lavadora ultra-sônica (Unique[®], Indaiatuba, SP, Brasil), para eliminação de micropartículas e degaseificação da solução. A fase móvel B foi preparada adicionando-se 500µL de ácido fórmico em metanol grau LC-MS.

O gradiente desenvolveu-se da seguinte forma: no tempo zero, a mistura de 95% da solução A e 5% da solução B foi inserida através da coluna. De 0,5 a 4,0 minutos a porcentagem de solução A foi diminuída para 40%. De 4,0 a 8,0 min, a porcentagem de solução A foi diminuída para 5%, mantendo-se assim até 9 minutos. Em 9,5 minutos a proporção foi revertida para 95% da solução A e 5% da solução B, sendo esse o tempo de corrida. Após, segue-se um tempo de pós-corrída de 1min e 40 seg, quando a coluna é estabilizada para a próxima injeção.

Tabela 2: Eluição por gradiente utilizada no método analítico.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	Fluxo (mL/min.)	Pressão Máxima (Bar)
0	95	5	0,3	600
0,5	95	5	0,3	600
4,0	40	60	0,3	600
8,0	5	95	0,3	600
9,0	5	95	0,3	600
9,5	95	5	0,3	600

Após separação cromatográfica, os compostos foram detectados por espectrômetro de massas triplo quadrupolo com uma fonte de ionização por eletrospray, operando no modo de ionização positiva, tendo nitrogênio como gás nebulizador em temperatura de 325°C, fluxo de 10 L/min e nebulizador com pressão de 50 psi.

3.6.5 Parâmetros de validação analítica

Os procedimentos de validação analítica adotados no desenvolvimento deste trabalho baseiam-se na Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012). Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: limite de detecção (LD), limites de quantificação (LIQ e LSQ), especificidade, efeito matriz, linearidade, efeito residual (*carryover*), precisão, exatidão, recuperação e estabilidade (BRASIL, 2012).

O objetivo da validação analítica foi assegurar a credibilidade analítica do método utilizado, garantindo a confiabilidade dos resultados, assim como identificar suas limitações (BRASIL, 2012).

As etapas de validação foram realizadas utilizando-se do conhecimento prévio dos conceitos a seguir (BRASIL, 2012; SWGTOX, 2013):

- Analito: composto químico específico a ser mensurado em uma matriz.
- Amostra branca: amostras sem a presença dos analitos de interesse.
- Amostra zero: amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno.

- Padrão interno (PI): substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controle de qualidade e amostras em estudo.
- Matriz biológica: meio de origem biológica no qual os analitos em estudo serão quantificados.
- Controle de qualidade (CQ): amostra adicionada dos analitos e PI em concentrações determinadas.
- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração menor ou igual a 3 vezes a menor concentração da curva de calibração (LIQ).
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração que seja aproximadamente a média entre CQB e CQA.
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração que corresponda de 75 a 90 % da maior concentração da curva de calibração.
- Limite de detecção: menor concentração de um analito presente na amostra que pode ser detectado e identificado.
- Limite inferior de quantificação (LIQ): menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. É o menor ponto da curva de calibração.
- Limite superior de quantificação (LSQ): maior quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. É o maior ponto da curva de calibração.
- Corrida analítica (ou lote): conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e CQs para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições.

3.6.5.1 Limite de Detecção

O limite de detecção diz respeito à menor concentração detectável em uma amostra, mas não necessariamente quantificada (BRASIL, 2012).

Para determinação deste parâmetro, amostras de sangue total foram adicionadas de concentrações decrescentes dos padrões e analisadas. O limite de detecção foi determinado pela menor concentração detectada, totalmente distinta de ruído.

3.6.5.2 Limites de Quantificação

O limite inferior de quantificação é a menor concentração na qual os analitos podem ser detectados e quantificados com precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120% (BRASIL, 2012; UNODC, 2009). O limite superior de quantificação (LSQ) é a maior concentração que pode ser determinada com precisão de até 15% e exatidão de 85 a 115% (BRASIL, 2012; UNODC, 2009).

O LIQ foi estabelecido por meio da análise de amostras de sangue total fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

O LSQ é determinado por meio da análise de amostras de sangue total fortificadas com concentrações cada vez maiores até o valor em que não são mais respeitados os critérios de precisão e exatidão, determinando o nível mais alto da curva de calibração. Este parâmetro não foi realizado considerando que as concentrações obtidas já atendem a necessidade da técnica. Caso sejam identificadas amostras com concentrações de analitos maiores que o LSQ, essas amostras deverão ser diluídas para se adequarem à curva de calibração.

3.6.5.3 Especificidade

A especificidade diz respeito à habilidade do método em diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como impurezas, produtos de degradação, metabólitos e os próprios constituintes da matriz (BRASIL, 2012).

Para determinação desse parâmetro foram analisadas dez amostras brancas de diferentes animais, além de três amostras zero para averiguação de possíveis interferentes dos componentes da matriz e dos padrões internos (PIs).

O critério de aceitação para a especificidade é verificado através da avaliação dos TRs, tanto dos picos dos analitos em estudo quanto dos possíveis interferentes. Caso haja algum pico interferente com TR próximo ao de algum analito de interesse, a resposta dos picos interferentes deve ser inferior a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ (BRASIL, 2012). No caso de interferentes com tempos de retenção iguais ao PI, a resposta dos seus picos devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

3.6.5.4 Efeito matriz

O efeito matriz se refere ao efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica (BRASIL, 2012).

Para análise do efeito matriz, foram preparados 12 frascos de vidro adicionados de PIs. Em seis deles foram adicionadas as concentrações de padrões correspondentes ao CQB e em outros seis foram adicionadas as concentrações de padrões correspondentes ao CQA, ambos sem adição de amostra biológica. O solvente foi evaporado e o volume reconstituído e analisado. Esse foi denominado Lote A.

De igual modo, foram preparados 12 frascos de vidro, onde foram adicionados os eluatos obtidos da extração de amostras de sangue brancas, aos quais foram adicionados PIs e padrões dos analitos correspondentes a CQB e CQA. Esse foi denominado Lote B.

O efeito matriz foi calculado, utilizando-se a seguinte fórmula (BRASIL, 2012):

$$\% \text{ efeito matriz} = \left[\left(\frac{\text{média da área do lote B}}{\text{média da área do lote A}} \right) - 1 \right] \times 100$$

O critério de aceitação para o efeito matriz é de que a média de supressão ou aumento na ionização deve ser de no máximo 25% (BRASIL, 2012; SWGTOX, 2013).

3.6.5.5 Linearidade

A linearidade diz respeito à capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (BRASIL, 2012). A linearidade foi determinada pela análise de seis pontos de calibração em três dias consecutivos. Os pontos da curva de calibração foram obtidos da razão entre a área do íon de quantificação dos analitos de interesse sobre a área do íon de quantificação do seu respectivo PI.

Para análise dos pontos, foi utilizado o modelo matemático linear e calculado o r^2 (coeficiente de determinação) (BRASIL, 2012). O critério de aceitação para a linearidade, envolve um valor de $r^2 \geq 0,99$ (BRASIL, 2012).

3.6.5.6 Efeito Residual (*Carryover*)

O efeito residual, também conhecido como *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou do PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012).

Para sua avaliação foi extraída uma amostra de sangue sem adição dos padrões de analitos, mas somente com a adição de PIs. Essa amostra foi injetada no equipamento sendo uma injeção antes e duas logo após a injeção do ponto mais alto da curva.

O procedimento foi repetido em todas as confecções de curvas de calibração.

3.6.5.7 Precisão

A precisão determina a proximidade dos resultados obtidos por análises repetidas de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). Para procedimentos quantitativos dois tipos de precisão devem ser estudas: a precisão inter-ensaio e a intra-ensaio (BRITO et al., 2003).

A precisão inter-ensaio expressa as variações no mesmo laboratório e envolvem diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros (BRITO et al., 2003).

A precisão intra-ensaio expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo (BRITO et al., 2003).

No desenvolvimento deste método analítico, a precisão foi determinada utilizando-se três concentrações (CQB, CQM e CQA).

A precisão inter-ensaio foi determinada em três dias consecutivos, com triplicatas de cada nível de controle. A precisão intra-ensaio foi calculada pela determinação da concentração de cinco replicadas realizadas no mesmo dia.

A Tabela 3 mostra os níveis de concentração dos CQ baixo, médio e alto de cada analito estudado.

Tabela 3: Valores de CQB, CQM, CQA de cada analito.

Analito	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)
Acefato	6	500	800
Atropina	1,5	20	40
Azinfós	12	1000	1600
Clorpirifós	3	250	400
Clorpirifós oxon	5	120	200
Dimetoato	6	500	800
Etiona	6	500	800
Malationa	6	500	800
Metamidofós	15	1250	2000
Metidationa	6	500	800
Ometoato	30	2500	4000
Pirimifós metílico	3	250	400
Pralidoxima	3	250	400
Profenofós	6	500	800
Pirazofós	15	1250	2000

A precisão foi determinada por meio do cálculo do coeficiente de variação (CV%) foi calculado segundo a fórmula (BRASIL, 2012):

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

São admitidos como aceitáveis valores inferiores a 15%, exceto para LIQ e CQB, para os quais foram admitidos valores menores ou iguais a 20% (UNODC, 2009).

3.6.5.8 Exatidão

O parâmetro exatidão determina a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência estimado pelo processo analítico (BRASIL, 2012). Foi determinada por comparação entre as concentrações obtidas e as concentrações teóricas em onze análises por nível de CQ e expressas como porcentagem da concentração teórica (desvio padrão relativo).

Não são admitidos valores fora da faixa entre 85 a 115% exceto para LIQ e CQB para os quais não são admitidos valores entre 80 a 120% da concentração teórica (UNODC, 2009).

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100$$

3.6.5.9 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência de extração de um método analítico (UNODC, 2009). Para avaliação desse parâmetro, foram identificados cinco tubos de análise para cada concentração: baixa, média e alta. A esses tubos foram adicionados 100 µL de sangue branco, assim como os PIs e em seguida foi procedida a extração. Após procedimento de extração, os eluatos foram transferidos para frascos de vidro devidamente identificados, nos quais foram adicionados os padrões de analitos nas concentrações de CQB, CQM ou CQA. Esta é a bateria de amostras não extraídas.

Mais cinco tubos de análise para cada concentração (baixa, média e alta) foram identificados. A estes tubos foi adicionada a amostra de sangue branco, assim como as concentrações dos analitos correspondentes à CQB, CQM e CQA, bem como os PIs. Em seguida foi procedida a extração e submetida à análise.

O cálculo da recuperação é feito em função da relação de área do analito e do padrão interno de amostras extraídas (as mesmas amostras de CQ utilizadas nos parâmetros de precisão e exatidão) e não extraídas (descritas acima) conforme fórmula a seguir:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{\text{concentração das amostras extraídas (CQ) com padrões}}{\text{concentração das amostras adicionadas de padrão após extração}} \right) \times 100$$

3.6.5.10 Estabilidade

A estabilidade determina se o analito mantém-se quimicamente inalterado na matriz sob condições específicas em intervalos de tempo pré-determinados (BRASIL, 2012). As estabilidades analisadas foram: Estabilidade pós-processamento; estabilidade de congelamento/descongelamento e estabilidade de curta duração.

Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento avalia a capacidade de degradação dos analitos depois de processadas (BRASIL, 2012). Para análise do parâmetro de estabilidade pós-processamento foram utilizadas três amostras do CQB e três amostras do CQA. Essas amostras foram as mesmas extraídas para análise do parâmetro precisão e exatidão e reinjetadas após 24, 48 e 72 h.

Estabilidade de congelamento/descongelamento

A estabilidade de congelamento e descongelamento avalia a capacidade de degradação dos analitos em matriz durante ciclos de congelamento e descongelamento (BRASIL, 2012). Para análise desse parâmetro foram aliqüotadas seis amostras de sangue branco adicionadas de todos os padrões, exceto dos PIs, sendo três com concentração de CQB e três com concentração de CQA.

Os tubos com sangue branco adicionado dos padrões de analitos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento de, no mínimo, 12 horas de congelamento.

Após o último ciclo de descongelamento foram acrescentados os PIs e a amostra foi extraída e analisada.

Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração avalia a capacidade de degradação dos analitos em matriz expostos a temperatura ambiente por curto período de tempo (BRASIL, 2012).

Para análise desse parâmetro foram aliqüotadas seis amostras de sangue branco adicionadas dos padrões de analitos, sendo três com concentração de CQB e três com concentração de CQA.

Os tubos foram mantidos sobre a bancada por 12 horas. Decorrido esse tempo, foram acrescentados os PIs e a amostra foi extraída e analisada.

Todas as estabilidades foram analisadas comparando-se a média de concentração obtida no primeiro dia de análise (as mesmas amostras de CQB e CQA utilizadas para análise de precisão) com a média de concentração obtida nas análises de estabilidade.

As concentrações das amostras de estabilidade não devem variar mais do que 15% em relação às amostras de controle de qualidade utilizadas para comparação (BRASIL, 2012).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise quanto à presença dos sinais clínicos na intoxicação foi realizada pelo teste Qui-Quadrado de Pearson, seguido pelo teste de Marascuilo e a análise quanto à intensidade desses sinais foi realizado por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida por post hoc pelo teste de Bonferroni.

Os resultados da atividade das colinesterases plasmática e cerebral, assim como da análise do clorpirifós e clorpirifós-oxon, foram submetidos à ANOVA de uma via e análise post hoc pelo teste de Tukey.

As análises foram realizadas nos softwares IBM SPSS Statistics® (versão 20.0) e GraphPad Prism® (versão 5.0). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Os animais intoxicados monitorados manifestaram sinais clínicos característicos da síndrome colinérgica como ataxia, tremor, tetania, micção, diarreia, sialorreia e lacrimejamento. Por se tratar de intoxicação em doses subletais, apenas o parâmetro relativo ao número de mortes não foi evidenciado nos grupos intoxicados.

Para fins de análise estatística, os sinais foram avaliados quanto à presença e quanto à intensidade, e demonstrados nos tempos de 1 hora, 1h15min., 1h30min., 2 horas, 3 horas e 4 horas.

A análise quanto à presença ou ausência dos sinais consta no Anexo 2 e a análise quanto à intensidade dos sinais realizada para cada parâmetro está descrita a seguir. Ademais, os valores médios dos resultados de intensidade podem ser também visualizados na tabela que consta no Anexo 3.

A figura 12 demonstra os dados relativos ao parâmetro ataxia.

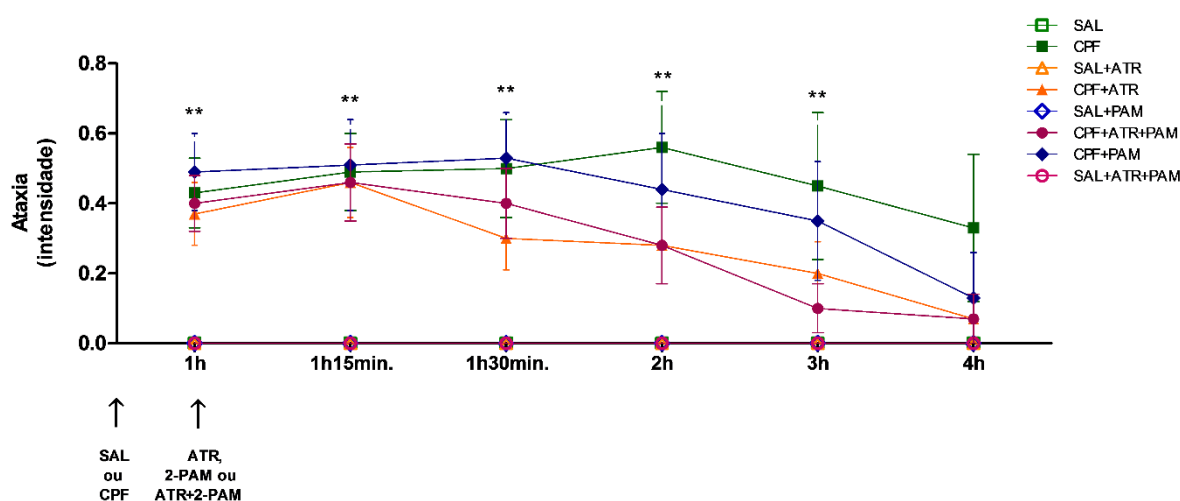


Figura 12: Média de intensidade do sinal clínico ataxia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ em 1 hora ($n=35$) e 1h15min. ($n=35$) indica diferença entre os grupos CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus respectivos grupos controle; em 1h30min. ($n=30$) indica diferença dos grupos CPF, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles; em 2 horas ($n=25$) indica diferença dos grupos CPF e CPF+PAM em relação aos seus respectivos controles; e em 3 horas ($n=20$) indica diferença somente entre CPF e seu controle SAL. Diferença não observada em 4 horas ($n=15$).

Em relação ao parâmetro ataxia, a ANOVA realizada não demonstrou diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=0,77$; $p=0,826$), mas demonstrou diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=29,46$; $p<0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=3,70$; $p<0,01$). A análise post hoc evidenciou diferença significativa entre os grupos CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2PAM, em relação aos seus grupos controle (SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM, respectivamente) na maioria dos tempos avaliados. Apesar de todos os grupos intoxicados apresentarem diferença significativa em relação aos seus grupos controle, percebe-se, que a diferença entre o grupo CPF e seu respectivo controle SAL ($p<0,01$) persistiu por até 3 horas, enquanto que nos grupos que receberam algum tipo de tratamento as diferenças em relação aos seus respectivos controles já começam a desaparecer a partir de 1h15min.

A figura 13 demonstra os dados relativos ao parâmetro tremor.

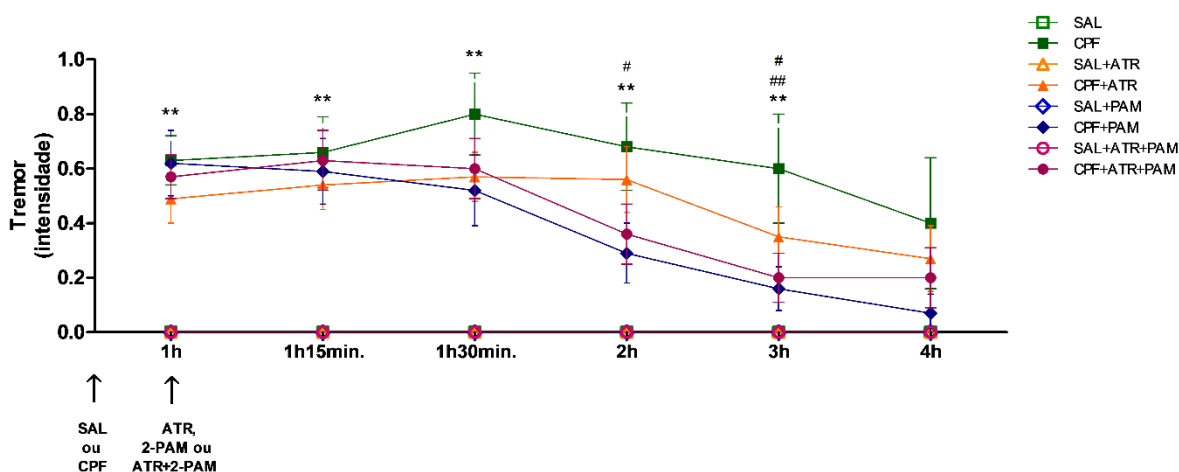


Figura 13: Média de intensidade do sinal clínico tremor apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p<0,01$ em 1 hora (n=35), 1h15min. (n=35) e 1h30min. (n=30) indica diferença de CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus respectivos grupos controle; em 2 horas indica diferença dos grupos CPF, CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles e em 3 horas indica diferença somente entre CPF e seu controle SAL. # $p<0,05$ em 2 horas (n=25) indica diferença do grupo CPF em relação ao grupo CPF+2-PAM; em 3 horas (n=20) indica diferença entre CPF em relação ao grupo CPF+ATR+2-PAM. ## $p<0,01$ em 3 horas indica diferença entre CPF em relação ao grupo CPF+2-PAM. Diferença não observada em 4 horas (n=15).

O tremor esteve presente, em todos os grupos intoxicados com CPF e não esteve presente em seus grupos controle correspondentes. Não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=1,35$; $p=0,083$), mas foi demonstrada diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=51,78$; $p<0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=6,41$; $p<0,01$). A análise post hoc demonstrou diferença significativa entre os grupos CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2PAM, em relação aos seus grupos controle na maioria dos tempos avaliados. Apesar de todos os grupos intoxicados apresentarem diferença significativa em relação aos seus grupos controle, percebeu-se, que a diferença entre os grupos CPF e seu controle SAL ($p<0,01$) persistiu por até 3 horas, enquanto que nos grupos CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM a diferença em relação aos grupos controle SAL+ATR ($p<0,01$) e SAL+ATR+2-PAM ($p<0,05$) persistiu por até 2h e no grupo CPF+2-PAM a diferença em relação ao grupo controle SAL+2-PAM ($p<0,01$) persistiu por até somente 1h30min. Fica claro, portanto, que nos animais que receberam algum tipo de tratamento, principalmente nos animais tratados com 2-PAM, o desaparecimento dos tremores foi mais rápido. Diferença estatística também foi observada entre alguns grupos intoxicados quando comparados entre si, como o grupo CPF em relação ao grupo CPF+2-PAM no tempo de 2 horas ($p<0,05$) e 3 horas ($p<0,01$) e o em relação ao grupo CPF+ATR+2-PAM no tempo de 3 horas ($p<0,05$).

A figura 14 demonstra os dados relativos ao parâmetro tetania.

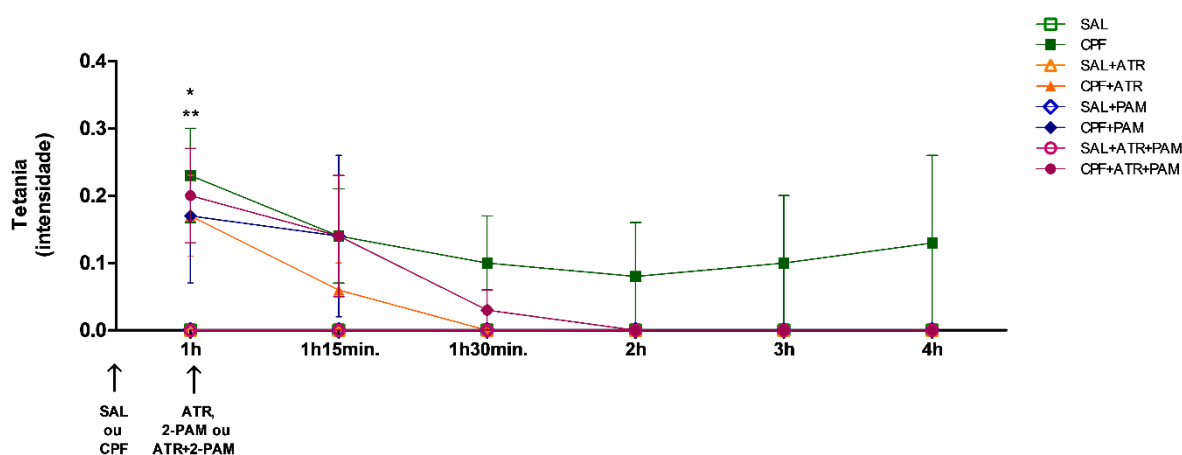


Figura 14: Média de intensidade do sinal clínico tetania apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$ em 1 hora ($n=35$) indica diferença de CPF+ATR e CPF+2-PAM em relação aos seus grupos controle SAL+ATR e SAL+2-PAM e ** $p<0,01$ em 1 hora indica diferença de CPF e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles SAL e SAL+ATR+2-PAM. Diferenças não observadas em 1h15min. ($n=35$), 1h30min. ($n=30$), 2 horas ($n=25$), 3 horas ($n=20$) e 4 horas ($n=15$).

A tetania esteve presente, em todos os grupos de animais que foram intoxicados com CPF e não esteve presente em seus grupos controle correspondentes. A ANOVA não demonstrou diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempos ($F_{(35,1232)}=0,616$; $p=0,962$), mas demonstrou diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=4,88$; $p<0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=3,66$; $p<0,01$). A análise post hoc demonstrou que todos os grupos intoxicados com CPF diferiram dos seus respectivos grupos controles apenas até o início do tratamento. Todavia, apesar das diferenças terem desaparecido a partir do tempo de 1h15min., percebe-se ao analisar-se o gráfico que o grupo intoxicado com CPF sem nenhum tratamento permanece com valores médios de tetania maiores do que os grupos tratados, ainda que a análise estatística não aponte diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A figura 15 demonstra os dados relativos ao parâmetro micção.

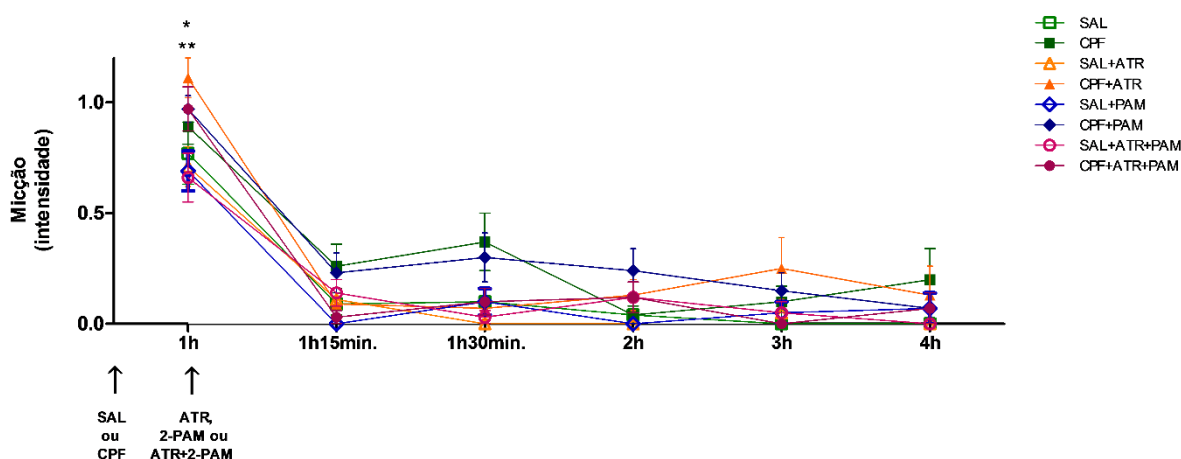


Figura 15: Média de intensidade do sinal clínico micção apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$ em 1 hora ($n=35$) indica diferença de CPF+2-PAM em relação ao seu grupo controle e ** $p<0,01$ em 1 hora indica diferença de CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles. Diferenças não observadas em 1h15min. ($n=35$), 1h30min. ($n=30$), 2 horas ($n=25$), 3 horas ($n=20$) e 4 horas ($n=15$).

Diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=1,02$; $p=0,438$) não foi demonstrada, entretanto, foi demonstrada para o tratamento ($F_{(7,1232)}=5,14$; $p<0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=109,3$; $p<0,01$). A análise post hoc demonstrou diferença significativa somente entre os grupos CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM, no tempo de 1 hora em relação aos seus grupos controle ($p<0,05$).

A figura 16 demonstra os dados relativos ao parâmetro diarreia.

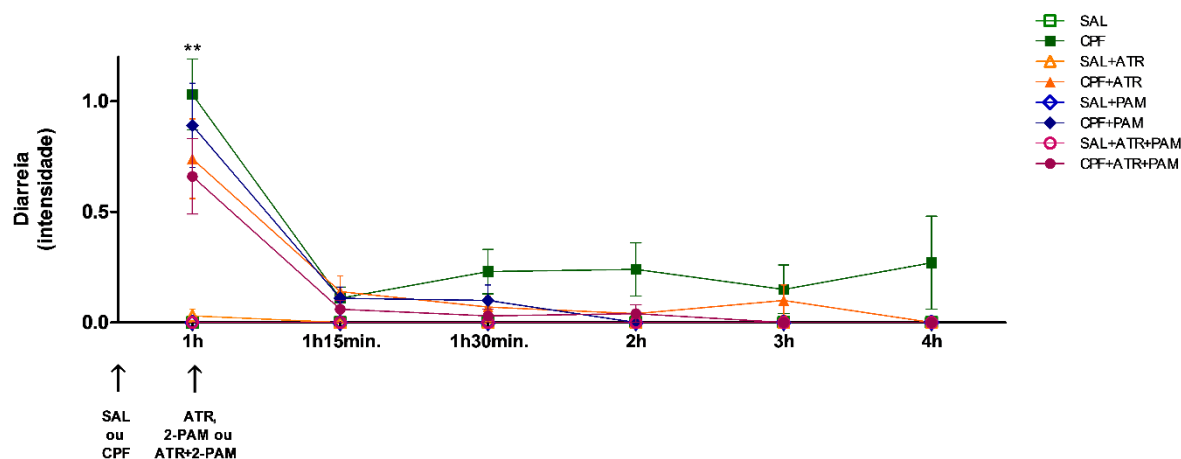


Figura 16: Média de intensidade do sinal clínico diarreia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ em 1 hora (n=35) indica diferença de CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus grupos controle. Diferenças não observadas em 1h15min. (n=35), 1h30min. (n=30), 2 horas (n=25), 3 horas (n=20) e 4 horas (n=15).

Diferenças significativas foram observadas também quanto ao parâmetro diarreia. A ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=4,12$; $p < 0,01$), assim como também demonstrou diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=13,90$; $p < 0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=27,91$; $p < 0,01$). A análise post hoc demonstrou diferença significativa entre os grupos intoxicados, somente no tempo de 1 hora em relação aos seus grupos controle ($p < 0,01$).

A figura 17 demonstra os dados relativos ao parâmetro sialorreia.

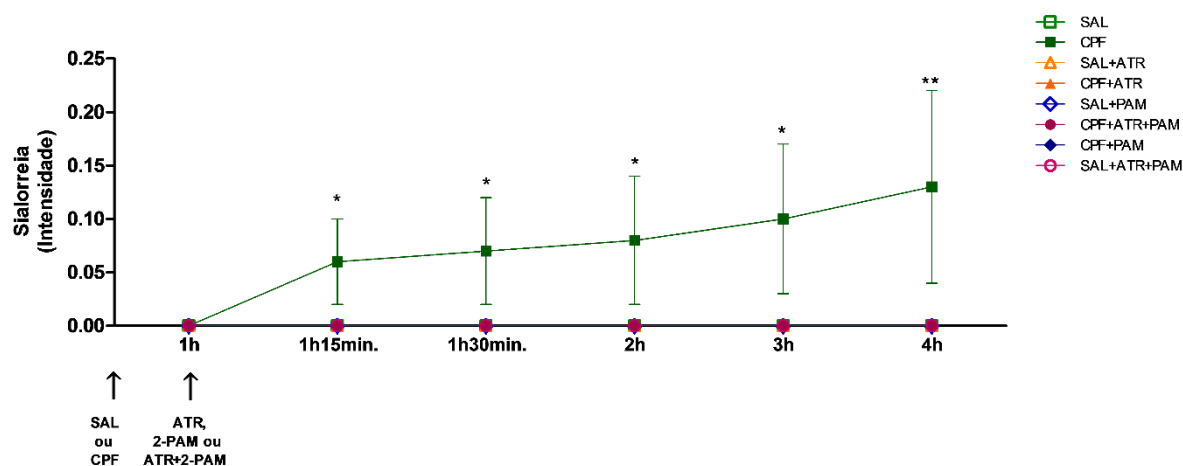


Figura 17: Média de intensidade do sinal clínico sialorreia apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em 1h15min. ($n=35$), 1h30min. ($n=30$), 2 horas ($n=25$), 3 horas ($n=20$) e 4 horas ($n=15$) indica diferença do grupo CPF em relação ao seu grupo controle SAL. Diferença não observada em 1 hora ($n=35$).

A análise não demonstrou diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=0,727$; $p=0,879$) nem para o tempo ($F_{(5,1232)}=0,727$; $p=0,603$), mas demonstrou diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=12,31$; $p < 0,01$). A análise post hoc demonstrou diferença somente entre o grupo CPF, a partir do tempo de 1h15min. em relação ao seu grupo controle SAL ($p < 0,05$).

A figura 18 demonstra os dados relativos ao parâmetro lacrimejamento.

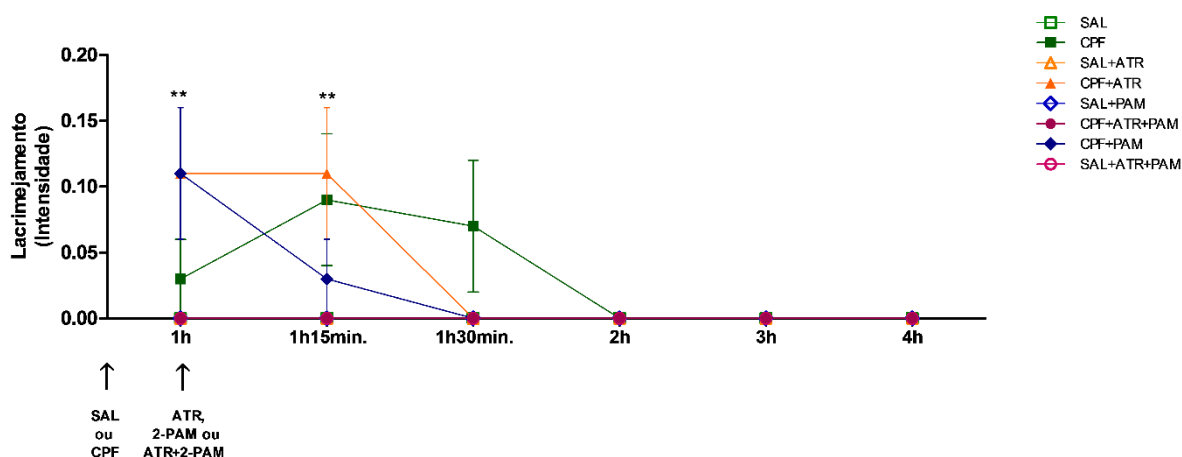


Figura 18: Média de intensidade do sinal clínico lacrimejamento apresentado em ratos salina (SAL) ou clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ em 1 hora ($n=35$) indica diferença dos grupos CPF+ATR e CPF+2-PAM em relação aos seus respectivos grupos controles e ** $p < 0,01$ em 1h15min. ($n=35$) indica diferença dos grupos CPF e CPF+ATR em relação aos seus grupos controle. Diferenças não observadas em 1h30min. ($n=30$), 2 horas ($n=25$), 3 horas ($n=20$) e 4 horas ($n=15$).

A análise para lacrimejamento não demonstrou diferença estatisticamente significativa na interação entre tratamentos e tempo ($F_{(35,1232)}=1,318$; $p=0,1029$), mas demonstrou diferença para o tratamento ($F_{(7,1232)}=3,22$; $p<0,01$) e para o tempo ($F_{(5,1232)}=3,22$; $p<0,01$). Observando-se as curvas representadas na figura 18, pode-se perceber que os grupos CPF, CPF+ATR e CPF+2-PAM já não apresentam lacrimejamento a partir de 1h30min. enquanto no grupo CPF, este sinal desaparece totalmente 2 horas após a intoxicação. O grupo CPF+ATR+2-PAM não apresentou animais com lacrimejamento.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA

Os resultados para os dados da atividade da ChE plasmática estão representados na figura 19 e estão representados em forma de tabela no Anexo 4.

O gráfico representa a atividade da enzima nos grupos experimentais SAL ou CPF, nos diferentes tempos estipulados para decapitação dos animais após o tratamento com os fármacos preconizados (ATR e/ou 2-PAM), a saber: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas ou 24 horas.

A comparação entre os grupos em função dos tempos de decapitação dos animais foi feita por ANOVA de uma via seguida pela análise post hoc pelo teste de Tukey.

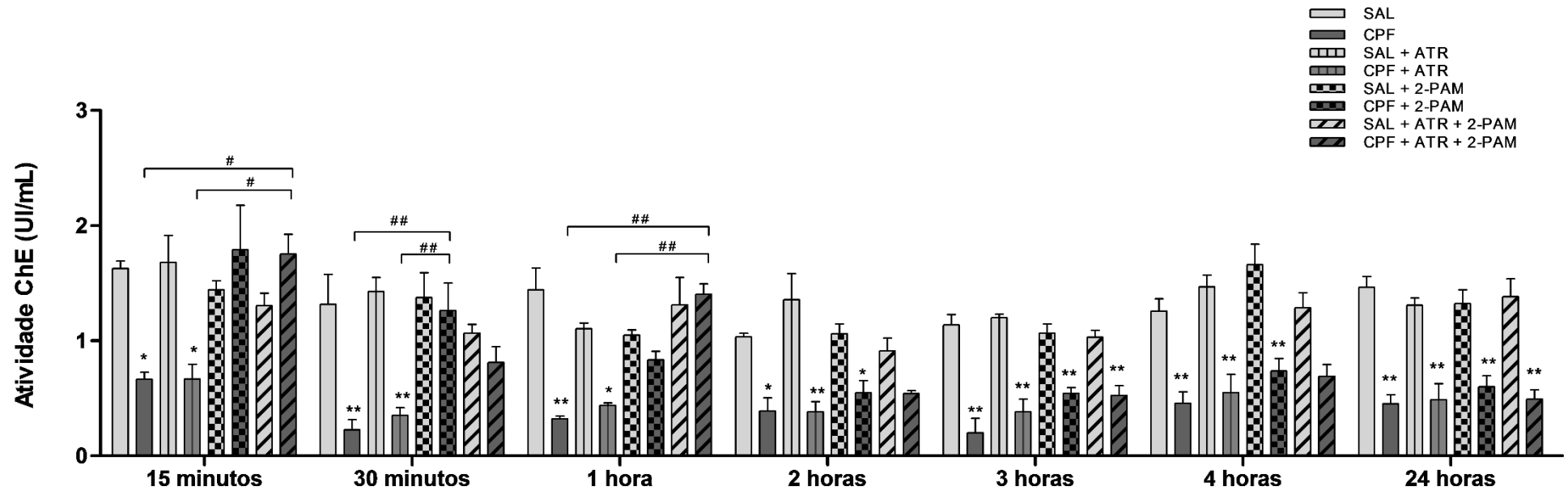


Figura 19: Atividade da colinesterase plasmática de ratos salina (SAL) e clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença dos grupos intoxicados (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) em relação aos seus grupos controle (SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM, respectivamente) e # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ indica diferença dos grupos intoxicados (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) entre si.

A ANOVA realizada para o grupo cujas amostras de sangue foram coletadas após 15 minutos da administração dos antídotos ATR e/ou 2-PAM nos animais tratados com CPF ou SAL demonstrou diferença significativa ($F_{(7,26)}=5,332$; $p<0,01$). A análise post hoc evidenciou menor atividade da enzima nos animais tratados com CPF e com CPF+ATR em relação aos seus respectivos grupos controle SAL ($p<0,05$) e SAL+ATR ($p<0,05$). Em contrapartida, os animais tratados com CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram valores de atividade semelhantes aos controles SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM. Na comparação entre os grupos intoxicados foi observada diferença somente entre o grupo CPF+ATR+2-PAM, que apresentou maior atividade da enzima, em relação aos grupos CPF ($p<0,05$) e CPF+ATR ($p<0,05$).

Dados semelhantes sobre a atividade da ChE plasmática das amostras coletadas em 30 minutos e 1 hora após a administração dos antídotos foram observados nos animais tratados com CPF ou SAL. A ANOVA realizada para as amostras do grupo de 30 minutos demonstrou diferença significativa ($F_{(7,32)}=7,415$; $p<0,01$) em relação aos diferentes esquemas de tratamento. A análise post hoc evidenciou que no tempo de 30 minutos a atividade da enzima, assim como para o grupo de 15 minutos, se mostrou menor nos animais CPF e CPF+ATR em relação aos seus respectivos controles SAL ($p<0,01$) e SAL+ATR ($p<0,01$). Em contrapartida, os animais CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram valores de atividade semelhantes aos controles SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM. Quando comparados os grupos intoxicados entre si foi observada diferença entre o grupo CPF+2-PAM, que apresentou maior atividade da enzima, em relação aos grupos tratados somente com CPF ($p<0,01$) ou com CPF+ATR ($p<0,01$).

A análise das amostras do grupo de 1 hora também demonstrou diferença significativa ($F_{(7,27)}=13,53$; $p<0,01$) entre os diferentes tratamentos. A análise post hoc evidenciou que, de maneira muito semelhante às dosagens relativas ao grupo de tempo de 15 minutos e 30 minutos, a atividade da enzima se mostrou reduzida nos animais CPF e CPF+ATR em relação aos seus respectivos grupos controle SAL ($p<0,01$) e SAL+ATR ($p<0,05$). Em contrapartida, os animais tratados com CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM não apresentaram diferença estatística em relação aos controles SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM. Entre os grupos intoxicados foi observada diferença entre o grupo CPF+ATR+2-PAM, que apresentou maior atividade da enzima, em relação aos grupos CPF ($p<0,01$) e com CPF+ATR ($p<0,01$).

O padrão dos resultados passou a se modificar e a se mostrar muito similar entre os grupos cujas amostras de sangue foram coletadas após 2, 3, 4 e 24 horas da administração dos antídotos ATR e/ou 2-PAM nos animais tratados com CPF ou SAL.

O grupo de 2 horas demonstrou diferença significativa ($F_{(7,29)}=9,504$; $p<0,01$) entre os diferentes esquemas de tratamento realizados. Nesse grupo, a análise post hoc evidenciou baixa atividade da enzima nos animais dos grupos CPF e CPF+ATR em relação aos seus controles SAL ($p<0,05$) e SAL+ATR ($p<0,01$). Diferentemente do que ocorreu até o tempo de 1 hora, no grupo de 2 horas a atividade da enzima também se mostrou reduzida nos animais tratados com CPF+2-PAM em relação ao seu respectivo grupo controle SAL+2-PAM ($p<0,05$). Já o grupo CPF+ATR+2-PAM não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle SAL+ATR+2-PAM.

Padrões de atividade muito semelhantes entre os tratamentos foram observados nos tempos de 3, 4 horas e 24 horas, onde todos os grupos intoxicados com CPF apresentaram baixa atividade quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL

Os dados da atividade da AChE cerebral encontram-se representados na figura 20, assim como estão disponíveis na tabela do Anexo 5.

O gráfico representa a atividade da enzima nos grupos SAL ou CPF, nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas ou 24 horas após o tratamento com os antídotos (ATR e/ou 2-PAM).

A comparação entre os grupos em função dos tempos de decapitação dos animais foi feita por ANOVA de uma via seguida pela análise post hoc pelo teste de Tukey.

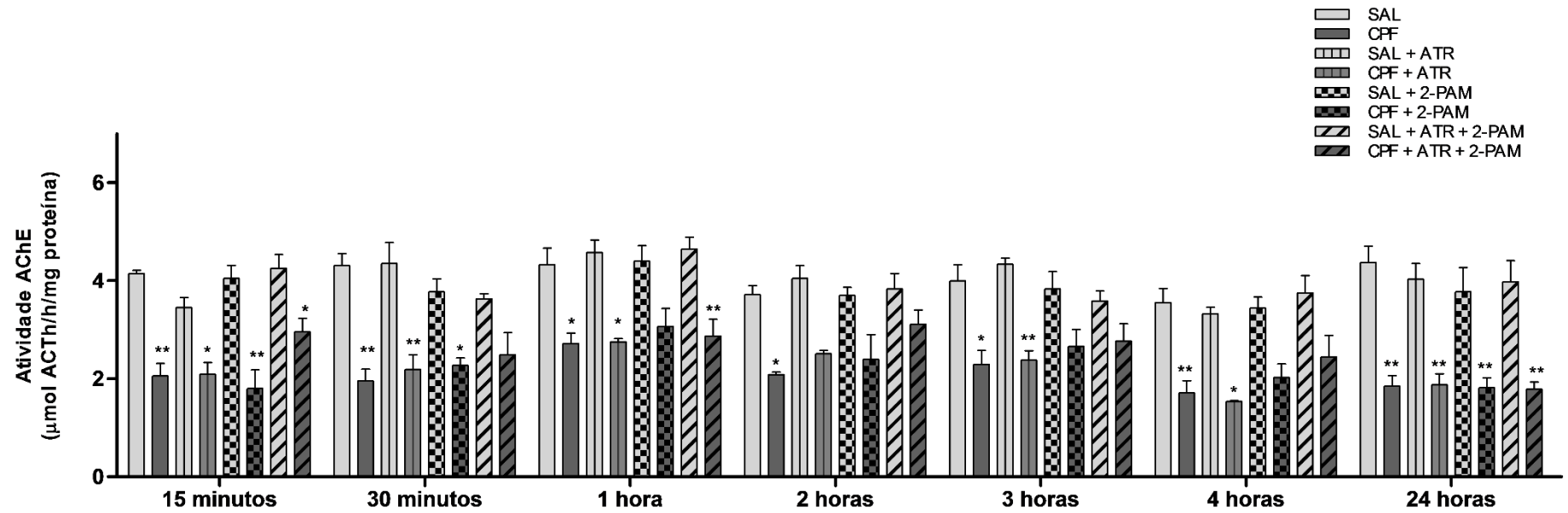


Figura 20: Atividade da acetilcolinesterase cerebral de ratos salina (SAL) e clorpirifós (CPF) antes e após o tratamento com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença dos grupos intoxicados (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) em relação aos seus grupos controle (SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM, respectivamente).

Nos resultados referentes às amostras coletadas após 15 minutos da administração dos antídotos ATR e/ou 2-PAM nos animais tratados com CPF ou SAL, a ANOVA demonstrou diferença estatística entre os diferentes esquemas de tratamento ($F_{(7,31)}=14,54$, $p<0,01$). A análise post hoc evidenciou baixa atividade em todos os animais que receberam CPF, seja ele administrado individualmente ou associado a algum tratamento. Os grupos CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram baixo valor de atividade quando comparados aos seus respectivos controles SAL ($p<0,01$), SAL+ATR ($p<0,05$), SAL+2-PAM ($p<0,01$) e SAL+ATR+2-PAM ($p<0,05$), respectivamente.

O mesmo padrão de resultados foi observado quando determinada a atividade da AChE cerebral nas amostras coletadas em 30 minutos e 1 hora após a administração dos antídotos nos animais tratados com CPF ou SAL.

No tempo de 30 minutos, ficou demonstrada diferença estatística ($F_{(7,29)}=10,70$; $p<0,01$) entre os diferentes esquemas de tratamento. A análise post hoc evidenciou baixa atividade enzimática nos animais que receberam CPF, CPF+ATR e CPF+2-PAM quando comparados aos seus respectivos grupos controle SAL ($p<0,01$) e SAL+ATR ($p<0,01$) e SAL+2-PAM ($p<0,05$).

O grupo de 1 hora, também demonstrou diferença estatística ($F_{(7,26)}=7,582$; $p<0,01$) entre os tratamentos. O post hoc, de forma semelhante ao grupo de 30 minutos, também evidenciou baixa atividade da enzima nos animais que receberam a administração de CPF, CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus respectivos grupos controle SAL ($p<0,05$) e SAL+ATR ($p<0,05$) e SAL+ATR+2-PAM ($p<0,01$), respectivamente.

Nos tempos de 2, 3 e 4 horas, o padrão dos resultados passou a se modificar. Em 2 horas, foi demonstrada diferença significativa ($F_{(7,27)}=5,860$; $p<0,01$) entre os tratamentos e o post hoc evidenciou que a atividade da enzima se mostrou baixa nos animais tratados com CPF quando comparado ao seu respectivo grupo controle SAL ($p<0,05$). Em contrapartida, os animais tratados com CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram valores de atividade que não diferiram estatisticamente dos seus controles SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM, sendo que o grupo CPF+ATR+2-PAM apresentou um valor de atividade relativamente maior quando comparado aos grupos

tratados somente com o CPF e com CPF+ATR, apesar de não diferirem estatisticamente.

Diferença estatística entre os diferentes tratamentos também foi observada no tempo de 3 horas ($F_{(7,28)}=6,439$; $p<0,01$). Quando realizada comparação entre os tratamentos, foi evidenciado que a atividade da enzima se mostrou menor nos animais CPF e CPF+ATR em relação aos seus respectivos grupos controle SAL ($p<0,05$) e SAL+ATR ($p<0,01$). Em contrapartida, os animais tratados com CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram valores de atividade que não diferiram estatisticamente dos seus controles SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM.

Padrão de atividade muito semelhante entre os tratamentos foi observado no tempo de 4 horas, onde os grupos CPF e CPF+ATR apresentaram baixa atividade em relação aos seus respectivos grupos controle, diferente do observado para os grupos CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM.

A análise demonstrou diferença significativa para o grupo de 24 horas ($F_{(7,31)}=14,56$; $p<0,01$). Neste tempo, observou-se um padrão semelhante ao observado no início do tratamento, onde todos os animais intoxicados apresentaram baixa atividade enzimática quando comparados aos seus controles.

4.4 VALIDAÇÃO DE TÉCNICA DE ANÁLISE DOS ORGANOFOSFORADOS, ATROPINA E PRALIDOXIMA

O método de análise para identificação e quantificação dos compostos de interesse foi desenvolvido tendo por base consulta de artigos previamente publicados e conhecimentos prévios acerca das características dos compostos e do equipamento a ser utilizado.

O desenvolvimento do método teve início pela otimização das energias de fragmentação e pela definição dos íons quantificador e qualificador de cada composto. Em seguida, ensaios com diferentes composições de fase móvel e diferentes rampas de gradiente foram testadas para obtenção de uma separação cromatográfica satisfatória. A tabela 4 apresenta os dados de fragmentação e TRs de cada composto.

Tabela 4: Íons de identificação, quantificação e TRs dos analitos.

Analito	Íon Precursor	Íon quantificador (m/z)	Íon qualificador (m/z)	TRs (min.)
Acefato	184	142,9	95	2,47
Atropina	290,18	124	93	3,85
Azinfós	318,02	132	77,1	6,40
Clorpirifós	349,9	197,9	97	8,53
Clorpirifós-oxon	333,96	197,9	277,8	7,25
Diazepam D5	290,1	198,1	198,1	6,62
Dimetoato	230	198,9	124,9	4,45
Etiona	385	198,9	142,9	8,43
Malationa	331,05	124,9	284,9	6,79
Metamidofós	142	94	124,9	1,89
Metidationa	302,97	145	85	6,3
Ometoato	214	124,9	182,9	2,82
Pirimifós metílico	306,11	164,1	67,1	7,68
Pralidoxima	137,1	119,1	65,4	0,95
Profenofós	372,95	302,8	344,9	8,16
Pirazofós	374,1	222	194	7,83
TPP	327,08	152	152	7,59

Após essa primeira etapa, foram realizados os ensaios de LD, LQs, especificidade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, estabilidade e *carryover*, cujos resultados são apresentados a seguir.

4.4.1 Limite de detecção e limites de quantificação

O LD e o LIQ atenderam a proposta do método, sendo obtidos bons resultados quando testadas concentrações menores que as previstas inicialmente. O LSQ não foi testado até o limite de linearidade, considerando que as concentrações obtidas atenderam a necessidade da técnica. Essas concentrações estão representadas na tabela 5.

Tabela 5: LD, LIQ e LSQ de cada analito.

Analito	LD (ng/mL)	LIQ (ng/mL)	LSQ (ng/mL)
Acefato	1	2	1000
Atropina	0,25	0,5	50
Azinfós	2	4	2000
Clorpirifós	0,5	1	500
Clorpirifós-oxon	1	2	250
Dimetoato	1	2	1000
Etiona	1	2	1000
Malationa	1	2	1000
Metamidofós	2,5	5	2500
Metidationa	1	2	1000
Ometoato	5	10	5000
Pirimifós metílico	0,5	1	500
Pralidoxima	1	1	500
Profenofós	1	2	1000
Pirazofós	2,5	5	2500

4.4.2 Especificidade

As análises das amostras branco (não adicionadas de padrões internos) e das amostras zero (com a adição dos padrões internos), não mostraram interferência na análise dos analitos de interesse.

A Figura 21 mostra um cromatograma de uma amostra de sangue total adicionada dos analitos de interesse e padrões internos na concentração que corresponde ao CQM livre de interferentes.

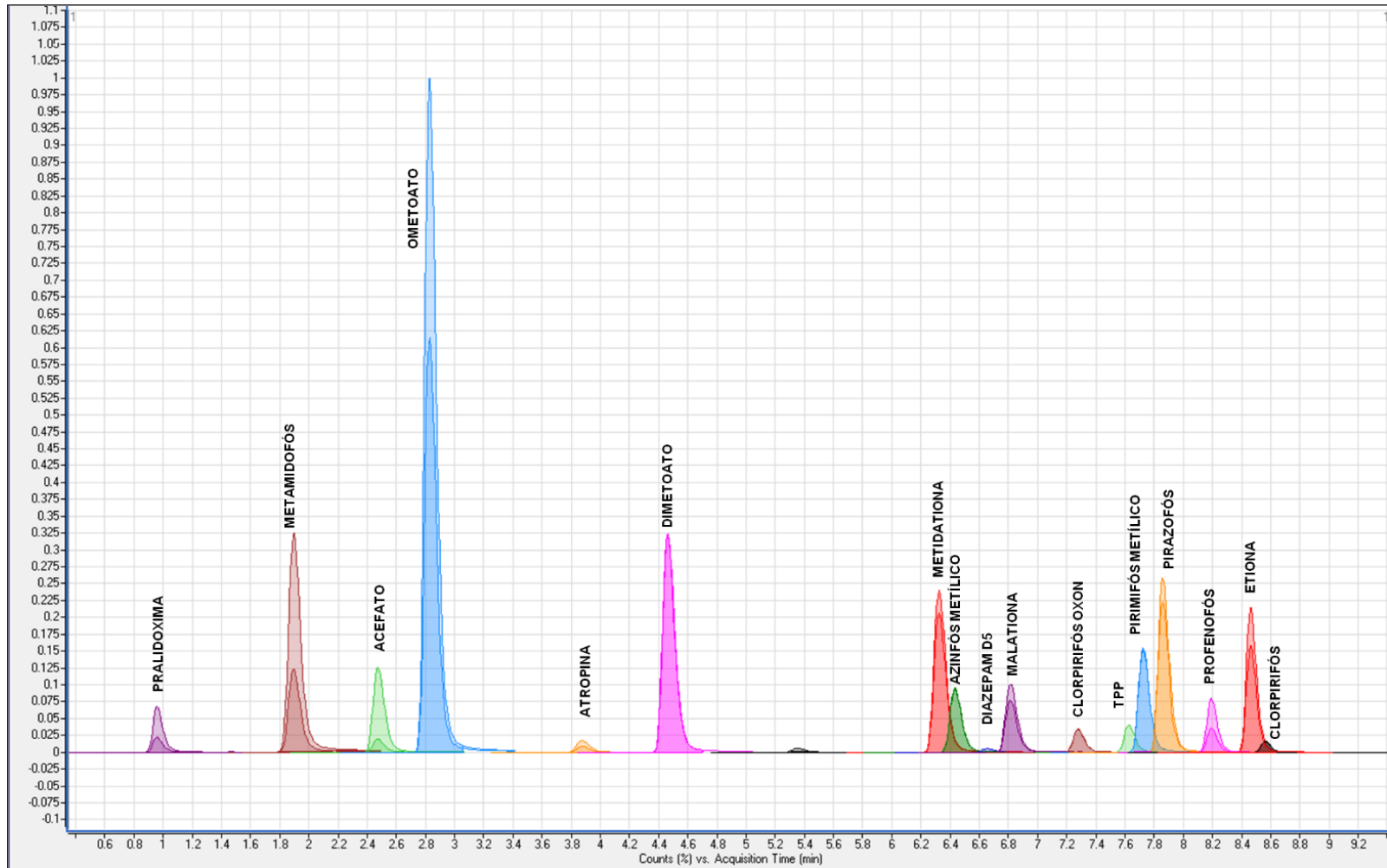


Figura 21: Cromatograma de uma amostra de sangue total adicionada dos analitos de interesse e padrões internos na concentração correspondente ao controle de qualidade médio (CQM).

4.4.3 Efeito Matriz

A maioria dos compostos sofreu baixa a moderada supressão pelo efeito matriz o que, contudo, não se apresentou como uma limitação do método, haja visto os baixos valores de LD e LIQ obtidos e não influenciados pelo efeito matriz.

Os resultados podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6: Recuperação média (%) e efeito matriz (%) de cada analito.

Analito	Recuperação Média (%)	Efeito matriz (%)
Acefato	96,99	-24,0
Atropina	83,12	-21,6
Azinfós	88,76	-23,1
Clorpirifós	93,49	12,7
Clorpirifós-oxon	84,32	-29,55
Dimetoato	103,0	-3,4
Etiona	102,2	14,7
Malationa	96,0	-11,48
Metamidofós	103,3	-4,6
Metidationa	92,5	-0,82
Ometoato	102,5	-20,8
Pirimifós metílico	87,11	-1,14
Pralidoxima	100,7	-22,5
Profenofós	101,4	-10,5
Pirazofós	80,81	-34,2

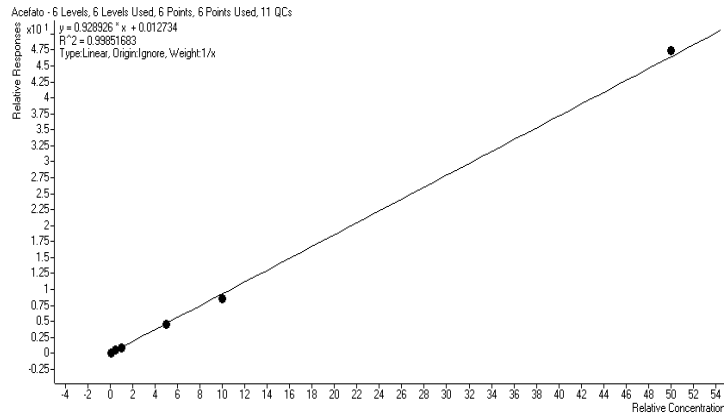
4.4.4 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas utilizando-se padrões internos conforme descrito na tabela 7. A mesma tabela apresenta a faixa de linearidade e os coeficientes de determinação (r^2) de todos os compostos analisados. Percebe-se que todos os coeficientes de determinação estão de acordo com o critério de aceitação do método, ou seja, $r^2 \geq 0,99$.

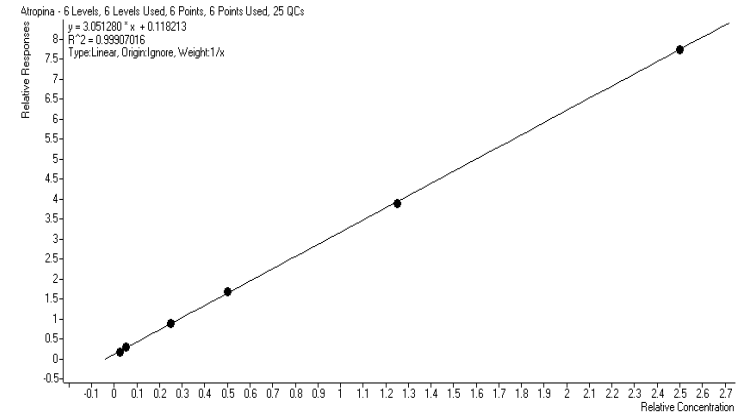
Tabela 7: Padrões internos, faixa de linearidade e coeficiente de determinação de cada analito.

Analito	Padrão interno	Linearidade	
		Faixa de linearidade (ng/mL)	Coefficiente de determinação (r^2)
Acefato	TPP	2 - 1000	0,998
Atropina	Diazepam D5	0,5 - 50	0,999
Azinfós	TPP	4 - 2000	0,998
Clorpirifós	TPP	1 - 500	0,996
Clorpirifós-oxon	TPP	2 - 200	0,996
Dimetoato	TPP	2 - 1000	0,999
Etiona	TPP	2 - 1000	0,996
Malationa	TPP	2 - 1000	0,998
Metamidofós	TPP	5 - 2500	0,999
Metidationa	TPP	2 - 1000	0,999
Ometoato	TPP	10 - 5000	0,999
Pirimifós metílico	TPP	1 - 500	0,996
Pralidoxima	Diazepam D5	1 - 500	0,993
Profenofós	TPP	2 - 1000	0,997
Pirazofós	TPP	5 - 2500	0,998

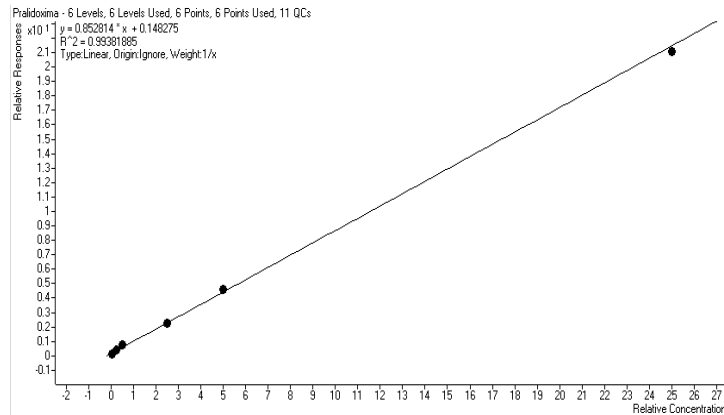
As figuras 22, 23, 24, 25 e 26 apresentam as curvas de calibração de cada analito.



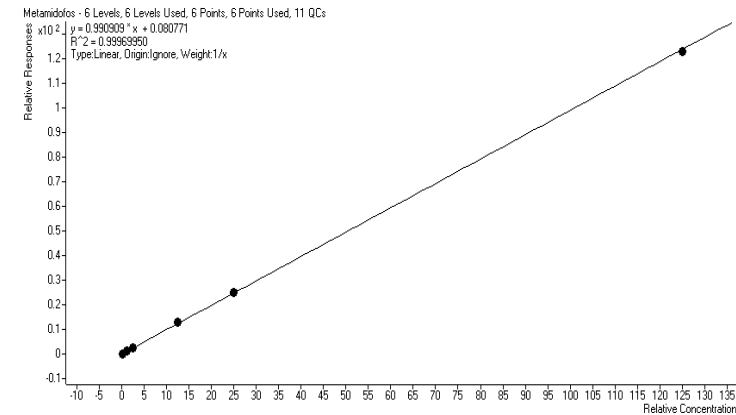
ACEFATO



ATROPINA

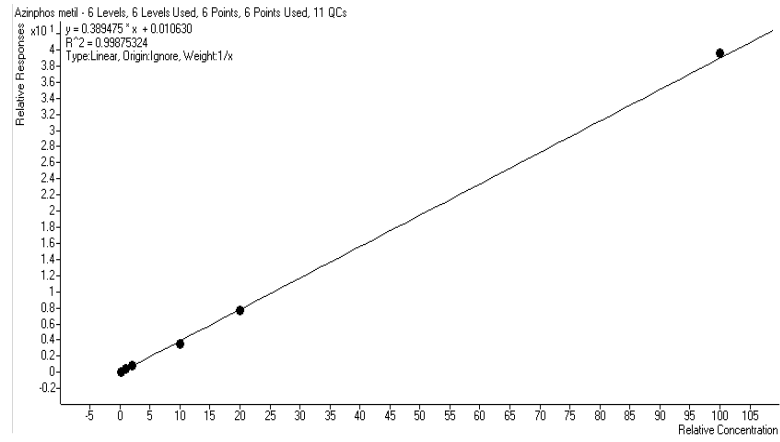


PRALIDOXIMA

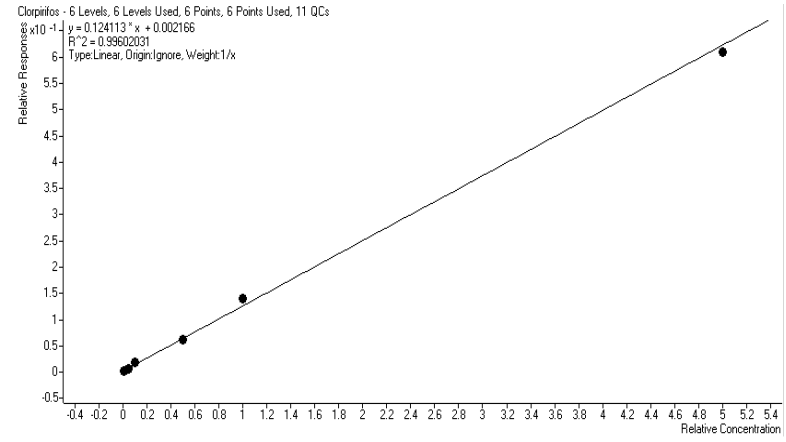


METAMIDOFÓS

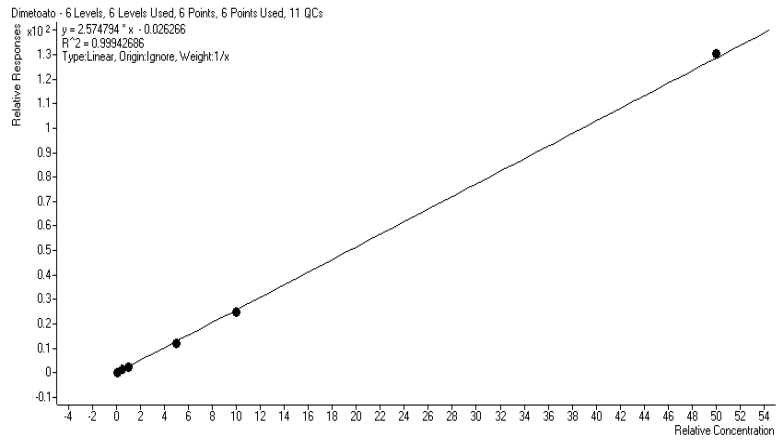
Figura 22: Curvas de calibração de acefato, atropina, pralidoxima e metamidofós.



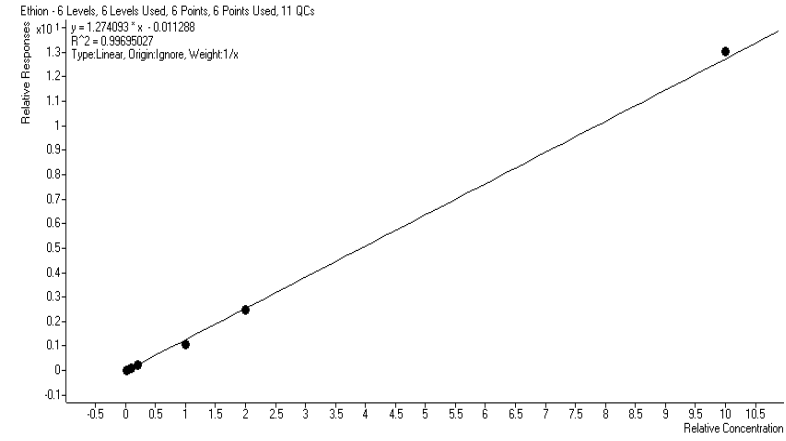
AZINFÓS METÍLICO



CLORPIRIFÓS



DIMETOATO



ETIONA

Figura 23: Curvas de calibração de azinfós, clorpirifós, dimetoato e etiona.

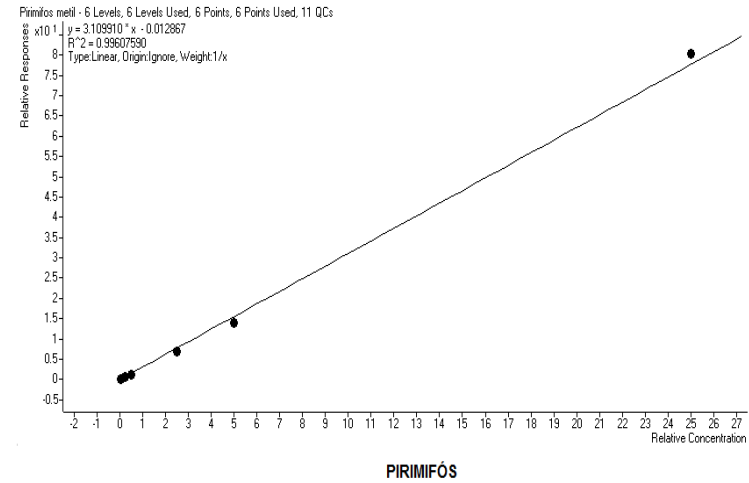
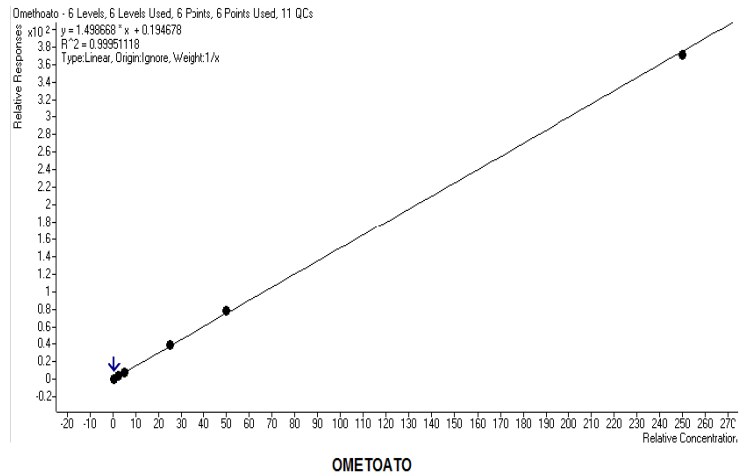
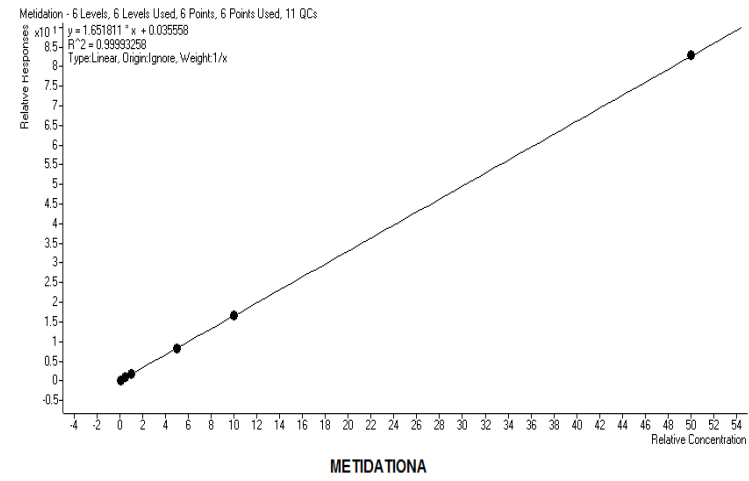
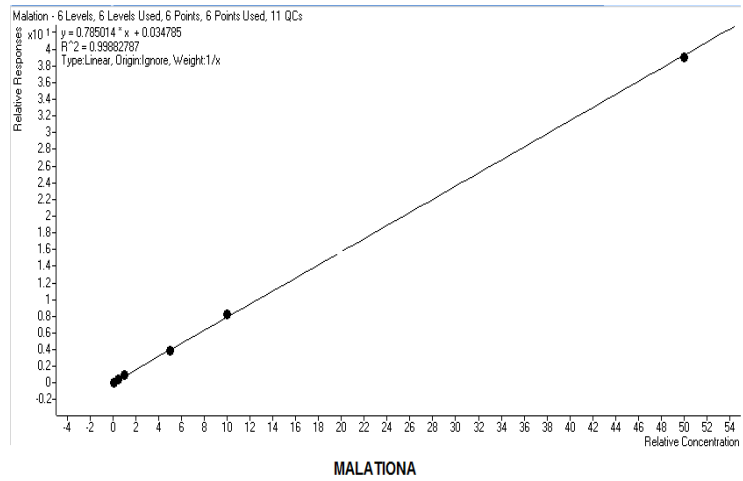


Figura 24: Curvas de calibração de malationa, metidationa, ometoato e pirimifós.

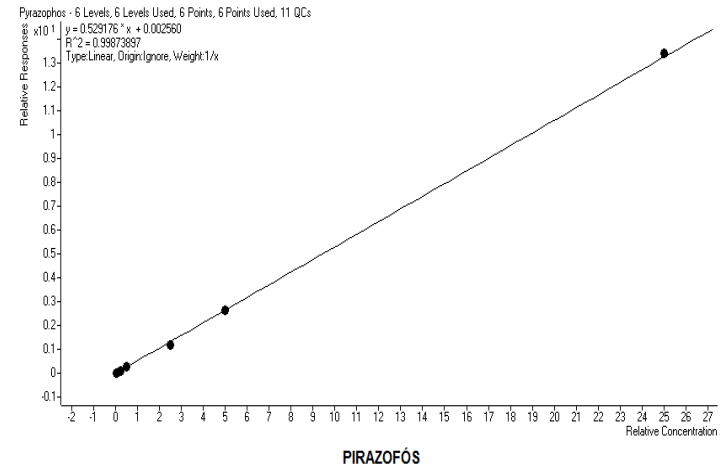
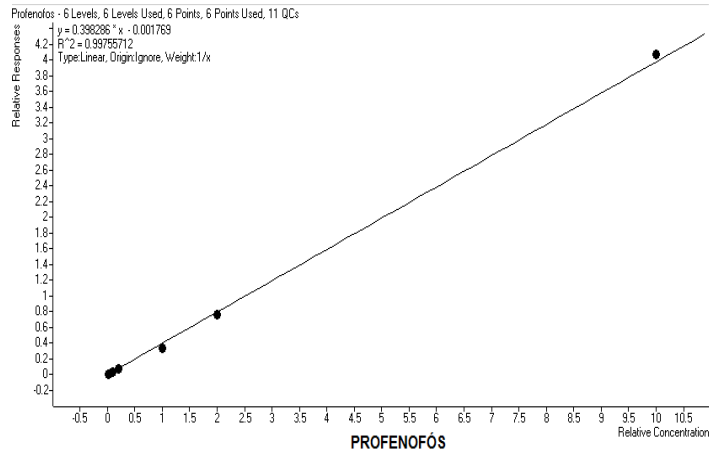


Figura 25: Curvas de calibração de profenofós e pirazofós.

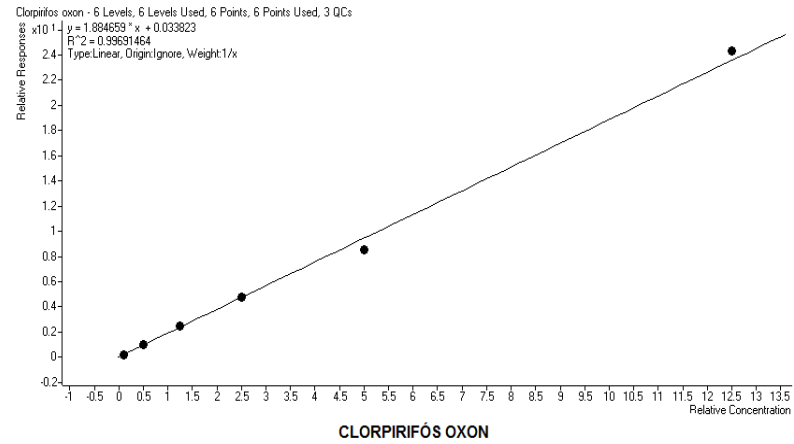


Figura 26: Curva de calibração do clorpirifós oxon.

4.4.5 Efeito residual (*Carryover*)

Não foi verificada a presença de positividade para quaisquer dos analitos nas amostras branco analisadas logo após a injeção do calibrador mais alto, indicando que não foi detectado efeito *carryover* para o método.

4.4.6 Precisão

O ensaio de precisão apresentou resultados satisfatórios, ou seja, de acordo com os limites estabelecidos pelo guia adotado na realização deste estudo (BRASIL, 2012). Os valores de precisão intra-ensaio variaram de 1,55% (dimetoato) a 14,6% (clorpirifós), enquanto os valores de precisão inter-ensaio variaram de 3,96% (atropina) a 17,18% (clorpirifós).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão (intra e inter-ensaio).

Tabela 8: Precisão Intra-ensaio e Inter-ensaio.

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão (CV%)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Acefato	6	9,13	9,61
	500	2,19	8,02
	800	4,92	8,36
Atropina	1,5	7,31	8,40
	20	5,64	6,29
	40	4,00	3,96
Azinfós	12	7,86	10,00
	1000	4,12	9,75
	1600	4,71	7,15
Clorpirifós	3	14,6	17,18
	250	8,05	12,55
	400	7,88	11,86
Clorpirifós-oxon	5	13,34	9,54
	120	12,00	11,24
	200	8,15	11,14
Dimetoato	6	8,55	9,16
	500	1,55	8,94
	800	8,27	9,80
Etiona	6	6,86	9,37
	500	8,79	13,50
	800	8,63	11,31
Malationa	6	7,88	12,78
	500	3,75	6,98
	800	11,33	10,04
Metamidofós	15	10,63	9,92
	1250	5,61	8,68
	2000	10,40	11,95

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão (CV%)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Metidationa	6	8,59	10,12
	500	1,78	7,52
	800	7,38	7,67
Ometoato	30	10,10	10,60
	2500	4,36	8,59
	4000	7,99	9,06
Pirimifós metílico	3	8,76	15,32
	250	9,91	8,79
	400	13,75	14,31
Pralidoxima	3	12,29	13,92
	250	4,08	7,43
	400	4,55	6,39
Profenofós	6	3,96	10,87
	500	6,06	10,49
	800	5,07	12,82
Pirazofós	15	9,08	10,80
	1250	2,94	4,40
	2000	6,72	8,75

4.4.7 Exatidão

Os valores de exatidão intra-ensaio, calculados como porcentagens das concentrações teóricas variaram de 82,8% (pirimifós metílico) a 113,5% (Pralidoxima).

Os valores de exatidão inter-ensaio, variaram de 84,9% (pirimifós metílico) a 112,7% (atropina). A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de exatidão.

Tabela 9: Exatidão Intra-ensaio e Inter-ensaio.

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Exatidão (% bias)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Acefato	6	101,1	101,9
	500	103,6	101,8
	800	105,8	106,4
Atropina	1,5	111,7	112,7
	20	111,1	112,6
	40	110,9	109,9
Azinfós	12	97,4	99,0
	1000	110,0	108,0
	1600	109,3	109,7
Clorpirifós	3	108,8	108,8
	250	103,0	101,4
	400	109,6	109,9
Clorpirifós-oxon	5	87,3	83,8
	120	99,4	93,9
	200	93,3	90,9
Dimetoato	6	101,9	103,0
	500	107,2	105,8
	800	107,6	107,5
Etiona	6	105,1	105,5
	500	106,1	103,7
	800	95,05	95,66
Malationa	6	101,2	101,6
	500	111,8	110,4
	800	111,7	111,6
Metamidofós	15	109,1	108,5
	1250	103,7	103,7
	2000	109,6	108,6

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Exatidão (% bias)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio
Metidationa	6	94,0	94,9
	500	106,0	104,6
	800	106,5	106,2
Ometoato	30	102,6	103,5
	2500	103,7	103,4
	4000	107,0	106,9
Pirimifós metílico	3	82,84	84,9
	250	101,6	101,7
	400	103,6	101,9
Pralidoxima	3	113,5	111,6
	250	105,7	105,1
	400	109,5	109,9
Profenofós	6	107,6	108,4
	500	103,3	102,0
	800	108,6	107,3
Pirazofós	15	88,9	90,21
	1250	95,7	95,9
	2000	102,6	103,6

4.4.8 Recuperação

Os valores de recuperação média obtidos variaram de 80,81% (pirazofós) a 103,3% (metamidofós) e podem ser visualizados na tabela 6.

4.4.9 Estabilidade

Todos os analitos, principalmente os OFs, demonstraram baixa estabilidade de curta duração (à temperatura ambiente) e satisfatória estabilidade de

congelamento/descongelamento, o que reforça a necessidade do armazenamento das amostras a baixas temperaturas.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada pela re-injeção dos extratos, os quais, em sua maioria, apresentaram excelente estabilidade em até 72 h após extraídos. As exceções foram o CPF-oxon e a malationa. A malationa apresentou muito baixa estabilidade de curta duração, assim como o CPF-oxon não apresentou bons resultados nos ensaios de estabilidade de curta duração, em 48 horas e em 72 horas).

4.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO CLORPIRIFÓS E DO CLORPIRIFÓS-OXON

O método devidamente validado foi utilizado para análise das amostras de sangue total coletadas. As primeiras amostras analisadas foram as dos animais que receberam CPF, sem nenhum tratamento adicional. Um exemplo de cromatograma obtido a partir destas análises pode ser visualizado a seguir.

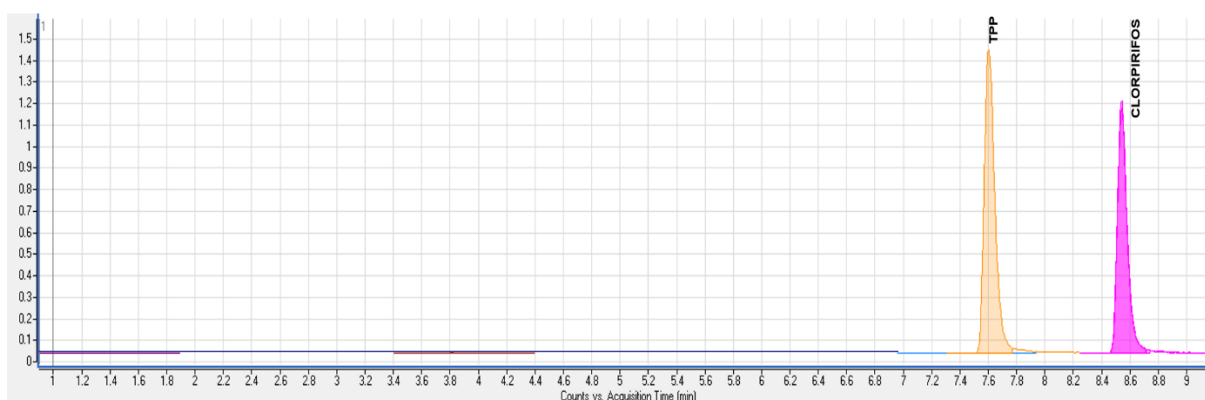


Figura 27: Cromatograma de uma amostra de sangue total coletada dos animais do grupo intoxicado com CPF adicionada do padrão interno TPP.

As amostras que apresentaram problemas quanto ao aspecto (coagulação) do sangue ou aquelas que não foram coletadas em quantidade suficiente foram descartadas.

As concentrações médias obtidas podem ser visualizadas na tabela do Anexo 6. A figura 28 ilustra a cinética do CPF. A comparação entre os tempos de decapitação dos animais e a concentração de CPF detectada nas amostras de sangue foi realizada por ANOVA de uma via seguida pela análise post hoc pelo teste de Tukey.

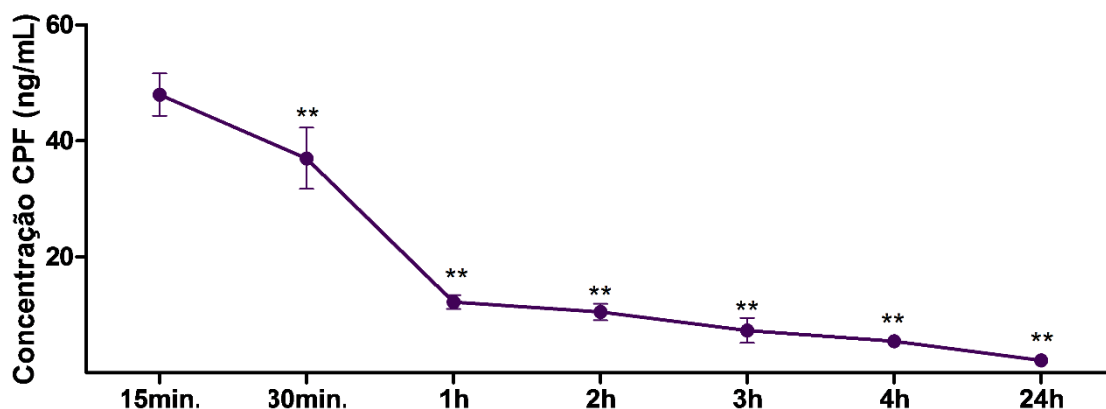


Figura 28: Concentração de CPF (média \pm EPM) no sangue de ratos tratados agudamente com CPF 30 mg/Kg e decapitados nos tempos preconizados de 15 minutos (n=3), 30 minutos (n=3), 1 hora (n=5), 2 horas (n=4), 3 horas (n=4), 4 horas (n=3) e 24 horas (n=4), onde ** $p < 0,01$ indica diferença entre o tempo inicial (15 minutos) em relação aos demais.

A ANOVA realizada demonstrou diferença significativa ($F_{(6,19)}=141,7$) entre as concentrações detectadas nos diferentes tempos avaliados. A análise post hoc evidenciou diminuição das concentrações de CPF no sangue a partir do tempo de 15 minutos em relação a todos os demais tempos avaliados: 30 minutos ($p < 0,01$), 1 hora ($p < 0,01$), 2 horas ($p < 0,01$), 4 horas ($p < 0,01$) e 24 horas ($p < 0,01$).

Portanto, no sangue, fica claro que a concentração de CPF no sangue após administração via i.p. sofre extensa queda até o tempo máximo de 24 horas, quando a quantidade observada no sangue foi chega a $2,18 \pm 0,26$ ng/mL.

Para essas amostras, também foi pesquisada a presença do CPF-oxon, metabólito ativo do CPF. No entanto, este composto não foi identificado em nenhuma das amostras pesquisadas, independentemente do tempo em que foram coletadas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O CPF foi quantificado no sangue dos animais intoxicados por método analítico desenvolvido neste trabalho. O método analítico, atendeu a todos os parâmetros recomendados pela Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA, demonstrando resultados satisfatórios de LD, LQs, especificidade, efeito matriz, linearidade, *carryover*, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

O método de Inoue e colaboradores (2007) se assemelha ao utilizado no presente trabalho ao realizar extração líquido-líquido com acetonitrila a baixa temperatura seguida de análise por HPLC na análise de OFs, entretanto, difere quanto aos analitos pesquisados, fase móvel utilizada e condições cromatográficas.

Abbara e colaboradores (2008) validaram método semelhante ao utilizado neste trabalho por utilizar acetonitrila na precipitação de proteínas e posterior análise por LC-MS/MS, mas difere quanto à fase móvel, quanto às condições cromatográficas utilizadas e quanto aos analitos pesquisados.

Apesar deste trabalho se basear no método de Abbara e colaboradores (2008), que trata da identificação dos tratamentos utilizados na intoxicação, sua inovação consiste no acréscimo da identificação de OFs e metabólito em uma só análise.

Conforme previsto, foi comprovada a possibilidade de validação de método analítico capaz de identificar e quantificar, de forma conjunta, CPF e seu metabólito ativo, CPF-oxon, ATR e 2-PAM, além de mais 11 OFs: acefato, azinfós metílico, dimetoato, etiona, malationa, metamidofós, metidationa, ometoato, pirimifós metílico, profenofós e pirazofós, totalizando 15 analitos.

Amostras de sangue analisadas pelo método validado em LC/MS-MS, demonstraram que o CPF permanece por pouco tempo em sua forma inalterada no sangue. Seu rápido decréscimo de concentração no sangue provavelmente está associado à sua biotransformação. O CPF é metabolizado muito rapidamente através dos citocromos P450, em especial, pelo CYP3A4, CYP2B6 e CYP2C19 (CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010; RISHER; NAVARRO, 1998). Essa biotransformação origina um composto intermediário instável que pode sofrer dessulfuração ou dearilação (CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010). A dessulfuração dá origem ao CPF-oxon,

enquanto que a dearilação dá origem ao 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), assim como ao dietilfosfato e dietilfosforotioato, metabólitos mais polares excretados na urina (CROOM; WALLACE; HODGSON, 2010; SMITH et al., 2009). Além disso, o CPF-oxon pode sofrer hidrólise provavelmente por uma esterase-A, dando também origem ao TCP (BRZAK et al., 1998).

A diminuição da presença do CPF inalterado no sangue pode estar também associada à sua distribuição para os tecidos, considerando seu alto volume de distribuição (NOLAN et al., 1984). Após atingir os tecidos, a eliminação do CPF é órgão-dependente, e devido a sua lipofilicidade, é mais lenta nos tecidos com maior presença de gordura (meia-vida de 62 horas) (RISHER; NAVARRO, 1998).

Em um estudo com cinco voluntários humanos, Griffin e colaboradores (1999) relataram tempos de meia-vida para a exposição oral e dérmica ao CPF de 15,5 horas e 30 horas, respectivamente. Essas taxas foram calculadas em função dos níveis dos metabólitos dietilfosfato e dietiltiofosfato na urina (GRIFFIN et al., 1999). Em um estudo semelhante, Nolan e colaboradores (1984) observaram uma meia-vida de eliminação de 27 horas, tanto por via dérmica, quanto oral, com base nos níveis urinários de TCP.

Considerando a diminuição gradativa do CPF no sangue e seu valor praticamente insignificante no tempo de 24 horas, talvez fossem esperados níveis altos de CPF-oxon, devido à metabolização do OF. No entanto, esse metabólito não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Isso pode estar associado ao fato do CPF-oxon degradar-se de forma extremamente rápida no sangue (SULTATOS, 1991). Sultatos (1991) relatou que o CPF-oxon, quando presente em concentração de 10 a 75 μM no sangue de ratos, possui uma meia-vida de somente 4 a 6 minutos.

Brzak e colaboradores (1998) ao proporem método para análise e quantificação de CPF, CPF-oxon e TCP por cromatografia gasosa, observaram que o CPF-oxon sofre degradação a TCP durante a preparação e análise da amostra. O autor afirma que o CPF-oxon está susceptível à rápida hidrólise no sangue de ratos, com meia-vida de apenas 10 segundos (BRZAK et al., 1998). Essa susceptibilidade à hidrólise por parte do CPF-oxon, inclusive se reflete em sua baixa estabilidade em todos os ensaios realizados em relação a esse parâmetro.

Logo, considerando que neste estudo, o menor intervalo entre a intoxicação dos animais com CPF e sua decapitação foi de 1h15min., justifica-se a ausência do CPF-oxon nessas amostras.

No entanto, no presente estudo, apesar do CPF ter sofrido intensa diminuição de seus níveis plasmáticos ao longo do tempo e apesar do CPF-oxon possuir meia-vida extremamente curta, a inibição das ChEs plasmática e cerebral foi demonstrada em diferentes proporções até o tempo máximo de 24 horas.

Essa inibição se deve ao fato do CPF-oxon se ligar à ChE inativando-a através de uma ligação covalente, sendo essa inibição somente cessada quando ocorre a reativação da enzima, seja pelo uso de reativadores de colinesterase; ou quando o organismo produz novas ChEs. Desse modo, em animais que não tenham recebido o tratamento com reativadores, resta somente a restauração da função enzimática a partir da síntese de novas ChEs, o que ocorre para a AChE das hemácias apenas a cada 90 a 120 dias e no cérebro, cumprindo uma meia-vida de 5 a 7 dias, o que demonstra que a renovação das ChEs não é um evento que ocorre em intervalos curtos de tempo (PAGANA; PAGANA, 2005; VOICU et al., 2010a).

Desse modo, a determinação da atividade da ChE plasmática indicou que o CPF promoveu seu efeito anticolinesterásico, típico da toxicidade dos OFs (CASIDA; DURKIN, 2013). A inibição da ChE plasmática se mostrou evidente em todos os grupos tratados com CPF e CPF+ATR, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (SAL e SAL+ATR, respectivamente), sendo observada desde a primeira hora da intoxicação até 24 horas após.

A 2-PAM mostrou-se eficiente em produzir seu efeito restaurador da enzima, à nível sérico, frente à inibição causada pela administração intraperitoneal de CPF. Essa eficiência mostrou-se mais proeminente nos primeiros momentos de sua administração. Os animais intoxicados com CPF e tratados com 2-PAM quando decapitados somente 15 minutos após esse tratamento já apresentaram valores da atividade da ChE semelhantes aos seus grupos controle (que não receberam o OF). Em contrapartida, os animais intoxicados que não receberam o tratamento com 2-PAM (CPF e CPF+ATR) mostraram uma baixa atividade da ChE quando comparados aos seus respectivos grupos controle (SAL e SAL+ATR), o que evidencia a eficiência da 2-PAM enquanto restauradora da atividade da enzima.

Esse mesmo padrão de atividade da ChE pôde ser visualizado nos grupos intoxicados com CPF e tratados com 2-PAM quando decapitados em até 1 hora após o tratamento com a oxima.

No entanto, nos animais intoxicados com CPF tratados com 2-PAM que foram decapitados 2, 3, 4 e 24 horas após o tratamento, percebeu-se uma baixa eficácia do efeito reativador da 2-PAM. Ou seja, a administração de uma única dose de 40 mg/Kg de 2-PAM foi eficiente em promover a reativação da ChE plasmática somente até a primeira hora da sua administração, não mantendo seu efeito a partir desse período.

Sabe-se que, de um modo geral, as oximas são susceptíveis à decomposição no organismo sendo, portanto, rapidamente eliminadas (meia-vida de 1 a 2 horas) (VOICU et al., 2010b). Essa rápida eliminação do organismo, assim como a distribuição para os tecidos, pode explicar em parte a perda da eficácia na reativação da enzima inibida observada neste estudo a partir da segunda hora da administração da 2-PAM.

Por outro lado, estudo de Cavaliere e colaboradores (1996) quando da intoxicação de ratos com paraoxon e tratamento com 2-PAM em doses baixas por 4 dias, demonstrou eficácia da 2-PAM na reativação enzimática mesmo 24 horas após intoxicação e tratamento.

De qualquer modo, o observado no presente estudo está de acordo com o recomendado pela literatura médica no sentido da administração lenta e contínua de 2-PAM diante de uma intoxicação por OFs, a fim de se manter uma concentração plasmática constante e eficiente do fármaco (OLSON, 2014).

Diferente do observado quando determinada a atividade da ChE plasmática, a atividade da AChE cerebral se mostrou diminuída em todos os grupos de animais intoxicados com CPF nos tempos de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora, independente do tratamento realizado (ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM). Deste modo, observa-se que à nível cerebral, mesmo nos animais intoxicados que receberam a 2-PAM como tratamento, esse fármaco não foi capaz de reverter a inibição causada.

Paralelamente, observa-se que a partir do tempo de 2 horas, os animais intoxicados que receberam a 2-PAM como antídoto apresentaram uma atividade ligeiramente maior que aqueles avaliados em tempos anteriores, sendo que os grupos CPF+2-PAM

e CPF+ATR+2-PAM passaram a não apresentar diferença significativa em relação aos seus grupos controle (SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM). Apesar de não apresentarem diferença significativa, foi demonstrado que a atividade nesses grupos intoxicados tratados com 2-PAM e ATR+2-PAM não se equiparou em nenhum momento aos seus grupos controle, permanecendo abaixo desses. Esse perfil se manteve até quando avaliados em 4 horas após o tratamento, o que nos leva à conclusão de que a 2-PAM demora um tempo consideravelmente maior para realizar alguma ação no SNC quando comparado ao sistema periférico (sangue).

De fato, periféricamente, a reativação da enzima foi observada desde os primeiros 15 minutos após o tratamento e centralmente, esta reativação, foi observada somente após 2 horas. Além disso, mesmo tendo sido observada no cérebro, a reativação da AChE não foi similar à observada no sangue, visto que, em nenhum momento, a atividade da AChE cerebral dos animais intoxicados foi equivalente aos animais controle.

Uma hipótese para explicar esse fato está nas características da 2-PAM e do CPF, assim como a interação dessas drogas com as barreiras fisiológicas do organismo, em especial com a barreira hematoencefálica (BHE) (DEMAR et al., 2010).

A BHE é composta por uma camada de células endoteliais altamente especializadas, que separam o sangue em circulação e o líquido extracelular do cérebro (LI; EHRICH, 2013; MERCEY et al., 2012). Entre as células endoteliais são encontradas proteínas denominadas *tight junctions* (TJs) que consistem principalmente de ocludinas, claudinas e zona occludens (ZO) (LI; EHRICH, 2013). Receptores de potencial transitório (Trp's), também estão presentes na membrana e são importantes na regulação do influxo celular de cálcio (LI; EHRICH, 2013). Por meio de toda esta arquitetura, a BHE regula o transporte de fármacos, íons, aminoácidos, proteínas e peptídeos, para controle da composição do fluido intersticial cerebral (YANG et al., 2001).

Acredita-se que de todas as drogas conhecidas, apenas 5% penetrem na BHE de maneira a produzir efeitos no SNC, o que demonstra sua alta seletividade (VOICU et al., 2010b). Moléculas pouco polares, como o CPF, são capazes de difundir-se facilmente através da BHE por livre difusão e deste modo inibir a AChE centralmente (MERCEY et al., 2012). Yang e Aschner (2003) afirmam que a glicoproteína-P,

importante no transporte de algumas moléculas hidrofóbicas através da membrana, não desempenha nenhum papel na mediação da passagem do CPF através da BHE, reforçando a teoria de que o CPF atravessa a BHE por difusão simples (YANG; ASCHNER, 2003).

Por outro lado, moléculas polares não são comumente transportadas de forma eficaz pelo mecanismo de simples difusão, como é o caso da 2-PAM, visto que as oximas são compostos catiônicos permanentemente carregados (SAKURADA et al., 2003). Sakurada e colaboradores (2003), por exemplo, determinaram que a penetração de 2-PAM no estriado cerebral é de somente 10% da concentração extracelular sanguínea de ratos *in vivo* através da técnica de microdiálise com HPLC-UV. Ainda segundo o autor, o transporte das oximas através da barreira no estriado é dependente de Na⁺, o que indica a participação de um transporte ativo através de bomba de Na⁺ específica (KARASOVA et al., 2010; SAKURADA et al., 2003).

O estudo de Sakurada foi realizado sem a presença de um OF, entretanto, acredita-se que o CPF, por si só, possua a capacidade de gerar alterações reversíveis na BHE, nas primeiras horas da intoxicação pelo OF, aumentando a permeabilidade da barreira devido à excitotoxicidade neuronal colinérgica (CHEN, 2012). O CPF pode ainda lesar a BHE por modificar a expressão dos genes claudin5, ZO1 e TrpC4, levando à alteração das proteínas TJs e dos receptores de potencial transiente canônicos (canais TrpC) implicando em modificações quanto à polaridade, permeabilidade, controle de fluxo de íons e estrutura da membrana (LI; EHRICH, 2013; PARRAN et al., 2005). Deste modo, a própria presença do CPF pode corroborar para aumentar a passagem da 2-PAM pela BHE.

Não se sabe qual seria a quantidade necessária de 2-PAM no cérebro para garantir sua eficácia nesse local, portanto, não é possível dizer se a penetração de somente 10% de 2-PAM, por exemplo, como verificado por Sakurada, é eficaz para a reativação da AChE bloqueada no cérebro (SAKURADA et al., 2003).

Neste estudo, por exemplo, a reativação no cérebro comparada aos grupos controle nos tempos de 2, 3 e 4 horas (momentos em que foi observada maior reativação) para os grupos CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM foi de em média 8,66 e 17,71% respectivamente, enquanto que no sangue, essa reativação para os mesmos grupos nos tempos de 15 e 30 minutos e 1 hora (momentos em que foi observada maior

reativação) foi de 63,72 e 65,28%. Se considerarmos a afirmação de que a 2-PAM chega ao SNC em somente 10% de sua disponibilidade plasmática, podemos inferir que essa pequena parcela que atinge o SNC é insuficiente para uma reativação significativa em uma dose única de 40 mg/Kg.

Entretanto, sabe-se que a passagem da 2-PAM através da BHE não é homogênea e que, portanto, pode ocorrer maior reativação em algumas áreas cerebrais em detrimento de outras, o que no caso de áreas vitais, pode significar a sobrevivência ou não do indivíduo (VOICU et al., 2010b). Como exemplo, o nível mínimo de atividade da AChE na região de ponte e bulbo necessária para a sobrevivência de animais intoxicados com OFs é na gama de 5-20%, ou seja, o uso de uma oxima que garanta essa pequena reativação, pode ser crucial para a sobrevivência do indivíduo (VOICU et al., 2010b). Segundo Voicu e colaboradores (2010), uma opção para se aumentar a reativação da AChE centralmente, seria a administração de oximas em doses mais elevadas, resultando em maiores concentrações desses fármacos a nível cerebral. Entretanto, essa medida poderia não ser aplicável, devido à alta toxicidade das oximas, em especial, da 2-PAM (VOICU et al., 2010b).

Apesar da baixa reativação da AChE cerebral encontrada no presente estudo estar de acordo com os achados de outros trabalhos, também é necessário destacar que na realização das dosagens, foi utilizado todo um hemisfério cerebral e tronco-encefálico, sendo que as áreas pouco reativadas podem ter mascarado reativações mais importantes em estruturas específicas.

Em contrapartida à grande controvérsia acerca do uso das oximas, já existe um relativo consenso a respeito do uso da ATR em intoxicações por OFs. A atropina bloqueia os efeitos colinérgicos muscarínicos centrais e periféricos causados pelo excesso de ACh nesses locais. Sua ação como antídoto ocorre de forma sinérgica à 2-PAM, visto que a ação desses fármacos em conjunto parece ser potencializada em relação a compostos administrados separadamente (VOICU et al., 2010b). Neste estudo, especificamente, não foi observada maior eficácia na administração conjunta desses fármacos, não sendo demonstrado esse efeito sinérgico no que tange à reversão dos sinais da intoxicação, nem na recuperação da ChE inibida. No entanto, ficou claramente demonstrada a eficácia dos diferentes esquemas de tratamentos na reversão de sintomas específicos.

Quando produzida a intoxicação, o CPF foi capaz de promover os sinais da síndrome colinérgica característica da toxicidade dos OFs (MALLEY, 1997). Os tratamentos com ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM foram capazes de atenuar a intensidade dessa síndrome, no que tange aos sinais observados em diferentes níveis. Sabe-se que a 2-PAM por atuar diretamente na reativação da ChE inibida pelo OF é efetiva contra sintomas nicotínicos e muscarínicos (KWONG, 2002). Já a ATR por se tratar de um antagonista não seletivo de receptores muscarínicos possui maior ação por bloqueio desses receptores no músculo liso, músculo cardíaco, glândulas exócrinas, gânglios periféricos e SNC (JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, 2014).

No SNP, os receptores muscarínicos ocorrem principalmente nas células efectoras autônomas inervadas pelos nervos parassimpáticos pós-ganglionares. Os receptores muscarínicos também estão presentes nos gânglios autonômicos e em algumas células (ex. células endoteliais vasculares) que, paradoxalmente recebem pouca ou nenhuma inervação colinérgica (BROWN; LAIKEN, 2012). No SNC, o hipocampo, córtex e tálamo possuem grandes quantidades de receptores muscarínicos (BROWN; LAIKEN, 2012). Esses receptores possuem 5 subtipos conhecidos atualmente (M_1 a M_5) (JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, 2014). Já os receptores nicotínicos estão presentes na junção neuromuscular, nos gânglios autônomos, na medula supra-renal e no SNC e podem ser de 2 tipos: muscular (N_m) que são encontrados no músculo esquelético, mediando a transmissão neuromuscular; ou neuronal (N_n), encontrados em todo SNP, SNC e também em tecidos não neuronais (BROWN; LAIKEN, 2012).

As manifestações diante de uma intoxicação por OFs estão, portanto, centradas, basicamente, nas ações sobre receptores muscarínicos e nicotínicos. Por exemplo, os sinais ataxia e tremor estão relacionados à hiperestimulação de receptores nicotínicos e muscarínicos no SNC, além do tremor também estar associado à hiperestimulação de receptores nicotínicos nos nervos motores somáticos dos músculos esqueléticos (RISHER; NAVARRO, 1998). No presente estudo a ataxia e o tremor não foram observados em animais controle e foram observados em todos os grupos intoxicados com CPF. Entre os animais intoxicados, essas manifestações ocorreram em maior intensidade naqueles que não receberam nenhum tipo de tratamento, demonstrando que os tratamentos preconizados possuem alguma eficácia na reversão dessa manifestação. Sabe-se que as drogas que atravessam a

BHE são mais eficazes em reverter sintomas do SNC que as que não atravessam (JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, 2014). Deste modo, a ATR ao possuir capacidade de atravessar a BHE, conseguindo acessar o SNC, bloqueia os receptores muscarínicos, que se encontram superativados pelo excesso de ACh nesse local, parecendo atuar dessa forma na reversão desses sinais (JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, 2014). Já a 2-PAM age majoritariamente no SNP, devido a sua dificuldade em atravessar a BHE, reativando as ChEs nos tecidos atenuando a ação da ACh sobre receptores nicotínicos e muscarínicos (BUCKLEY et al., 2013; KWONG, 2002).

A tetania não foi observada em animais controle, mas sim nos grupos intoxicados, sendo mais observada no grupo intoxicado com CPF não submetido a nenhum tratamento, apontando para uma eficácia dos tratamentos testados em relação a este parâmetro. A tetania é uma manifestação causada pela hiperestimulação de receptores N_m nos nervos motores somáticos dos músculos esqueléticos (JOKANOVIĆ; KOSANOVIĆ, 2010). Foi verificada boa reversão desse sintoma quando utilizada a 2-PAM devido à reativação das ChEs periféricamente. Também foi verificada boa reversão na intensidade desse sintoma quando utilizada a ATR. Entretanto, a literatura básica afirma que a ATR é eficiente em reverter os efeitos muscarínicos, mas não os efeitos neuromusculares nicotínicos (JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, 2014). De fato, a ATR está firmemente relacionada à reversão de sintomas muscarínicos centrais e periféricos, entretanto, dados recentes apontam para a presença de receptores muscarínicos na terminação do nervo motor em rãs (KOVYAZINA; TSENTSEVITSKY; NIKOLSKY, 2015). Os subtipos identificados seriam M_1 , M_2 , M_3 e M_4 e estariam envolvidos no controle da secreção da ACh na junção neuromuscular (KOVYAZINA; TSENTSEVITSKY; NIKOLSKY, 2015). Segundo Kovyazina e colaboradores (2015), M_1 e M_3 estariam associados ao aumento da liberação do neurotransmissor na fenda. Partindo desse princípio a ATR, ao inibir estes receptores muscarínicos na junção neuromuscular pode reverter ou atenuar a tetania por diminuição da liberação de ACh na fenda sináptica. Não se pode descartar ainda uma modulação central por receptores muscarínicos na medula espinal, razão pela qual os animais tratados com ATR e 2-PAM apresentariam também reversão mais rápida do sintoma.

A diarreia é um sintoma relacionado à ação da ACh sobre receptores muscarínicos (subtipos M₂ e M₃) (WESTFALL; WESTFALL, 2012). Estes subtipos de receptores medeiam respostas bioquímicas e elétricas através do acoplamento à proteína Gi e Gq, levando à contração dos músculos lisos gastrointestinais, aumentando a motilidade e o tônus, relaxando os esfíncteres e aumentando a secreção gástrica (MATSUYAMA et al., 2013; WESTFALL; WESTFALL, 2012). Esse sintoma também apresentou maior intensidade em animais intoxicados não submetidos a nenhum tratamento, sendo que os tratamentos testados (seja o que envolve a 2-PAM reativando as ChEs, seja o que envolve a ATR bloqueando os receptores muscarínicos) demonstraram intensidade ligeiramente menor que os não tratados.

O parâmetro lacrimejamento se mostrou mais persistente nos animais intoxicados que não receberam nenhum tipo de tratamento. Esse sinal é decorrente da hiperestimulação muscarínica (especificamente receptores M₂ e M₃) nas glândulas lacrimais, causando o aumento da secreção lacrimal. Deste modo, em relação ao parâmetro lacrimejamento, o tratamento com ATR e 2-PAM foi capaz de causar reversão do sintoma pelos mesmos mecanismos expostos anteriormente quando explanado sobre a diarreia.

A sialorreia só esteve presente em poucos animais do grupo CPF e se deu a partir de 1h15min. Trata-se de uma manifestação causada pela estimulação parassimpática vagal em receptores muscarínicos do subtipo M₃, que causa aumento da secreção salivar (CANNARD, 2006). O tratamento com 2-PAM, reativando as ChEs e diminuindo a disponibilidade da ACh na fenda sináptica e o tratamento com ATR bloqueando receptores M₃ nas glândulas salivares constituem o princípio para a prevenção do sintoma.

A avaliação do parâmetro micção não forneceu importantes contribuições ao estudo, principalmente por se tratar de uma função fisiológica do organismo, também esperada em animais não intoxicados. A análise empregada, envolveu o número de micções e não a sua quantificação (medida em volume), o que tornou a avaliação do parâmetro inespecífica, podendo ser apontada como uma limitação deste estudo.

Deste modo, percebe-se que os diferentes sinais clínicos observados no teste de toxicidade aguda foram revertidos mais precocemente nos animais que receberam algum tipo de tratamento quando comparados àqueles que não receberam. Esses

dados estão concordantes com as dosagens das ChEs realizadas, onde os grupos intoxicados com CPF que não receberam nenhum tipo de tratamento, apresentaram maior inibição da enzima quando comparados aos grupos que receberam a 2-PAM como tratamento. Ademais, embora a ATR não possua efeito na reativação das enzimas, sua capacidade na prevenção e reversão dos sinais também foi observada, indicando que a reversão dos sintomas clínicos visualizados na manifestação colinérgica não está relacionada necessariamente à reativação das ChEs inibidas.

Fica, portanto, demonstrado que, conforme esperado, a 2-PAM não realizou reativação significativa no SNC, entretanto, sua ação periférica e central (parcial) em associação à ação antimuscarínica central e periférica da ATR foram importantes na reversão dos efeitos da intoxicação aguda por OFs.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a análise de OFs, CPF-oxon, 2-PAM e ATR, se mostrou eficiente ao que se propõe, atendendo a todas as recomendações da Resolução RDC nº 27 da ANVISA.

A intenção no desenvolvimento de um método que abrangesse mais compostos, além dos que foram utilizados no projeto, foi disponibilizar técnica validada, capaz de detectar outros OFs que futuramente podem ser objetos de estudo de outros trabalhos. Além disso, o desenvolvimento de um método amplo também está, firmemente, relacionado à cooperação firmada entre este grupo de pesquisa e o Serviço de Laboratório Médico Legal do Departamento Médico Legal da Polícia Civil, onde foi realizado todo o processo de desenvolvimento e validação.

O método desenvolvido foi adaptado para amostras humanas e tem sido utilizado no SLML na elucidação de casos suspeitos de intoxicação por agrotóxicos. Além disso, pode ser também eficiente na caracterização da intoxicação em indivíduos vivos a fim de auxiliar no diagnóstico e propiciar uma intervenção clínica adequada.

As amostras de sangue analisadas por HPLC-MS/MS demonstraram uma diminuição relativamente rápida da concentração plasmática de CPF ao longo de 24 horas, a qual está provavelmente relacionada às extensas taxas de distribuição e biotransformação do OF.

O CPF foi capaz de inibir a ChE plasmática desde a primeira hora após sua administração. A 2-PAM, quando administrada 1 hora após a intoxicação, foi eficiente na reativação da enzima inibida e essa eficiência se deu até 1 hora após sua administração, momento após o qual, não foi mais observada reativação, o que evidencia a necessidade da administração contínua da 2-PAM (por infusão) a fim de que seja mantida concentração plasmática ideal para realização de sua atividade reativadora.

O CPF também foi capaz de inibir a AChE cerebral, desde a primeira hora após sua administração, demonstrando que o CPF se distribui rapidamente pelo organismo, inclusive atingindo rapidamente o SNC. Entretanto, ao contrário do que foi observado

periféricamente, a 2-PAM não foi eficaz na reativação da ChE centralmente, sendo observada somente modesta reativação após 2 horas da administração do tratamento.

Adicionalmente, a administração da ATR não provocou alterações na atividade da ChE plasmática, nem da AChE cerebral. Ademais, apesar da administração conjunta de ATR e 2-PAM não terem demonstrado neste estudo melhores resultados em comparação aos fármacos em separado quanto à remissão dos sinais clínicos, ficou demonstrado que os tratamentos previnem ou revertem os sinais colinérgicos em diferentes níveis, sendo que suas respostas tendem a ser mais especificamente eficazes a depender do parâmetro avaliado.

Fica claro, portanto, que, apesar de toda problemática que envolve o uso dos antídotos ATR e 2-PAM, esses fármacos ainda constituem a melhor alternativa na reversão da sintomatologia do quadro de hiperstimulação colinérgica periférica, assim como na reativação das ChEs inibidas causadas por intoxicações com OFs.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABBARA, C. et al. High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 874, n. 1-2, p. 42–50, 15 out. 2008.

AMITAI, G. et al. Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Chlorpyrifos-oxon. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 293–299, ago. 1998.

ANTONIJEVIC, B.; STOJILJKOVIC, M. P. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. **Clinical medicine & research**, v. 5, n. 1, p. 71–82, mar. 2007.

ARDREY, R. E. **LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY: AN INTRODUCTION**. Huddersfield: John Wiley & Sons Ltd, 2003. v. 1

ATAPATTU, S. N.; ROSENFELD, J. M. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. **Journal of Chromatography A**, v. 1296, p. 204–213, 2013.

BEIKE, J. et al. LC-MS determination of oxydemeton-methyl and its main metabolite demeton-S-methylsulfon in biological specimens--application to a forensic case. **Journal of analytical toxicology**, v. 26, n. 5, p. 308–12, 2002.

BONO, G. F. et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Neurochemistry International**, v. 81, p. 57–62, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário oficial da união**, p. 11459–11460, 12 jul. 1989.

BRASIL. Portaria SVS/MS Nº 3, de 16 de janeiro de 1992. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 1992.

BRASIL. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2014, n. 30/01/2014, 2012.

BRASIL. Resolução RE nº 2.346 de 17/08/15 (DOU de 19/08/15). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, n. 1, p. 7–8, 2015a.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2014**. 9. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2015b.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos : Estratégia E Discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BROWN, J. H.; LAIKEN, N. Agonistas e antagonistas dos receptores muscarínicos. In: **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 219–237.

BRZAK, K. A et al. Determination of chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in rat and human blood. **Journal of analytical toxicology**, v. 22, n. 3, p. 203–10, 1998.

BUCKLEY, N. et al. Oximes for acute organophosphate poisoning. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, v. 17, n. 11, p. 1–23, 2013.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. DE. Chronic dietary risk assessment for pesticide residues in Brazilian food. **Journal of Public Health**, v. 34, n. 5, p. 526–537, 2000.

CANNARD, K. The acute treatment of nerve agent exposure. **Journal of the neurological sciences**, v. 249, n. 1, p. 86–94, 1 nov. 2006.

CARLETTI, E. et al. Aging of cholinesterases phosphorylated by tabun proceeds through O-dealkylation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 47, p. 16011–16020, 2008.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Anticholinesterase insecticide retrospective. **Chemico-biological interactions**, v. 203, n. 1, p. 221–5, 25 mar. 2013.

CAVALIERE, M. J. et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saude Publica**, v. 30, n. 3, p. 267–272, 1996.

CERILLIANT. **Certified Reference Material Certificate of Analysis for Diazepam-D5**. Disponível em: <<https://www.cerilliant.com/>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

CHEN, V. P. et al. Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. 2251–2256, 2015.

CHEN, Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 391–400, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHOWDHARY, S.; BHATTACHARYYA, R.; BANERJEE, D. Acute organophosphorus poisoning. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 431, p. 66–76, 20 abr. 2014.

CROOM, E. L.; WALLACE, A. D.; HODGSON, E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. **Toxicology**, v. 276, n. 3, p. 184–91, 29 out. 2010.

CUNHA, A. F. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição ao inseticida clorpirifós sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais em animais experimentais**. 2014. 99 f.: Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

DAVIS, M. D. et al. Semi-automated solid phase extraction method for the mass spectrometric quantification of 12 specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, and select herbicides in human urine. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 929, p. 18–26, 15 jun. 2013.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Pesticide use and poisoning among farmers from the county of Paty do Alferes , Rio de Janeiro , Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 180–186, 2004.

DEMAR, J. C. et al. Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 191–198, 2010.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid)procedure. **Clinical chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1309–13, nov. 1973.

DOLES. Bula de sistema colorimétrico para determinação da colinesterase sérica no soro ou plasma. . 2015, p. 1–4.

EATON, D. L. et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38 Suppl 2, p. 1–125, jan. 2008.

ELLMAN, G. L. et al. a New and Rapid Colorimetric of Acetylcholinesterase Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25–38, mar. 2007.

GOMEZ, R. S.; GOMEZ, M. V; PRADO, M. A. The effect of isoflurane on the release of [(3)H]-acetylcholine from rat brain cortical slices. **Brain research bulletin**, v. 52, n. 4, p. 263–7, 1 jul. 2000.

GRIFFIN, P. et al. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. **Occupational and environmental medicine**, v. 56, n. 1, p. 10–13, 1999.

GUPTA, R. C. (ED.). **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**. 1st. ed. United States of America: Academic Press, 2006.

GUTIÉRREZ VALENCIA, T. M.; GARCÍA DE LLASERA, M. P. Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion-solid phase extraction-high performance liquid chromatography with diode array detection method. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 39, p. 6869–77, 28 set. 2011.

INOUE, S. et al. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 1, p. 258–64, 9 maio 2007.

JOHN VICTOR PETER, THOMAS ISIAH SUDARSON, J. L. M. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. **Indian Journal of Critical care medicine**, v. 18, n. 11, p. 735–745, 2014.

JOKANOVIĆ, M.; KOSANOVIĆ, M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 195–201, maio 2010.

KARADE, H. N. et al. Synthesis and in vitro evaluation of bis-quaternary 2-(hydroxyimino)-N-(pyridin-3-yl)acetamide derivatives as reactivators against sarin and VX inhibited human acetylcholinesterase (hAChE). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2684–91, 1 maio 2014.

KARASOVA, J. Z. et al. Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood-brain barrier: Influence of molecular structure. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1838–1844, 2010.

KASSA, J.; SEP SOVA, V.; TUMOVA, M. A comparison of the reactivating and therapeutic efficacy of two novel oximes K378 and K458 with currently available oximes in rats and mice poisoned with sarin. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 3, p. 155–160, fev. 2014.

KOSE, A. et al. Cardiac damage in acute organophosphate poisoning in rats: effects of atropine and pralidoxime. **The American journal of emergency medicine**, v. 27, n. 2, p. 169–75, fev. 2009.

KOVYAZINA, I. V.; TSENTSEVITSKY, A. N.; NIKOLSKY, E. E. Identification of the muscarinic receptor subtypes involved in autoregulation of acetylcholine quantal release from frog motor nerve endings. **Doklady Biological Sciences**, v. 460, n. 1, p. 5–7, 2015.

KUCA, K. et al. Structure-Activity Relationship of Acetylcholinesterase Reactivators - Antidotes Against Nerve Agents. **Letters in Organic Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 212–217, 1 abr. 2007.

KWONG, T. C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. **Therapeutic drug monitoring**, v. 24, n. 1, p. 144–9, fev. 2002.

LALLEMENT, G. et al. Efficacy of atropine/pralidoxime/diazepam or atropine/Hi-6/prodiazepam in primates intoxicated by soman. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 56, n. 2, p. 325–32, fev. 1997.

LANDRIGAN, P. J. et al. Pesticides and inner-city children: exposures, risks, and prevention. **Environmental health perspectives**, v. 107 Suppl, p. 431–7, jun. 1999.

LASSITER, T. L. et al. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v. 186, n. 3, p. 241–253, 2003.

LEE, W. J. et al. Mortality among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 4, p. 528–34, abr. 2007.

LI, W.; EHRICH, M. Transient alterations of the blood-brain barrier tight junction and receptor potential channel gene expression by chlorpyrifos. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 33, n. 10, p. 1187–91, 2013.

LONDON, L. et al. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? **American journal of industrial medicine**, v. 47, n. 4, p. 308–21, abr. 2005.

LORKE, D. E. et al. Entry of oximes into the brain: a review. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 8, p. 743–53, jan. 2008.

MARRS, T. C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & therapeutics**, v. 58, n. 1, p. 51–66, jan. 1993.

MARTINS SILVA, C. E. **AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA DO SISTEMA COLINÉRGICO DE CAMUNDONGOS COM O GENE DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA (VACht) MODIFICADO GENETICAMENTE.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MATSUYAMA, H. et al. Evidence for M2 and M3 Muscarinic Receptor Involvement in Cholinergic Excitatory Junction Potentials Through Synergistic Activation of Cation Channels in the Longitudinal Muscle of Mouse Ileum. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 121, n. 3, p. 227–236, 2013.

MCHARDY, S. F. et al. Design, synthesis, and characterization of novel, nonquaternary reactivators of GF-inhibited human acetylcholinesterase. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 7, p. 1711–4, 1 abr. 2014.

MERCEY, G. et al. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. **Accounts of chemical research**, v. 45, n. 5, p. 756–66, 2012.

MUSSHOFF, F.; JUNKER, H.; MADEA, B. Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of chromatographic science**, v. 40, n. 1, p. 29–34, jan. 2002.

NAMERA, A.; YASHIKI, M.; NAGASAWA, N. Ikensic Science Ipteraatiod Rapid analysis of malathion in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. v. 88, p. 125–131, 1997.

NOLAN, R. J. et al. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 8–15, 1984.

NURULAIN, S. M. et al. Oxime-type acetylcholinesterase reactivators in pregnancy: an overview. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 3, p. 575–84, mar. 2014.

O'MALLEY, M. **Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings**The **Lancet**, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673696072224>>

ODETOKUN, M. S. et al. Quantification of dialkylphosphate metabolites of organophosphorus insecticides in human urine using 96-well plate sample preparation and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 27, p. 2567–74, 1 out. 2010.

OLSON, K. R. Inseticidas de carbamato e organofosforados. In: OLSON, K. R. (Ed.). **Manual de Toxicologia Clínica**. 6. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 285–292.

PAGANA, K. D.; PAGANA, T. J. **Guia para exames laboratoriais e de imagem para a enfermagem**. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2005. v. 11

PAPOUTSIS, I. et al. Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood--clinical and forensic toxicology applications. **Journal of forensic sciences**, v. 57, n. 3, p. 806–12, maio 2012.

PARRAN, D. K. et al. Chlorpyrifos alters functional integrity and structure of an in vitro BBB model: co-cultures of bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 77–88, 2005.

PASTUSZKO, A. Action of barbiturates on activity of acetylcholinesterase from synaptosomal membranes. **Neurochemical research**, v. 5, n. 7, p. 769–76, jul. 1980.

PETROIANU, G. A. et al. Paraoxon has only a minimal effect on pralidoxime brain concentration in rats. p. 350–357, 2007.

PETRONILHO, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Ciência e Tecnologia**, p. 3–14, 2011.

PIRES, R. G. et al. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 70, n. 2-3, p. 227–35, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RAPOSO, R. et al. Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography / mass spectrometry. p. 3187–3194, 2010.

RISHER, J. F.; NAVARRO, H. A. **Toxicological Profile for Chlorpyrifos U.S. Department of Health and Human Services**, 1998.

ROBERTS, D. M.; AARON, C. K. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 334, n. 7594, p. 629–34, 24 mar. 2007.

SAKURADA, K. et al. Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier. **Neurochemical research**, v. 28, n. 9, p. 1401–1407, 2003.

SALAZAR, V. C. R. **Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)**. 2011.187f.: Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) –Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2011.

SALM, P. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 877, n. 5-6, p. 568–74, 15 fev. 2009.

SANTOS, V. M. R. DOS et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, fev. 2007.

SHARMA, V. K. et al. High performance liquid chromatographic method for the analysis of organophosphorus and carbamate pesticides. **Forensic science international**, v. 48, p. 21–25, 1990.

SIGMA-ALDRICH. **SIGMA-ALDRICH**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

SILVA, J. H. et al. Acetylcholine release induced by the volatile anesthetic sevoflurane in rat brain cortical slices. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 25, n. 5, p. 807–18, ago. 2005.

SINGH, H. et al. A rapid cation-exchange HPLC method for detection and quantification of pyridinium oximes in plasma and tissue. **Journal of analytical toxicology**, v. 31, n. 2, p. 69–74, mar. 2007.

SINITOX. **Dados regionais de intoxicação humana no Brasil**. Disponível em: <<http://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-regionais>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

SMITH, J. N. et al. Comparative chlorpyrifos pharmacokinetics via multiple routes of exposure and vehicles of administration in the adult rat. **Toxicology**, v. 261, n. 1-2, p. 47–58, 30 jun. 2009.

SOUKUP, O. et al. The effect of oxime reactivators on muscarinic receptors: **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 364–370, 2011.

SULTATOS, L. G. Metabolic activation of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and fenitrothion by perfused rat liver. **Toxicology**, v. 68, p. 1–9, 1991.

SWGTOX. Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, 2013.

TEKES, K. et al. High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator. **Journal of chromatography. A**, v. 1122, n. 1-2, p. 84–7, 28 jul. 2006.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

TSOUKALI, H. et al. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples. Application in a suicide case by intravenous injection. **Forensic science international**, v. 143, n. 2-3, p. 127–32, 16 jul. 2004.

TSOUKALI, H. et al. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 822, n. 1-2, p. 194–200, 5 ago. 2005.

UNODC. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. New York: United Nations, 2009.

VALADÃO, P. A. C. et al. Etomidate evokes synaptic vesicle exocytosis without increasing miniature endplate potentials frequency at the mice neuromuscular junction. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 6, p. 576–582, 15 set. 2013.

VAN RIJN, C. M. et al. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the “wave of death”. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16514, jan. 2011.

VOICU, V. A et al. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 106, n. 2, p. 73–85, fev. 2010a.

VOICU, V. A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: A critical review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 719–729, 2010b.

WANG, W. et al. Efficiency of anisodamine for organophosphorus-poisoned patients when atropinization cannot be achieved with high doses of atropine. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 477–81, mar. 2014.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Neurotransmissão: os sistemas nervosos autônomo e somático motor. In: **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 171–217.

WOREK, F.; THIERMANN, H. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 249–59, ago. 2013.

YANG, J. et al. Transendothelial permeability of chlorpyrifos in RBE4 monolayers is modulated by astrocyte-conditioned medium. **Brain research. Molecular brain research**, v. 97, n. 1, p. 43–50, 2001.

YANG, J.; ASCHNER, M. Developmental aspects of blood-brain barrier (BBB) and rat brain endothelial (RBE4) cells as in vitro model for studies on chlorpyrifos transport. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 4-5, p. 741–745, 2003.

YE, M. et al. Occupational pesticide exposures and respiratory health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6442–6471, 2013.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **056/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Determinação da concentração de clorpirifós, pralidoxima e atropina e da atividade da colinesterase no plasma e no encéfalo de ratos, após intoxicação aguda com clorpirifós.**" que tem como responsável o (a) docente **Karla Nívea Sampaio**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/11/14.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 07 de novembro de 2014.

8.2 ANEXO 2

TABELA - AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA REPRESENTADOS QUANTO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO SINAL CLÍNICO OBSERVADO EM ANIMAIS CLORPIRIFÓS (CPF) OU SALINA (SAL) COM E SEM TRATAMENTO COM ATROPINA (ATR), PRALIDOXIMA (2-PAM) E ATROPINA ASSOCIADA À PRALIDOXIMA (ATR+2-PAM).

Parâmetro	Tempo	Número de animais que manifestaram os sinais clínicos							
		SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL+ ATR+ 2-PAM	CPF+ ATR+ 2-PAM
Ataxia	1 hora ^{##}	0 (n=35)	13* (n=35)	0 (n=35)	11* (n=35)	0 (n=35)	14* (n=35)	0 (n=35)	14* (n=35)
	1h15min. ^{##}	0 (n=35)	15* (n=35)	0 (n=35)	12* (n=35)	0 (n=35)	15* (n=35)	0 (n=35)	14* (n=35)
	1h30min. ^{##}	0 (n=30)	11* (n=30)	0 (n=30)	9 (n=30)	0 (n=30)	12* (n=30)	0 (n=30)	11* (n=30)
	2 horas ^{##}	0 (n=25)	9 (n=25)	0 (n=25)	6 (n=25)	0 (n=25)	7 (n=25)	0 (n=25)	6 (n=25)
	3 horas ^{##}	0 (n=20)	5 (n=20)	0 (n=20)	4 (n=20)	0 (n=20)	4 (n=20)	0 (n=20)	3 (n=20)
	4 horas [#]	0 (n=15)	3 (n=15)	0 (n=15)	1 (n=15)	0 (n=15)	4 (n=15)	0 (n=15)	1 (n=15)
	1 hora ^{##}	0 (n=35)	18* (n=35)	0 (n=35)	14* (n=35)	0 (n=35)	17* (n=35)	0 (n=35)	19* (n=35)
Tremores	1h15min. ^{##}	0 (n=35)	16* (n=35)	0 (n=35)	18* (n=35)	0 (n=35)	16* (n=35)	0 (n=35)	20* (n=35)
	1h30min. ^{##}	0 (n=30)	18* (n=30)	0 (n=30)	18* (n=30)	0 (n=30)	14* (n=30)	0 (n=30)	16* (n=30)
	2 horas ^{##}	0 (n=25)	13* (n=25)	0 (n=25)	13* (n=25)	0 (n=25)	7 (n=25)	0 (n=25)	8 (n=25)
	3 horas ^{##}	0 (n=20)	10* (n=20)	0 (n=20)	7 (n=20)	0 (n=20)	4 (n=20)	0 (n=20)	5 (n=20)
	4 horas [#]	0 (n=15)	3 (n=15)	0 (n=15)	4 (n=15)	0 (n=15)	3 (n=15)	0 (n=15)	3 (n=15)

Parâmetro	Tempo	Número de animais que manifestaram os sinais clínicos						(conclusão)	
		SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL+ ATR+ 2-PAM	CPF+ ATR+ 2-PAM
Sialorreia	1 hora [#]	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)
	1h15min. [#]	0 (n=35)	2 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)	0 (n=35)
	1h30min. [#]	0 (n=30)	2 (n=30)	0 (n=30)	0 (n=30)	0 (n=30)	0 (n=30)	0 (n=30)	0 (n=30)
	2 horas [#]	0 (n=25)	2 (n=25)	0 (n=25)	0 (n=25)	0 (n=25)	0 (n=25)	0 (n=25)	0 (n=25)
	3 horas [#]	0 (n=20)	2 (n=20)	0 (n=20)	0 (n=20)	0 (n=20)	0 (n=20)	0 (n=20)	0 (n=20)
	4 horas	0 (n=15)	2 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)

Onde 0 representa ausência do sinal e >0 representa o número de animais do grupo que manifestaram o sinal. *p<0,05 e **<0,01 indicam diferença estatística entre os grupos CPF, CPF + ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM. #p<0,05 e ##p<0,01 indicam diferença estatística entre os tratamentos para cada tempo analisado.

8.3 ANEXO 3

TABELA - AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA REPRESENTADOS QUANTO À INTENSIDADE DO SINAL CLÍNICO OBSERVADO EM ANIMAIS CLORPIRIFÓS (CPF) OU SALINA (SAL) COM E SEM TRATAMENTO COM ATROPINA (ATR), PRALIDOXIMA (2-PAM) E ATROPINA ASSOCIADA À PRALIDOXIMA (ATR+2-PAM).

Parâmetro	Tempo	Intensidade dos sinais clínicos observados							
		SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL + ATR + 2-PAM	CPF + ATR + 2-PAM
Ataxia	1 hora	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,43 ± 0,10** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,37 ± 0,09** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,49 ± 0,11** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,40 ± 0,08** (n=35)
	1h15min.	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,49 ± 0,10** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,46 ± 0,10** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,51 ± 0,13** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,46 ± 0,11** (n=35)
	1h30min.	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,50 ± 0,14** (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,30 ± 0,09 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,53 ± 0,13** (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,40 ± 0,10** (n=30)
	2 horas	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,56 ± 0,16** (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,28 ± 0,11 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,44 ± 0,16** (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,28 ± 0,11 (n=25)
	3 horas	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,45 ± 0,21** (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,20 ± 0,09 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,35 ± 0,17 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,10 ± 0,07 (n=20)
	4 horas	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,33 ± 0,21 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,07 ± 0,07 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,13 ± 0,13 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,07 ± 0,07 (n=15)
Tremores	1 hora	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,63 ± 0,09** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,49 ± 0,09** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,62 ± 0,12** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,57 ± 0,08** (n=35)
	1h15min.	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,66 ± 0,13** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,54 ± 0,09** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,59 ± 0,12** (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,63 ± 0,11** (n=35)
	1h30min.	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,80 ± 0,15** (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,57 ± 0,09** (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,52 ± 0,13** (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,60 ± 0,11** (n=30)
	2 horas	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,68 ± 0,16** (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,56 ± 0,12** (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,29 ± 0,11 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,36 ± 0,11* (n=25)
	3 horas	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,60 ± 0,20** (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,35 ± 0,11 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,16 ± 0,08 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,20 ± 0,09 (n=20)
	4 horas	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,40 ± 0,24 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,27 ± 0,12 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,07 ± 0,07 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,20 ± 0,11 (n=15)

Parâmetro	Tempo	Intensidade dos sinais clínicos observados							
		SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL + ATR + 2-PAM	CPF + ATR + 2-PAM
Sialorreia	1 hora	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)
	1h15min.	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,06 ± 0,04*	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)	0,00 ± 0,00 (n=35)
	1h30min.	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,07 ± 0,05*	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)	0,00 ± 0,00 (n=30)
	2 horas	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,08 ± 0,06*	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)	0,00 ± 0,00 (n=25)
	3 horas	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,10 ± 0,07*	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)	0,00 ± 0,00 (n=20)
	4 horas	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,13 ± 0,09**	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)	0,00 ± 0,00 (n=15)

Escore médio ± EPM. *p<0,05 e **p<0,01 indicam diferença estatística entre os grupos CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM em relação aos seus controles SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM.

8.4 ANEXO 4

TABELA - ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA DE RATOS SALINA (SAL) E CLORPIRIFÓS (CPF) COM E SEM TRATAMENTO COM ATROPINA (ATR), PRALIDOXIMA (2-PAM) E ATROPINA+PRALIDOXIMA (ATR+2-PAM) NOS TEMPOS DE 15 MINUTOS, 30 MINUTOS, 1 HORA, 2 HORAS, 3 HORAS, 4 HORAS E 24 HORAS APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO.

Tempo	Atividade da colinesterase plasmática em ratos (UI/mL)							
	SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL + ATR + 2-PAM	CPF + ATR + 2-PAM
15 minutos	1,62 ± 0,06 (n=5)	0,66 ± 0,06* (n=4)	1,68 ± 0,23 (n=4)	0,66 ± 0,13* (n=4)	1,44 ± 0,08 (n=5)	1,79 ± 0,39 (n=4)	1,30 ± 0,11 (n=4)	1,75 ± 0,17 # (n=4)
30 minutos	1,31 ± 0,26 (n=5)	0,22 ± 0,08** (n=5)	1,42 ± 0,12 (n=5)	0,35 ± 0,06** (n=5)	1,37 ± 0,21 (n=5)	1,26 ± 0,23 # (n=5)	1,06 ± 0,07 (n=4)	0,81 ± 0,14 (n=5)
1 hora	1,44 ± 0,19 (n=4)	0,32 ± 0,02** (n=5)	1,10 ± 0,05 (n=4)	0,43 ± 0,02* (n=5)	1,05 ± 0,04 (n=4)	0,83 ± 0,07 (n=4)	1,31 ± 0,23 (n=4)	1,40 ± 0,09 ### (n=5)
2 horas	1,03 ± 0,03 (n=5)	0,39 ± 0,11* (n=4)	1,35 ± 0,22 (n=4)	0,38 ± 0,09** (n=5)	1,06 ± 0,08 (n=4)	0,54 ± 0,10* (n=5)	0,91 ± 0,11 (n=5)	0,54 ± 0,02 (n=5)
3 horas	1,13 ± 0,09 (n=5)	0,20 ± 0,12** (n=5)	1,20 ± 0,03 (n=4)	0,38 ± 0,11** (n=4)	1,06 ± 0,08 (n=5)	0,54 ± 0,05** (n=4)	1,03 ± 0,06 (n=5)	0,52 ± 0,08** (n=5)
4 horas	1,25 ± 0,10 (n=5)	0,45 ± 0,10** (n=4)	1,46 ± 0,10 (n=4)	0,55 ± 0,16** (n=4)	1,66 ± 0,18 (n=4)	0,73 ± 0,10** (n=4)	1,28 ± 0,13 (n=4)	0,69 ± 0,10 (n=3)
24 horas	1,46 ± 0,09 (n=5)	0,45 ± 0,08** (n=5)	1,30 ± 0,06 (n=5)	0,49 ± 0,14** (n=5)	1,32 ± 0,12 (n=5)	0,60 ± 0,09** (n=5)	1,38 ± 0,15 (n=5)	0,49 ± 0,08** (n=5)

Os dados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 e **p<0,01 indicam diferença estatística entre os grupos intoxicados (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) em relação aos seus controles (SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM). #p<0,05 no tempo de 15 minutos e ###p<0,01 no tempo de 1 hora indica diferença estatística entre o grupo CPF+ATR+2-PAM em relação aos grupos CPF e CPF+ATR. ##p<0,01 no tempo de 30 minutos indica diferença estatística entre o grupo CPF+2-PAM em relação aos grupos CPF e CPF+ATR.

8.5 ANEXO 5

TABELA - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE RATOS SALINA (SAL) E CLORPIRIFÓS (CPF) COM E SEM TRATAMENTO COM ATROPINA (ATR), PRALIDOXIMA (2-PAM) E ATROPINA+PRALIDOXIMA (ATR+2-PAM) NOS TEMPOS DE 15 MINUTOS, 30 MINUTOS, 1 HORA, 2 HORAS, 3 HORAS, 4 HORAS E 24 HORAS APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO.

Atividade da acetilcolinesterase cerebral em ratos ($\mu\text{mol ACTh/h/mg}$ de proteína)								
Tempo	SAL	CPF	SAL + ATR	CPF + ATR	SAL + 2-PAM	CPF + 2-PAM	SAL + ATR + 2-PAM	CPF + ATR + 2-PAM
15 minutos	4,14 \pm 0,06 (n=4)	2,05 \pm 0,25** (n=5)	3,45 \pm 0,20 (n=5)	2,08 \pm 0,24* (n=5)	4,04 \pm 0,27 (n=5)	1,80 \pm 0,38** (n=5)	4,25 \pm 0,27 (n=5)	2,95 \pm 0,28* (n=5)
30 minutos	4,34 \pm 0,25 (n=5)	1,95 \pm 0,24** (n=4)	4,35 \pm 0,43 (n=5)	2,18 \pm 0,30** (n=4)	3,77 \pm 0,27 (n=5)	2,27 \pm 0,16* (n=5)	3,62 \pm 0,11 (n=5)	2,48 \pm 0,45 (n=4)
1 hora	4,32 \pm 0,33 (n=5)	2,71 \pm 0,21* (n=3)	4,57 \pm 0,26 (n=5)	2,75 \pm 0,07* (n=3)	4,39 \pm 0,31 (n=5)	3,06 \pm 0,36 (n=3)	4,64 \pm 0,25 (n=5)	2,86 \pm 0,34** (n=5)
2 horas	3,71 \pm 0,18 (n=5)	2,08 \pm 0,05* (n=4)	4,04 \pm 0,26 (n=4)	2,51 \pm 0,06 (n=3)	3,69 \pm 0,16 (n=4)	2,39 \pm 0,50 (n=5)	3,83 \pm 0,32 (n=5)	3,11 \pm 0,29 (n=5)
3 horas	3,99 \pm 0,33 (n=4)	2,29 \pm 0,28* (n=5)	4,33 \pm 0,13 (n=4)	2,37 \pm 0,19** (n=4)	3,83 \pm 0,35 (n=5)	2,66 \pm 0,34 (n=5)	3,58 \pm 0,20 (n=4)	2,77 \pm 0,35 (n=5)
4 horas	3,55 \pm 0,29 (n=4)	1,71 \pm 0,25** (n=5)	3,32 \pm 0,13 (n=4)	1,53 \pm 0,02* (n=3)	3,44 \pm 0,22 (n=4)	2,02 \pm 0,28 (n=5)	3,75 \pm 0,35 (n=5)	2,45 \pm 0,43 (n=5)
24 horas	4,37 \pm 0,33 (n=5)	1,85 \pm 0,21** (n=5)	4,03 \pm 0,32 (n=5)	1,87 \pm 0,23** (n=5)	3,77 \pm 0,49 (n=4)	1,82 \pm 0,20** (n=5)	3,97 \pm 0,43 (n=5)	1,78 \pm 0,15** (n=5)

Os dados são expressos como média \pm EPM. *p<0,05 e **p<0,01 indicam diferença estatística entre os grupos intoxicados (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) em relação aos seus controles (SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM e SAL+ATR+2-PAM).

8.6 ANEXO 6

TABELA - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DO CPF NO SANGUE DE RATOS EM AMOSTRAS COLETADAS NOS TEMPOS ESTIPULADOS NO PROTOCOLO EXPERIMENTAL, OBTIDAS POR HPLC-MS/MS.

Tempos	Concentração plasmática do CPF (ng/mL)
15 minutos (n=3)	47,98 ± 3,64
30 minutos (n=3)	36,99 ± 5,29
1 hora (n=5)	12,21 ± 2,69
2 horas (n=4)	10,51 ± 1,43
3 horas (n=4)	7,32 ± 2,15
4 horas (n=3)	5,46 ± 1,01
24 horas (n=4)	2,18 ± 0,26

Os dados são expressos como média ± EPM.