



ALEXANDRE ALVES DE CASTRO

**PROCESSO DE REMEDIAÇÃO ENZIMÁTICA
DE AGENTES DOS NERVOS: CÁLCULOS DE
ANCORAMENTO MOLECULAR E MECANISMO
DE REAÇÃO**

LAVRAS – MG

2017

ALEXANDRE ALVES DE CASTRO

**PROCESSO DE REMEDIAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DOS
NERVOS: CÁLCULOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR E
MECANISMO DE REAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Castro, Alexandre Alves de.

Processo de remediação enzimática de agentes dos nervos :
cálculos de ancoramento molecular e mecanismo de reação /
Alexandre Alves de Castro. - 2016.

150 p. : il.

Orientadora: Elaine Fontes Ferreira da Cunha.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. PTE. 2. HuPON1. 3. Acetilcolinesterase. I. Cunha, Elaine
Fontes Ferreira da. II. Título.

ALEXANDRE ALVES DE CASTRO

**PROCESSO DE REMEDIAÇÃO ENZIMÁTICA DE AGENTES DOS
NERVOS: CÁLCULOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR E
MECANISMO DE REAÇÃO**

***ENZYMATIC REMEDIATION PROCESS OF NERVE AGENTS:
MOLECULAR DOCKING AND REACTION MECHANISM CALCULATIONS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de Dezembro de 2016.

Profª. Dra. Daiana Teixeira Mancini	UFLA
Profª. Dra. Melissa Soares Caetano	UFOP
Profª. Dr. Teodorico de Castro Ramalho	UFLA

Profª. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter me guiado e por todas as oportunidades concebidas ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Auri e Maria, agradeço, pelo apoio, amor, compreensão e a confiança, durante um longo caminho até chegar aqui, e aos meus irmãos pelo incentivo.

Aos meus orientadores, professores Elaine e Teodorico, pela presença, incentivo, confiança e pela oportunidade de realizar este trabalho e outros. Agradeço, pelos diálogos e pelas valiosas dicas recebidas durante minha vida acadêmica.

A Melissa e Daiana, pela presença constante durante minha formação, sempre com as melhores contribuições para os trabalhos de pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela minha formação acadêmica.

A todos os amigos do Grupo de Química Computacional, pela amizade e convivência durante todo esse período.

A todos os meus colegas de turma 2009/02, pelos bons momentos que passamos juntos e pelo companheirismo.

Aos amigos conquistados ao longo desses anos, obrigado pelo dia a dia, por cada um contribuir a sua maneira para a minha formação.

À Capes, pelo financiamento dos recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que tiveram uma participação direta ou indireta neste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle, requires creative imagination and marks real advance in science.

Albert Einstein

RESUMO GERAL

Durante a 2ª Guerra Mundial, foram desenvolvidos agentes organofosforados (OP) com ação neurotóxica, e que serviram de base para o desenvolvimento de estruturas empregadas hoje na indústria agrícola, como pesticidas. Dentre os agentes neurotóxicos, têm-se as armas químicas Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD) e VX. A toxicidade desses compostos é decorrente da inibição da Acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina (ACh). Duas das enzimas caracterizadas com potencial de degradar OP é a Fosfotriesterase (PTE) e a Paraoxonase sérica humana 1 (HuPON1). Essas enzimas têm gerado considerável interesse para aplicações de desintoxicação rápida e completa. Em razão da importância dos métodos de biorremediação para a intoxicação causada por OP, neste trabalho, objetivou-se estudar o modo de interação dessas enzimas com diferentes agentes neurotóxicos, levando em conta as isomerias “ R_p ” e “ S_p ” para cada composto. Foram utilizadas técnicas de Docking Molecular, Modelagem por homologia, Dinâmica Molecular (MD) e QM/MM. No caso da PTE, seu centro metálico também foi modificado e, de acordo com os cálculos teóricos, trouxe benefícios em relação ao aumento de sua atividade catalítica. Para a HuPON1, em adição à enzima nativa, os cálculos também foram desenvolvidos para duas enzimas mutantes. As investigações computacionais forneceram informações importantes e relevantes para o melhor entendimento da atuação da PTE bacteriana e PON1 humana em agentes dos nervos OP.

Palavras-chave: PTE. HuPON1. Acetilcolinesterase. Agentes neurotóxicos. Docking molecular. Modelagem por homologia. Dinâmica molecular. QM/MM.

GENERAL ABSTRACT

During World War II, organophosphorus agents (OP) with neurotoxic action were developed and used as the basis for the development of structures used today in the agricultural industry, such as pesticides. Among the neurotoxic agents there are the chemical weapons Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD) and VX. The toxicity of these compounds is due to inhibition of Acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the hydrolysis of the Acetylcholine (ACh) neurotransmitter. Two of the enzymes characterized with potential to degrade OP are Phosphotriesterase (PTE) and the Human Serum Paraoxonase 1 (HuPON1). These enzymes have generated considerable interest for rapid and complete detoxification applications. Due to the importance of bioremediation methods for the intoxication caused by OP, this work aims to study the interaction of these enzymes with different neurotoxic agents, taking into account the " R_p " and " S_p " isomers for each compound. Molecular Docking, Homology modeling, Molecular Dynamics (MD) and QM/MM techniques were used. In the case of PTE, its metallic center was also modified, and according to the theoretical calculations, it brought about benefits in relation to the increase of its catalytic activity. For HuPON1, in addition to the wild-type enzyme, the calculations were also developed for two mutant enzymes. The computational investigations provided important and relevant data for a better understanding of the bacterial PTE and human PON1 performance in OP nerve agents

Keywords: PTE. HuPON1. Acetylcholinesterase. Neurotoxic agents. Molecular docking. Homology modeling. Molecular dynamics. QM/MM.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Estruturas químicas do cianeto de hidrogênio, foscênio e gás mostarda, respectivamente.	16
Figura 2 - Estrutura geral de OP.....	18
Figura 3 - Estruturas dos organofosforados Tabun, Sarin, Soman e VX.	19
Figura 4 - Estruturas dos organofosforados metamidofós, triclorfon, clorfenvinfós, malation e paration.	20
Figura 5 – Passos envolvidos na síntese e libertação de acetilcolina (ACh).	23
Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela acetilcolinesterase (AChE).	25
Figura 7 - Esquema do sítio ativo e sítio aniônico periférico (PAS) da AChE.	26
Figura 8 - Sítio ativo da AChE.	27
Figura 9 - Conversão do Paration em seu metabólito ativo Paraoxon.	28
Figura 10 - As ligações entre os grupos em vermelho são geralmente hidrolisados pela PTE.	31
Figura 11 - Diagrama de fita para a estrutura da Fosfotriesterase bacteriana.	32
Figura 12 - Estrutura do centro metálico binuclear da Fosfotriesterase (α e $\beta = \text{Zn}^{2+}$).	32
Figura 13 - Proposta do mecanismo de reação da hidrólise de OP pela PTE (α e $\beta = \text{Zn}^{2+}$) (AUBERT; RAUSHEL, 2004).	34
Figura 14 - (a) Estrutura cristalográfica da HuPON1 (b) Ambiente de coordenação do íon cálcio catalítico (Ca^{2+} -2).	36

Figura 15 – Mecanismos de reação propostos para a hidrólise de OP pela HuPON1 nativa e suas mutantes.	38
Figura 16 – Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia.	52

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1 - Proposed reaction mechanism for OP ($\alpha = \beta = \text{Zn}^{2+}$) [15].	80
Figure 2 - Structure of the organophosphorus compounds (1) Tabun, (2) Sarin, (3) Soman and (4) VX.	82
Figure 3 - H-bonds of Sarin as R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) in Zn^{2+} -PTE active site.	89
Figure 4 - H-bonds of Tabun as S_p -enantiomer in Zn^{2+} -PTE active site.	90
Figure 5 - H-bonds of VX as R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) in Zn^{2+} -PTE active site.	90
Figure 6 - H-bonds of VX as R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) in Al^{3+} -PTE active site.	92
Figure 7 - RMSD graphics for PTE- $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$	93
Figure 8 - Total energy from MD simulations.	95
Figure 9 - Overlap between both systems after MD. Zn^{2+} -PTE system is represented in blue.	96
Figure 10 - R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) of Sarin in Zn^{2+} -PTE active site.	100

ARTIGO 2

FIGURE 1 Structures of the organophosphorus compounds VX (1), Sarin (2) and Soman (3).	118
FIGURE 2 Potent reaction mechanisms followed by the wild-type HuPON1 and its mutants.	120

FIGURE 3 Multiple alignment among 1V04, 3SRG and HuPON1 sequences. The “*” indicate the identical residues and “:” similar residues. The “----” indicate the missing residues in the 3D structures of the templates.	128
FIGURE 4 (a) 3D structure of the modeled enzyme (b) Ramachandran graph for modeled HuPON1, where the most favorable regions are shown in red, the allowed in yellow, the generously allowed in light yellow and the not allowed in white. Triangles represent the glycine residues and the squares are all other amino acid residues.	129
FIGURE 5 The best poses of VX inside the active cavity after docking (a) wild-type HuPON1 (b) H115Y mutant and (c) V346W mutant.	131
FIGURE 6 The best pose of the VX- <i>S_p</i> in active site of the V346W mutant after docking. The key residues of the active site were reported.	133
FIGURE 7 H-bonds of VX- <i>R_p</i> (a) and VX- <i>S_p</i> (b) in active site of the wild-type HuPON1 after docking.	134
FIGURE 8 H-bonds of VX- <i>R_p</i> (a) and VX- <i>S_p</i> (b) in active site of the H115Y mutant after docking.	135
FIGURE 9 H-bond of VX- <i>S_p</i> in active site of the V346W mutant after docking.	136

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Table 1 -** Docking results for Sarin, Soman, Tabun and VX inside the Zn²⁺-PTE active site.87
- Table 2 -** Experimental results and relative activation energy values for Zn²⁺-PTE with 4 different nerve agents.....97
- Table 3 -** Relative activation energies ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for Al³⁺-PTE with 4 different nerve agents. 102

ARTIGO 2

- TABLE 1** Docking results for VX in the R_p and S_p conformations in the wild-type and mutant HuPON1 active site. 132
- TABLE 2** Relative activation energies ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for VX- R_p and VX- S_p in the wild-type and mutant HuPON1 active site..... 137
- TABLE 3** Relative values taken from the most favorable reaction pathway for VX in the R_p and S_p conformations in the wild-type and mutant HuPON1 active site. 140

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Agentes Químicos de Guerra	15
2.2	Compostos Organofosforados (OP)	17
2.3	Acetilcolina	21
2.4	Acetilcolinesterase	24
2.5	Processos de biorremediação: Enzima Fosfotriesterase (PTE)	30
2.6	Paraoxonase sérica humana 1 (HuPON1)	36
2.7	Química Computacional	40
2.7.1	Considerações gerais	41
2.7.2	Modelagem molecular	42
2.7.2.1	Ancoramento molecular	44
2.7.2.2	Dinâmica Molecular	47
2.7.2.3	Modelagem por homologia	49
2.7.3	Princípios de Quântica	53
2.7.3.1	Teoria do Funcional de Densidade (DFT)	55
2.7.4	QM/MM	57
	REFERÊNCIAS	63
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	77
	ARTIGO 1 - MOLECULAR DOCKING, METAL SUBSTITUTION AND HYDROLYSIS REACTION OF CHIRAL SUBSTRATES OF PHOSPHOTRIESTERASE	77
	ARTIGO 2 - ASYMMETRIC BIOCATALYSIS OF THE NERVE AGENT VX BY HUMAN SERUM PARAOXONASE 1: MOLECULAR DOCKING AND REACTION MECHANISM CALCULATIONS	115

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As chamadas armas químicas surgiram e começaram a ser utilizadas durante a 1ª Guerra Mundial. As mesmas são baseadas na toxicidade das substâncias químicas que as constituem, sendo tais compostos capazes de provocar danos aos seres vivos e ao meio ambiente, até mesmo provocar a morte (GUIDOTTI; TRIFIRO, 2016). Os agentes de guerra química e biológica constituem uma classe de armas não convencionais, de mais baixo custo e mais difícil detecção. O químico alemão Fritz Harber teve grande participação no desenvolvimento desse tipo de armas durante esse período (ECOBICHON, 2001; FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

Já, na 2ª Guerra Mundial, é intensificado o uso de armas químicas com a descoberta dos compostos organofosforados (OP), sendo essas substâncias agentes neurotóxicos, cuja principal característica é sua toxicidade aguda, atuando no sistema nervoso central e periférico (ROMERO, 2016). Os agentes neurotóxicos OP são potentes inibidores da Acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), realizando, dessa forma, a terminação da transmissão dos impulsos nervosos (GUIDOTTI; TRIFIRO, 2016). O acúmulo de ACh na sinapse conduz à conhecida Síndrome Colinérgica, podendo levar à morte em poucos minutos dependendo do grau de intoxicação. Esses compostos são ésteres do ácido fosfórico, sendo líquidos incolores à temperatura ambiente (ECOBICHON, 2001).

Os OP são empregados na indústria agrícola como pesticidas por várias décadas. O uso inadequado desses agroquímicos pode gerar prejuízos na agricultura e pecuária (CHEN et al., 2016). A extensiva utilização de pesticidas representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento,

refletido nos inúmeros casos de intoxicações relatados, principalmente àqueles com economias baseadas na agricultura e no agronegócio (EPA's PESTICIDE PROGRAM, 2002). Estima-se que milhões de agricultores sejam intoxicados anualmente, no mundo e que mais de 355 mil mortes sejam causadas em consequência da exposição a agrotóxicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

As armas químicas mais tóxicas são os agentes dos nervos letais Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD) e VX (ECOBICHON, 2001). Apesar de existirem programas de defesa contra o uso de armas químicas, existe uma ameaça real, decorrente do fato de vários países possuírem grandes estoques dessas armas. Logo, neste projeto, objetivou-se a investigação teórica de mecanismos capazes de degradar esses agentes, sendo esses processos de significativo interesse. Nesta linha, técnicas de biorremediação têm-se mostrado promissoras para uma desintoxicação eficiente do envenenamento causado por esses agentes neurotóxicos.

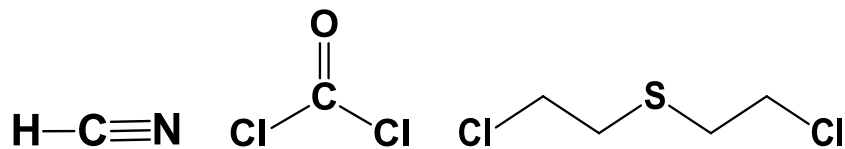
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agentes Químicos de Guerra

Um composto bastante utilizado em guerras foi o agente mostarda, que não se trata de um composto organofosforado, recebendo esse nome, em decorrência, supostamente, do cheiro ou gosto (cebola, alho ou mostarda) e coloração (SZINICZ, 2005). Sua primeira utilização ocorreu em 12 de junho de 1917, em um ataque alemão contra as tropas britânicas, nas trincheiras de Ypres, Bélgica e, assim, a mostarda também ficou conhecida como Iperita. Alguns meses após o primeiro ataque, ambos os lados estavam utilizando o agente mostarda. Sua introdução ocorreu no último ano da 1ª Guerra e provocou 70% da vitimização por armas químicas, os outros 30% foram causadas por cloro e fosgênio (SZINICZ, 2005).

Foram mais de 180 mil, o número de soldados britânicos vítimas da guerra química, em que 88,5% das vítimas se devem à exposição ao agente mostarda e, 2,65% destes morreram. Entre os soldados americanos, mais de 36 mil foram vitimados, em razão da exposição aos agentes químicos de guerra, em que 75% se devem à exposição a esse agente (CHAUHAN et al., 2008; SZINICZ, 2005). O agente mostarda foi amplamente empregado como arma química de guerra, porém, atualmente não tem emprego industrial. Outros agentes utilizados durante a 1ª Guerra foram o fosgênio e o cianeto de hidrogênio (SZINICZ, 2005). As estruturas químicas do cianeto de hidrogênio, fosgênio e gás mostarda estão representados na figura a seguir.

Figura 1 - Estruturas químicas do cianeto de hidrogênio, fosgênio e gás mostarda, respectivamente.



Fonte: SZINICZ (2005).

Armas químicas são definidas como qualquer substância química cujas propriedades tóxicas são utilizadas com a finalidade de matar, ferir ou incapacitar algum inimigo na guerra ou associado a operações militares (SMART, 1997). Essas substâncias têm sido utilizadas nas guerras, desde tempos remotos, como, por exemplo, em 600 a.C., em que os atenienses envenenavam as águas de um rio com raiz de Heléboro, e os inimigos consumiam a água e apresentavam intensa diarreia. Mas foi a partir da 1ª Guerra Mundial que essas armas ganharam a conotação de armas de destruição em massa, pois foram amplamente utilizadas com a finalidade de provocar injúrias e/ou mortes (COLASSO; AZEVEDO, 2011; SMART, 1997).

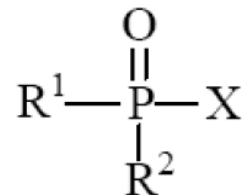
Diversos países possuem arsenal de agentes químicos, a despeito do esforço legislativo do mundo, para seu banimento, sob a Convenção de Armas Químicas, que entrou em vigor no ano de 1997. No entanto, a fabricação desses agentes não pode ser totalmente proibida, pois alguns têm potencial para uso industrial. Além disso, apesar de medidas de correção tomadas até o momento e a condenação de sua utilização no mundo, há uma grande facilidade na sua fabricação (COLASSO; AZEVEDO, 2011). Além dessas armas químicas, temos os compostos organofosforados (OP), que são conhecidos pela alta toxicidade que apresentam, sendo assim também classificados como agentes químicos de guerra.

2.2 Compostos Organofosforados (OP)

Os primeiros OP foram preparados por alquimistas na Idade Média, mas seu estudo sistemático teve início no século XIX, por Lassaigne, em 1820, com a esterificação do ácido fosfórico. Vinte e cinco anos mais tarde, uma série de derivados de fosfinas foi preparada por Thinard e colaboradores, e a partir desses trabalhos o progresso da investigação dos compostos de fósforo foi rápido (TOY, 1976). Seu desenvolvimento, a partir da segunda metade do século XIX, foi dominado por Michaelis, sendo sucedido por A. E. Arbuzov e, mais tarde, pelo seu filho B. A. Arbuzov, além de pesquisadores britânicos e alemães. A descoberta das propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos, por Shrader e colaboradores, em 1930, criou novos compostos OP nas indústrias (STODDART, 1979). A química dessas substâncias foi estudada, em 1949, por G. M. Kosolapoff e trabalhos mais recentes podem ser encontrados na literatura de Coffey.

A estrutura geral dos OP está representada na figura a seguir (FIGURA 2), sendo que R^1 e R^2 são radicais arila ou alquila, e X pode ser representado por diversos grupos como, por exemplo, halogênios, alifático, aromáticos, etc., ligados diretamente ao átomo de fósforo. Os agentes neurotóxicos OP ficaram conhecidos, em razão de seus usos em ataques terroristas, como o que ocorreu no metrô de Tóquio, no Japão, em 19 de março de 1995, onde foi utilizado o gás Sarin (MUNRO et al., 1999; SHIH; KAN; MCDONOUGH, 2005), e mais recentemente na Síria, em 2013, onde houve ataques terroristas nos arredores de Damasco, também utilizando o gás Sarin (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016).

Figura 2 - Estrutura geral de OP.

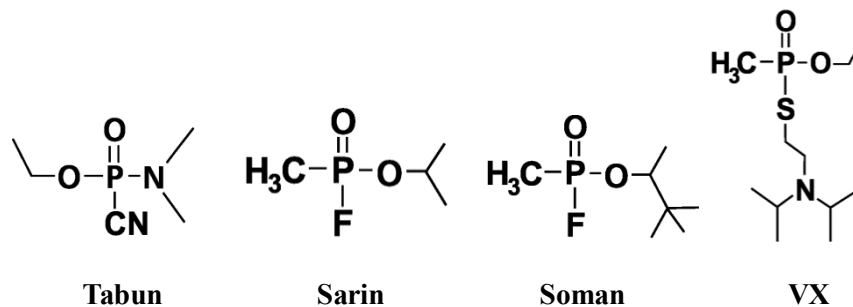


Fonte: STODDART (1979).

Os compostos de fósforo trivalentes são bons agentes redutores por causa da forte reatividade dos pares de elétrons não ligantes e da facilidade de formação da ligação P=O e, por isso, OP são rapidamente oxidados por oxigênio, ozônio, peróxidos e outros agentes oxidantes (FISHER; VAN WAZER, 1897). As diferentes atividades de OP estão relacionadas, evidentemente, com características estruturais, tais como o tipo de heteroátomo ou grupo funcional ligado ao átomo de fósforo e a seu estado de oxidação (STODDART, 1979).

Os agentes neurotóxicos OP são potenciais agentes químicos de guerra e armas de terrorismo, sendo conhecidos como os agentes mais mortais das armas químicas (MARTIN; LOBERT, 2003). Em 1854, foi sintetizado o primeiro OP, conhecido como TEPP (tetraetilpirofosfato). Em 1937, foi desenvolvida a fórmula geral dos OP e sintetizado o Sarin (GB) e Tabun (GA), bem como houve o desenvolvimento de outros agentes neurotóxicos (CHAUHAN et al., 2008). Estima-se que a Alemanha tenha fabricado cerca de 12 mil toneladas desses agentes na 2ª Guerra Mundial. Apresentam o nome químico, e duas letras do código OTAN – agentes da série G (Germany) e série V (“venomous” – venenosos) (SMART, 1997). Os principais representantes dessa classe são: Tabun (GA); Sarin (GB); Soman (GD) e o agente VX (FIGURA 3).

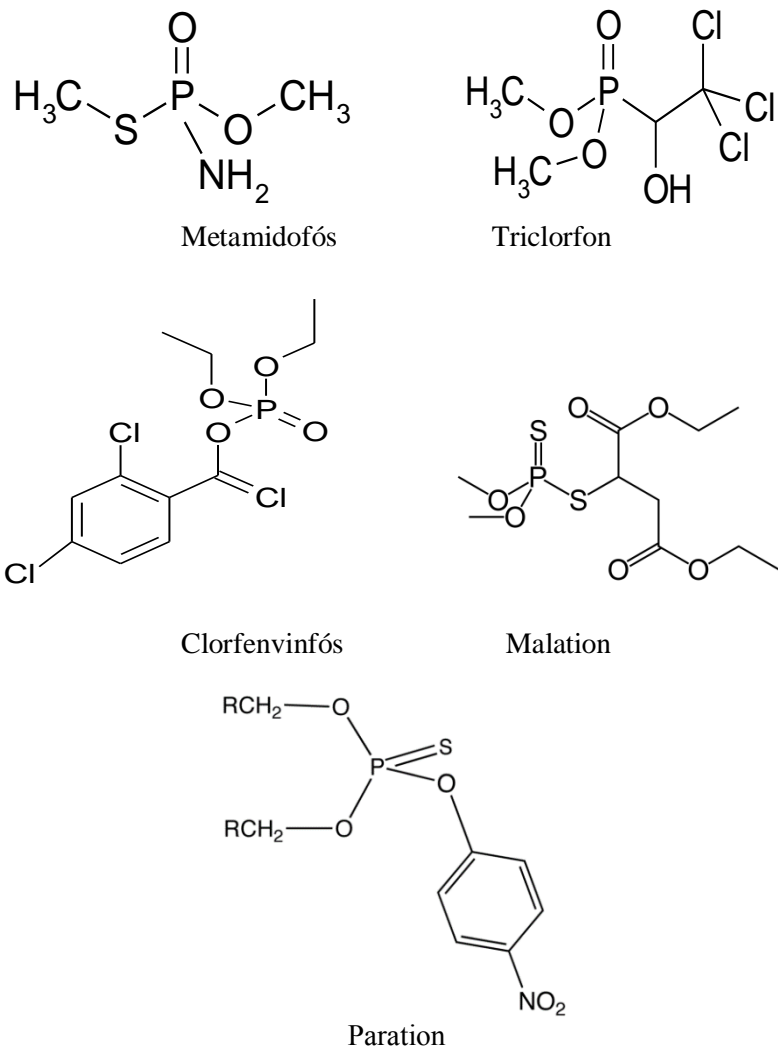
Figura 3 - Estruturas dos organofosforados Tabun, Sarin, Soman e VX.



Fonte: De Castro et al. (2016).

Compostos OP também fazem parte de um grupo de substâncias amplamente utilizadas como inseticidas na agricultura, como anti-helmínticos ou no controle de ectoparasitas em algumas espécies domésticas. Dentre os OP disponíveis no mercado, encontram-se os metamidofós, triclorfon, clorfenvinfós, malation e paration (BARBOSA et al., 2005; OSWEILER, 1998), como representados na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas dos organofosforados metamidofós, triclorfon, clorfenvinfós, malation e paration.



Fonte: Barbosa et al. (2005).

Esses produtos são rapidamente absorvidos por ingestão, inalação, absorção percutânea e pela conjuntiva (RADOSTITIS et al., 2000), sendo que a taxa de absorção cutânea é influenciada pelo solvente utilizado (BARROS et al.,

2006). O uso inadequado de OP pode causar grandes prejuízos na pecuária e a intoxicação pode ocorrer pela contaminação da água, alimentos, pastagens, também pela preparação e uso de concentrações excessivas do produto (BOERMANS et al., 1984; RADOSTITIS et al., 2000).

As intoxicações por pesticidas são uma preocupação para as autoridades de diversos países e organizações internacionais, com destaque para a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Conselho das Comunidades, que periodicamente promovem reuniões sobre o tema. Dentre os pesticidas, os OP representam as maiores ameaças para a saúde humana, sendo isso decorrente de seus efeitos neurotóxicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Estima-se que milhões de agricultores sejam intoxicados anualmente, no mundo e a falta de estatísticas oficiais deve responsabilizar-se pelo não cumprimento de medidas eficazes de controle da produção, distribuição e venda dos pesticidas. Permanece desconhecido o número espantosamente elevado de tentativas de suicídio por ingestão de OP. A intoxicação por estes agentes está diretamente relacionada às elevadas taxas do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na sinapse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; YACOUB et al., 1981).

2.3 Acetilcolina

Acetilcolina (ACh) é encontrada em vertebrados e artrópodes, e é um dos principais compostos responsáveis pela sinalização do nervo para o músculo nas sinapses, designadas junções neuromusculares (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). No entanto, além da sua função no sistema nervoso periférico (SNP), também tem um papel importante no sistema nervoso central (SNC), no qual está envolvida a memória e aprendizagem (SIEGEL; SAPRU, 2006).

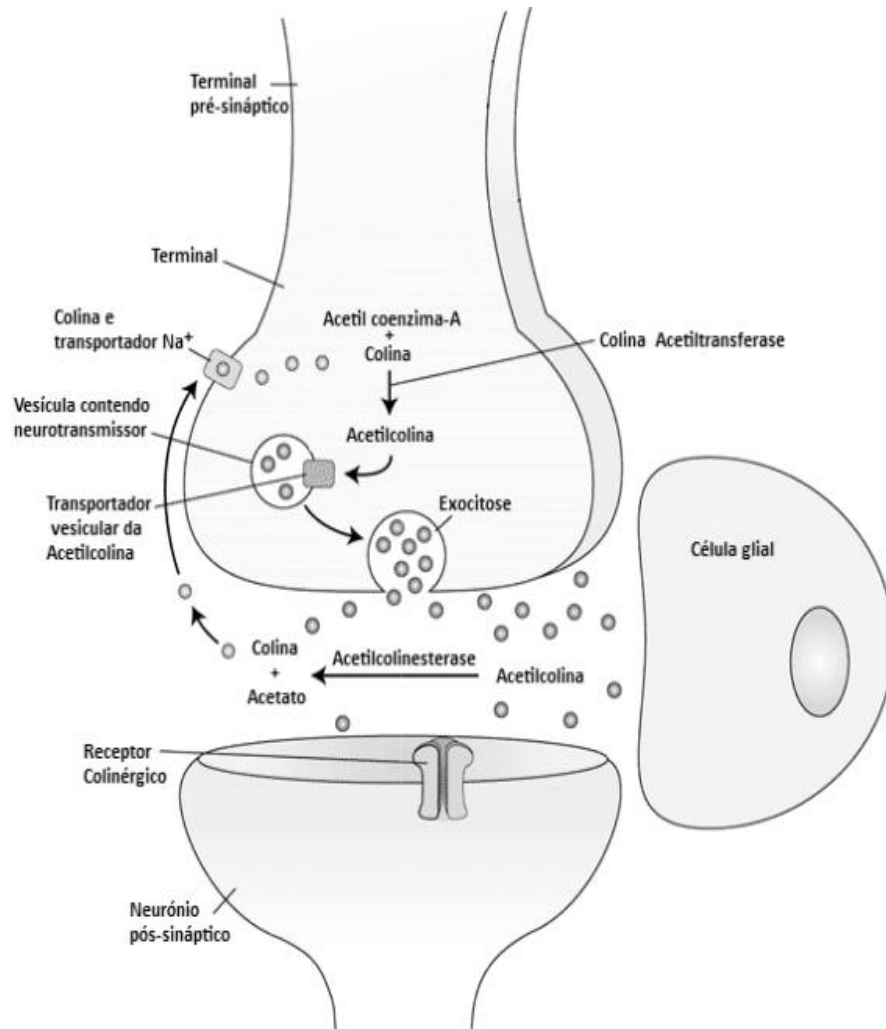
Existem dois receptores neuronais sensíveis a ACh, muscarínicos e nicotínicos, que estão distribuídos no SNC e no SNP (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). Os receptores muscarínicos estão, principalmente, associados

com o SNP e com músculos lisos e cardíacos. O efeito da ligação com ACh está geralmente associado com a estimulação do sistema nervoso parassimpático (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). Pelo contrário, os receptores nicotínicos encontram-se no SNC e na placa motora terminal (EPP), que são as sinapses entre os nervos e músculos esqueléticos. A perda progressiva dos receptores nicotínicos, durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer (AD) também tem sido descrita e há evidências de um papel desses receptores na deficiência de cognição e memória (SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003; SILMAN; SUSSMAN, 2005).

A ACh é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal. Ela permanece armazenada em vesículas sinápticas e, quando um impulso nervoso chega ao axônio terminal, ACh é liberada pelo neurônio para a região sináptica, onde é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no próximo neurônio. Quando ACh interage com os receptores, regenera o impulso nervoso no neurônio, levando, assim, à continuidade da transmissão (PATRICK, 2001; RANG; DALE; RITTER, 2001).

A ACh é, quimicamente, um éster de colina, sendo sintetizada no terminal pré-sináptico, a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), sendo a reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). O mecanismo do processo está representado na Figura 5. Após o estímulo, ocorre a liberação da ACh na fenda sináptica por exocitose. ACh difunde-se e se liga aos seus receptores, sendo, posteriormente, hidrolisada em colina (Ch) e acetato, por meio da ação da acetilcolinesterase (AChE). Ch é retomada para re-síntese de ACh e armazenada em vesículas (SIEGEL; SAPRU, 2006).

Figura 5 – Passos envolvidos na síntese e liberação de acetilcolina (ACh).



Fonte: Sacramento (2014).

A ACh sintetizada é então armazenada em vesículas que se fundem com a membrana e liberta o seu conteúdo na fenda sináptica. A liberação da ACh no nervo terminal pode ser efetuada, por meio dos canais de Ca^{2+} , dependentes da voltagem existente no terminal nervoso. Um potencial que chega ao terminal do neurônio pré-sináptico desencadeia a abertura dos canais de Ca^{2+} . Esse cátion

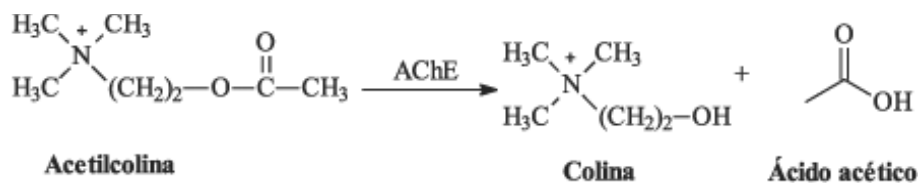
intracelular estimula a fusão das vesículas com a membrana do nervo terminal e estas libertam grandes quantidades de ACh. As moléculas de ACh difundem-se, por meio da fenda e ativam os receptores nicotínicos, localizados na membrana pós-sináptica. A ligação de ACh com os receptores nicotínicos resulta na difusão de Na^+ e K^+ em toda a membrana e despolariza a célula. A ACh libertada tem um tempo de meia-vida muito curto, em razão da presença de grandes quantidades da enzima AChE na superfície externa do nervo terminal (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; SHEN et al., 2002; SIEGEL; SAPRU, 2006).

2.4 Acetilcolinesterase

A ação pesticida e tóxica de OP é o resultado da inibição da acetilcolinesterase (AChE) (CHAMBERS; LEVI, 1992). Ela é uma enzima pertencente à família das colinesterases, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, pela hidrólise do neurotransmissor ACh. A AChE está presente no sistema nervoso central e periférico (RANG; DALE; RITTER, 2001).

No SNP, AChE é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos, enquanto que no SNC, ela está envolvida no controle motor, na cognição e na memória. Uma vez transmitido o impulso nervoso, é importante que o processo de interação da ACh com o receptor seja interrompido, para evitar o excesso de transmissão da informação elétrica, que pode levar a problemas de funcionamento do corpo (PATRICK, 2001). Nesse sentido, como dito anteriormente, o organismo humano possui a enzima AChE, que degrada o neurotransmissor ACh (FIGURA 6).

Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela acetilcolinesterase (AChE).



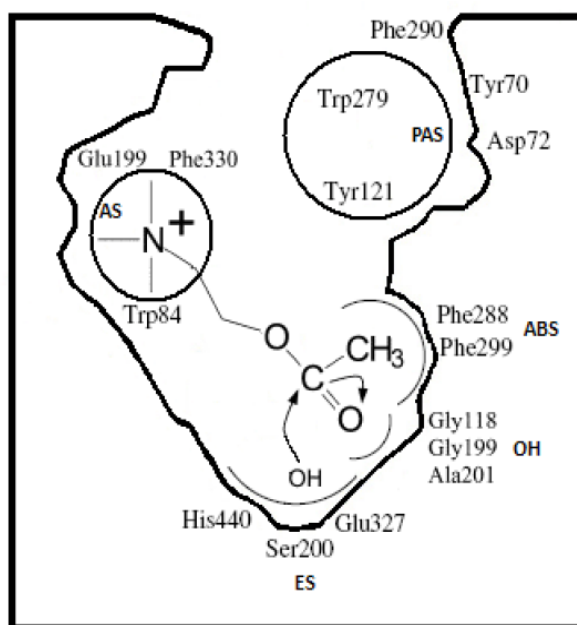
Fonte: Obregon (2006).

ACh se une aos sítios aniônicos e esteráticos da AChE, por meio de forças, como van der Waals, dando lugar ao complexo enzima-substrato; em seguida, é libertada a colina, e a enzima fica acetilada. A enzima acetilada reage com água para regenerar a enzima, liberando ácido acético. Os compostos OP se ligam, de forma bastante estável, ao centro esterático da enzima AChE inibindo sua ação. Dessa forma, a AChE não consegue se ligar a ACh, que, por sua vez, acumula-se nas fendas sinápticas, promovendo os vários sinais característicos da intoxicação (LARINI, 1999). Dependendo do tipo e da quantidade de OP incorporado, ocorrem distúrbios de numerosas funções, tais como a paralisia das funções neuromusculares e, finalmente, parada respiratória e morte (EYER; WOREK, 2007; WOREK et al., 2005).

Esses inibidores ligam-se ao polo esterático da AChE por meio dos grupos fosfato. Se a ligação for tal que a enzima seja recuperada muito lentamente, diz-se que o inibidor é irreversível (SHELDON, 1980). Além do sítio “aniônico” catalítico, existe um segundo sítio aniônico, conhecido como sítio “aniônico” periférico (peripheral anionic site – PAS). Esse sítio identificado com base na ligação de compostos bis-quaternários pode estar envolvido na ação de alguns inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato. Sendo assim, a ocupação do PAS influenciaria a conformação do sítio ativo, assim como a afinidade ou configuração dos compostos ligados a esse sítio. O sítio

ativo é caracterizado por possuir resíduos de triptofano hidrofóbicos, além de grupos aniônicos. Esse sítio pode ser alvo de inibidores, que impediriam a saída do produto de reação (NUNES-TAVARES et al., 2002; SILMAN; SUSSMAN, 2005).

Figura 7 - Esquema do sítio ativo e sítio aniônico periférico (PAS) da AChE.

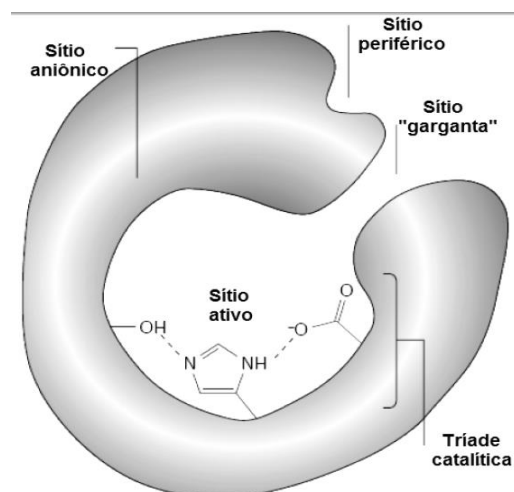


Fonte: Houghton et al (2006).

O sítio catalítico (ES) contém a tríade catalítica Ser200-His440-Glu327. As colinesterases utilizam essa tríade para reforçar a nucleofilicidade da Serina catalítica, uma vez que a forte ligação de hidrogênio entre histidina (His) e serina (Ser) melhora a capacidade da Ser atacar nucleofílicamente o substrato, enquanto o glutamato (Glu) estabiliza o cátion de histidina no estado de transição (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ZHOU et al., 2008).

A cavidade oxianiônica consiste em glicina e alanina (Gly118, Gly119 e Ala201). Esses três resíduos peptídicos contêm ligações de hidrogênio e estabilizam o intermediário tetraédrico de ACh, intermediário acil-AChE, que é formado durante o processo catalítico. O sítio aniônico de ligação ao substrato (AS) é, na maioria, composto por resíduos aromáticos, como triptofano e fenilalanina (Trp84 e Phe330), que possuem uma pequena carga negativa onde se ligam a amônias quaternárias por interações π -cátion. A carga positiva do grupo amina quaternária da ACh pode formar uma interação estável com os sistemas ricos em elétrons π dos anéis aromáticos. O local de ligação ao acilo (ABS) é composto por Phe288 e Phe299, desempenhando um papel importante na limitação da dimensão de substratos que são capazes de entrar no sítio ativo (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ZHOU et al., 2008). O sítio ativo dessa enzima está embebido numa cavidade, com cerca de 20 Å de profundidade.

Figura 8 - Sítio ativo da AChE.

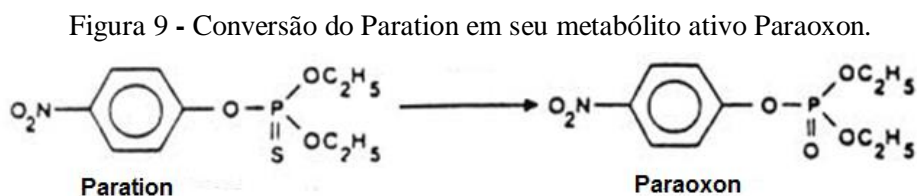


Fonte: Obregon (2006).

Da estimulação inicial e posterior inibição ao nível do SNC, resultam perturbações que vão desde a tensão e ansiedade, com labilidade emocional e dificuldade na concentração, até a confusão, ataxia, astenia generalizada, com abolição de reflexos, respiração de Cheyne-Stokes, convulsões, depressão do centro respiratório e circulatório, taquicardia e tensão arterial (KISS; FAZEKAS, 1970; LUDMIRSKY; KLEIN, 1982).

O conjunto das alterações referido anteriormente está de acordo com uma ação colinérgica excessiva. Exceções para a taquicardia e tensão arterial elevada que são explicadas por um efeito colinérgico no SNC e sinapses ganglionares, assim como pela libertação de adrenalina da medula suprarrenal, estão diretamente invadida por um neurônio pré-ganglionar. A morte no caso de envenenamento por OP é causada pela paralisia dos músculos respiratórios, provocando uma parada respiratória, em razão da insuficiência do sistema (KISS; FAZEKAS, 1970; LUDMIRSKY; KLEIN, 1982).

No caso de intoxicação por pesticidas OP, a velocidade da ação dos pesticidas no corpo humano depende da variedade deles, por exemplo, o paration se converte a paraoxon (FIGURA 9) e deixa uma pessoa inconsciente dentro de 10-20 minutos, enquanto que dimetoato vagorosamente se converte a oxon ativo e ometoato, e o envenenamento se desenvolve após várias horas (BURATTI; TESTAI, 2007).



Fonte: Buratti e Testai (2007).

A AChE está envolvida em dois grandes processos: a doença de Alzheimer (DA) e a intoxicação por OP, empregados como agentes de guerra química ou agroquímicos (SMITH, 1999). Na contaminação por OP, a persistente estimulação de receptores muscarínicos conduz à síndrome colinérgica, cujos sintomas estão descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Efeitos dos agentes neurotóxicos organofosforados em humanos.

ÓRGÃO OU SISTEMA	EFEITOS
Olhos	Miose (unilateral ou bilateral); hiperemia da conjuntiva; dor ou ardor; visão escura ou turva.
Nariz	Rinorreia.
Boca	Salivação.
Trato pulmonar	Broncoconstrição e secreção; tosse; queixas de aperto no peito; falta de ar; sibilo; estertores.
Trato gastrointestinal	Náusea; vômito; diarreia; aumento de secreções e motilidade; câimbras abdominais e dor.
Pele e glândulas Sudoríparas	Sudorese.
Muscular	Fasciculações locais ou generalizadas; espasmos musculares; fraqueza muscular.
Cardiovascular	Diminuição ou aumento da frequência cardíaca; aumento da pressão arterial.
Sistema nervoso central (SNC)	Efeitos agudos da exposição severa: perda de consciência; convulsão; depressão do centro respiratório. Efeitos agudos da exposição leve ou moderada ou efeitos prolongados de qualquer exposição: esquecimento; irritabilidade; dificuldade de raciocínio; tensão ou mal-estar; depressão; insônia; dificuldade de expressão; compreensão diminuída.

Fonte: Sidell, Newmark e McDonough (2008).

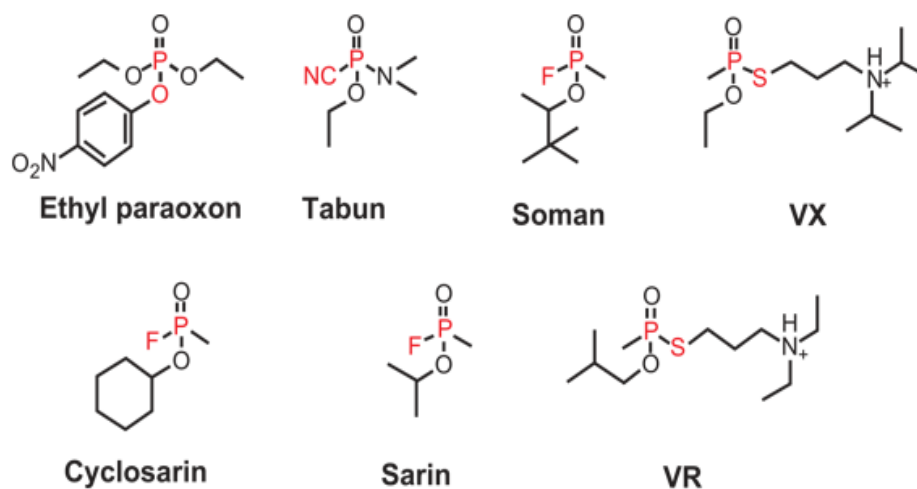
Uma das deficiências das defesas contra armas químicas de guerra é a eficiência limitada dos antídotos disponíveis contra os agentes dos nervos e a não existência de um antídoto universal. O tratamento contra o envenenamento por OP consiste no uso de substâncias capazes de conter os efeitos do OP absorvido (EDDELSTON et al., 2002). Nesse caso, o uso de processos de biorremediação tem sido promissor.

2.5 Processos de biorremediação: Enzima Fosfotriesterase (PTE)

Na tentativa de se encontrar uma biorremediação para a intoxicação por OP, várias enzimas com potencial para degradar tais compostos têm sido isoladas e caracterizadas (RAUSHEL; HOLDEN, 2000). Nesse sentido, uma das enzimas mais promissora é a Fosfotriesterase (PTE) (RAUSHEL; HOLDEN, 2000). A PTE tem gerado considerável interesse, em decorrência do potencial exibido para desintoxicação rápida e completa de agentes dos nervos OP (CALDWELL; RAUSHEL, 1991).

Uma diversidade de pesticidas tem sido amplamente utilizada na atividade agrícola e aplicações industriais. As armas químicas e pesticidas são os únicos compostos químicos feitos com o objetivo de serem tóxicos e utilizados diretamente no meio ambiente. No entanto, no caso de pesticidas, somente 5% dos compostos atingem os organismos alvos (NACHON et al., 2013). Esses OP são transformados por uma diversidade de enzimas (IYER; IKEN; LEON, 2015), e a Fosfotriesterase bacteriana (PTE) da *Pseudomonas diminuta* e *Flavobacterium sp* demonstraram potencial para degradar diferentes OP, quebrando as ligações P-O, P-F, P-CN, e P-S com uma alta eficiência (FIGURA 10) (PEREZGASGA et al., 2012). A capacidade da PTE, para degradar OP tem atraído um significativo interesse dos químicos medicinais (IYER; IKEN; LEON, 2015).

Figura 10 - As ligações entre os grupos em vermelho são geralmente hidrolisados pela PTE.



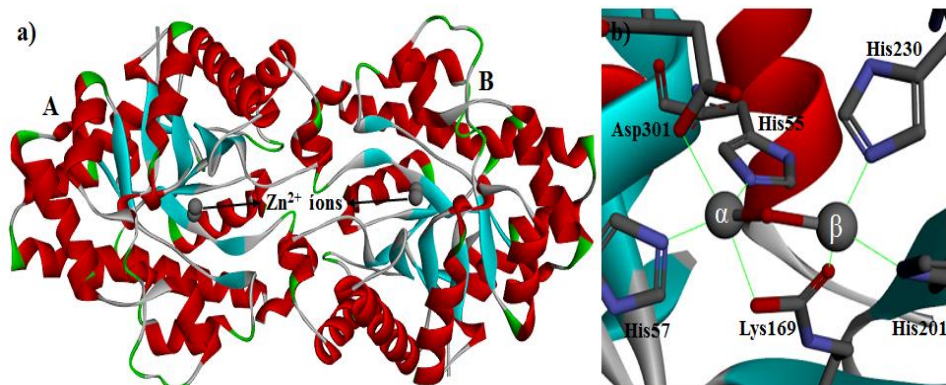
Fonte: Ramalho et al. (2016).

PTE é um membro da superfamília da amidohidrolase (HOLM; SANDER, 1997). Os membros dessa superfamília utilizam um ou dois íons metálicos divalentes para ativar uma molécula de água para um ataque nucleofílico no fósforo tetraédrico ou centros de carbono trigonais. PTE é uma metaloproteína homodimérica com um peso molecular de ~36 kDa / monômero (BENNING et al., 1994). Possui estruturas semelhantes, formado por um centro metálico binuclear, incorporado dentro de uma estrutura (α / β) 8-barril (FIGURA 11-A).

A enzima nativa contém dois íons Zn^{2+} por monômero, mas cátions divalentes como Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , ou Mn^{2+} podem substituí-lo sem perda de atividade catalítica (OMBURO et al., 1992). Os dois íons Zn^{2+} (α -Zn e Zn- β) no sítio ativo da PTE encontram a uma distância de ~3.4Å um do outro, e estão ligados à estrutura da enzima por meio das cadeias laterais de His55, His57, His201, His230, Asp 301 (FIGURA 11-b e FIGURA 12) (CHEN; FANG;

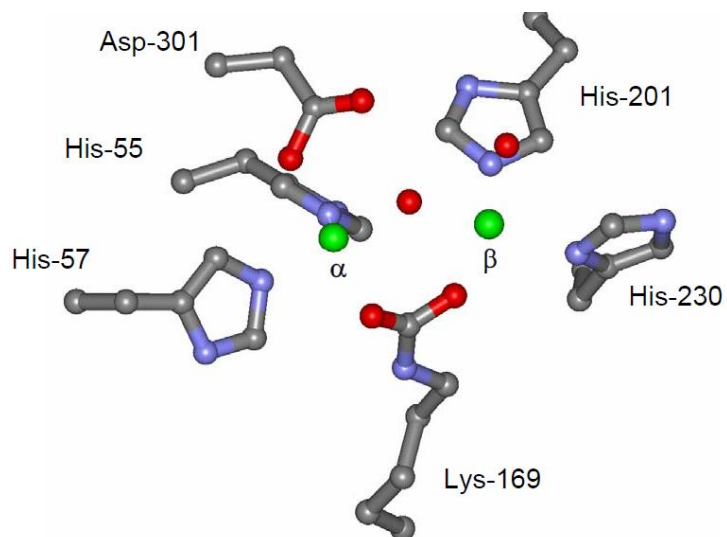
HIMO, 2008). Os metais estão ligados em ponte por uma lisina carboxilada (Lys 169) e uma molécula do solvente.

Figura 11 - Diagrama de fita para a estrutura da Fosfotriesterase bacteriana.



Fonte: Ramalho et al. (2016).

Figura 12 - Estrutura do centro metálico binuclear da Fosfotriesterase (α e $\beta = Zn^{2+}$).



Fonte: Samples (2005).

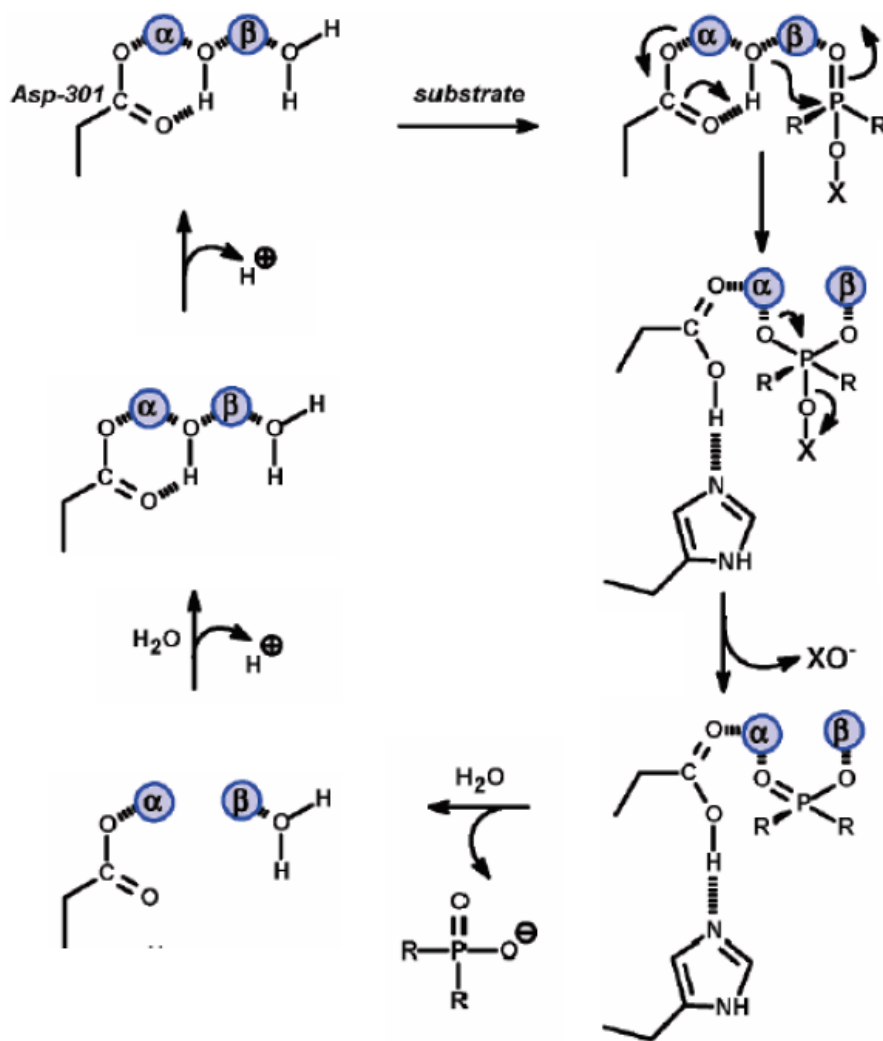
Por isso, estudos da PTE complexada com análogos do substrato, neste caso o dietil 4-metilbenzilfosfonato, são essenciais para quantificar mais plenamente esses fatores moleculares que ditam as orientações dos ligantes dentro do sítio ativo. As propriedades catalíticas dessa enzima são de grande interesse, uma vez que a toxicidade da maioria dos agentes dos nervos OP é dependente da estereoquímica no centro fosfórico (BENSCHOP; JONG, 1988). A partir da estrutura cristalina da PTE, foi demonstrado que os substituintes se anexam ao centro de ligação do fósforo numa orientação específica dentro do sítio ativo, que é aparentemente ditada pelo espaço disponível no interior dos vários subsítios (VANHOOKE et al., 1996).

O mecanismo de reação para a degradação de OP, catalisado pela PTE (FIGURA 13) começa com um ataque nucleofílico por uma molécula de água ativada ao centro de P, resultando em uma inversão de configuração. Ou seja, a reação acontece por meio de um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que o Asp301 serve como uma base fraca, que remove um átomo de H da molécula de água, ativando-a. Posteriormente, o íon hidroxila resultante ataca o P eletrofílico do substrato (HONG; RAUSHEL, 1999; LEWIS et al., 1988). Essa água “ativada” serve como um nucleófilo e ataca o OP em uma reação de substituição única (LEWIS et al., 1988).

Uma compreensão mais profunda do mecanismo de hidrólise enzimática da PTE é essencial para explorar novas perspectivas no processo de biorremediação de OP. Esse mecanismo catalítico tem sido intensamente investigado (BIGLEY; RAUSHEL, 2013). De acordo com o mecanismo de reação proposto na Figura 13, os dois íons Zn^{2+} no centro ativo estão diretamente envolvidos na hidrólise, auxiliando na ativação da molécula de água. O ataque do íon hidroxila sobre o P ocorre com a expulsão do grupo de saída do substrato. Como descrito anteriormente, essa reação é auxiliada pelo Asp301 (BIGLEY et al., 2013; BIGLEY; RAUSHEL, 2013). OP são

frequentemente encontrados na forma de misturas racêmicas, onde um enantiômero é degradado, preferencialmente, em relação ao outro. O mais tóxico enantiômero Sp é um alvo importante para qualquer processo de desintoxicação (HONG; RAUSHEL, 1999; LEWIS et al., 1988).

Figura 13 - Proposta do mecanismo de reação da hidrólise de OP pela PTE (α e $\beta = \text{Zn}^{2+}$) (AUBERT; RAUSHEL, 2004).



Fonte: Samples (2005).

Existem duas limitações para PTE, a baixa estabilidade e o fato de ser uma proteína bacteriana, causando uma resposta imune se injetada na corrente sanguínea (KAZLAUSKAS, 2012). Em relação aos agentes neurotóxicos organofosforados, a atividade da PTE contra os agentes dos nervos tipo V é de cerca de três ordens de grandeza menor do que aquela mostrada para agentes tipo G (BIGLEY et al., 2013).

Por meio do uso da mutagênese dirigida, foi estabelecido que seis dos sete resíduos de histidina na PTE estão envolvidos diretamente no mecanismo catalítico ou indiretamente por ligar os íons de Zn^{2+} à proteína (KUO; RAUSHEL, 1994; LAI; DAVE; WILD, 1994). Não inesperadamente, esses seis resíduos de histidina (His55, His57, His201, His230, His254, e His257) estão agrupados na enzima na porção do C-terminal.

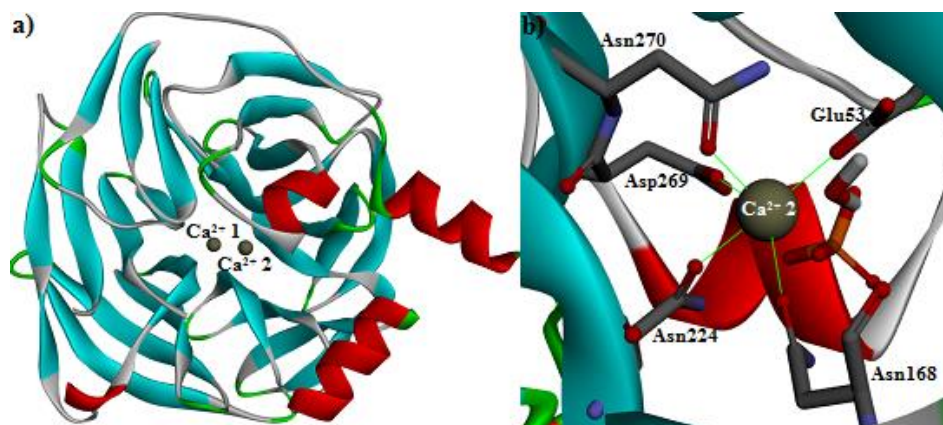
De acordo com o mecanismo proposto na Figura 13, os resultados são persistentes com a utilização de um hidróxido em ponte entre os dois íons metálicos divalentes. A reatividade da hidroxila em ponte é aparentemente aumentada pela transferência de um próton ao Asp301. O ataque nucleofílico da hidroxila ativada no centro fosfórico ocorre, e acredita-se que a His254 também auxilia nesse processo (AUBERT; LI; RAUSHEL, 2004). Estudos teóricos têm sugerido que a Tyr309 poderia estabilizar o grupo de saída *p*-nitrofenol Em razão da da interação por ligação de hidrogênio (KOCA et al., 2001).

Em razão da sua habilidade em desintoxicar uma ampla variedade de agentes químicos, e pelo fato de poder ser produzida em grandes quantidades, a PTE é uma candidata promissora para aplicações contra pesticidas OP e agentes de guerra química (CALDWELL; RAUSHEL, 1991; GOLDSMITH et al., 2016; ZHAN et al., 2016).

2.6 Paraoxonase sérica humana 1 (HuPON1)

HuPON1 é uma enzima, dependente de Ca^{2+} , capaz de hidrolisar uma diversidade de substratos. Encontra-se no plasma, mas suas funções fisiológicas exatas ainda são desconhecidas; contudo, a enzima mostrou ter propriedades anti-inflamatórias, antioxidativas e antiaterogênicas (BAJAJ et al., 2014). HuPON1 é associada ao HDL, sendo capaz de degradar substratos tais como ésteres, lactonas, fosfolipídios oxidados e OP (OTTO et al., 2009). Essa enzima trata-se de uma hidrolase humana de 43 kDa, constituindo uma estrutura de β -hélice de seis voltas (RAUSHEL, 2011). Estão presentes dois íons Ca^{2+} no sítio ativo (FIGURA 14). O primeiro (Ca^{2+} -1) é necessário para a estabilidade estrutural da enzima, enquanto o outro (Ca^{2+} -2) é associado à atividade catalítica (OTTO et al., 2009). HuPON1 é sintetizada e glicosilada no fígado, sendo então segregada na corrente sanguínea onde se liga a lipoproteínas de alta densidade (HDLs) (YEUNG; LENZ; CERASOLI, 2005).

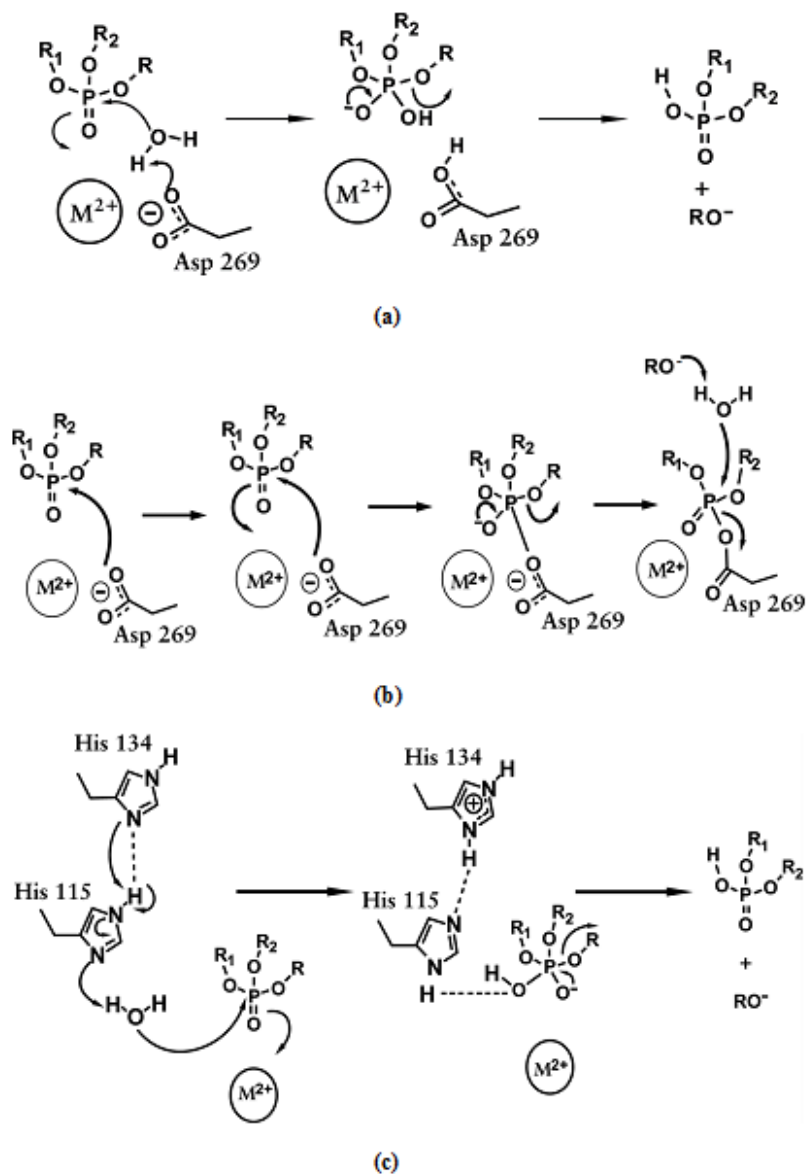
Figura 14 - (a) Estrutura cristalográfica da HuPON1 (b) Ambiente de coordenação do íon cálcio catalítico (Ca^{2+} -2).



Fonte: Ramalho et al (2016).

A atividade catalítica da HuPON1 nativa não é suficiente para catalisar a degradação de OP *in vivo* (PETERSON et al., 2011). Portanto, percepções estruturais sobre como HuPON1 interage com os substratos são importantes para o projeto de mutantes *HuPON1* eficientes como biorremediadores para a intoxicação causada por agentes neurotóxicos OP (HU et al., 2009). Um passo inicial para uma melhor compreensão da hidrólise de OP pela HuPON1 é a determinação da estrutura tridimensional dessa enzima. Atualmente, não existe uma estrutura cristalográfica para HuPON1 disponível. No entanto, uma estrutura de alta resolução de PON1 de *Rattus rattus* (*RrPON1*) foi descrita, por meio de cristalografia de raios-X (código PDB: 1V04; resolução = 2,20 Å) (HAREL et al., 2004). A identidade na sequência primária de 83,7% entre *RrPON1* e *HuPON1* a torna um excelente modelo para o desenho de uma estrutura 3D para a *HuPON1* (FAIRCHILD et al., 2011). Uma abordagem para compreender melhor o mecanismo exato da hidrólise de OP pela HuPON1 é determinar como a enzima estabiliza os intermediários químicos importantes na via de reação. Nesta linha, três mecanismos de reação possíveis propostos para HuPON1 nativa e suas mutantes são descritos na literatura e mostrados na Figura 15, a seguir (SANAN et al., 2010).

Figura 15 – Mecanismos de reação propostos para a hidrólise de OP pela HuPON1 nativa e suas mutantes.



Nota: Mecanismos (a) e (b) foram propostos por Worek et al. 2005 (LENZ et al., 2007; SANAN et al., 2010) e mecanismo (c) foi proposto por Tawfik e outros (SANAN et al., 2010).

O mecanismo (a), na Figura 15, baseia-se na ativação de uma molécula de água por coordenação direta com o íon Ca^{2+} catalítico, seguido da remoção de um próton da água pelo Asp269, conduzindo à formação de um íon OH^- . Essa água ativada ataca diretamente o OP no centro fosfórico com a expulsão do grupo de saída (LENZ et al., 2007). Esse mecanismo é semelhante ao seguido pela PTE na degradação de OP (AUBERT; LI; RAUSHEL, 2004; BIGLEY et al., 2013; BIGLEY; RAUSHEL, 2013). Nenhuma molécula de água está envolvida no segundo mecanismo (b). Nesse caso, haverá um ataque ao centro fosfórico diretamente pelo oxigênio carboxílico da cadeia lateral do Asp269, igualmente promovendo a expulsão do grupo de saída e a clivagem do composto (LENZ et al., 2007). O mecanismo final (c) depende da participação da His115 e His134 na ativação da água, para o posterior ataque ao OP (SANAN et al., 2010).

Vários pesquisadores têm realizado estudos teóricos para compreender o mecanismo de reação dessa enzima na degradação de OP. Técnicas tais como simulações de docking molecular, Dinâmica Molecular (MD) e QM/MM têm contribuído significativamente para esse propósito (BEN-DAVID et al., 2012; FAIRCHILD et al., 2011; MUTHUKRISHNAN et al., 2012; PETERSON et al., 2011; SANAN et al., 2010). Pelo fato da HuPON1 nativa não ter atividade suficiente em relação aos agentes neurotóxicos para ser utilizada para tratamento *in vivo* (PETERSON et al., 2011), essa enzima tem despertado grande interesse na exploração sobre como as espécies químicas intermediárias são estabilizadas no mecanismo de reação. Nessa área, simulações de MD e cálculos de QM/MM têm sido intensamente empregadas (FAIRCHILD et al., 2011). Uma linha atual de pesquisa está relacionada ao projeto de mutantes HuPON1, com o objetivo de aumentar a atividade em relação aos agentes OP, especificamente para o VX, um dos OP mais tóxicos existentes (PETERSON et al., 2011).

2.7 Química Computacional

As pesquisas das mais variadas áreas das ciências aplicadas procuram desenvolver não apenas moléculas e materiais úteis, mas também compreender, projetar e controlar suas propriedades. A ciência pura tem se tornado o centro destes esforços, fornecendo os alicerces para uma descrição e compreensão, em nível atômico-molecular, de sua estrutura química e informações a respeito de sua atividade. Estes esforços conduzem a novas interpretações para a realização de experimentos (CARVALHO et al., 2003). Grandes processos foram alcançados no desenvolvimento científico no sentido de compreender, em nível elementar, processos cada vez mais complexos, que vão desde a determinação do calor de combustão, até um processo catalítico-enzimático. Muito deste progresso se deve aos esforços dos físicos e químicos teóricos para caracterizar quantitativamente as forças que dirigem os processos químicos e os seus respectivos mecanismos. A busca por uma caracterização teórica de meios químicos encontra-se no cerne de várias pesquisas que objetivam o alcance de uma maior compreensão, por exemplo, de sistemas bioquímicos (CARVALHO et al., 2003).

A química computacional divide-se em duas grandes áreas: Mecânica Molecular e Quântica (teoria da estrutura eletrônica), sendo que a primeira utiliza leis da mecânica clássica e a quântica utiliza leis da mecânica quântica e constantes físicas. Os químicos computacionais utilizam programas e metodologias aplicados a problemas químicos específicos. Podem ser utilizadas técnicas computacionais que tratam desde nanotecnologia até a simulação de processos industriais. Pode-se assim resolver os problemas integralmente, desde o nível molecular até o nível macroscópico. Neste sentido, têm-se condições de encontrar a solução apropriada para cada situação que se apresenta. Esses trabalhos se caracterizam por suas técnicas eficientes e por sempre permitirem

melhoras nos procedimentos, além da redução de custos (SIEGBAHN; BLOMBERG, 2000).

2.7.1 Considerações gerais

Entende-se por Química Computacional, de um modo geral, como o domínio dos métodos computacionais aplicados à Química. Dado que existe um largo número de procedimentos computacionais, a Química Computacional apresenta-se como um domínio interdisciplinar, ramificando-se pelas diferentes áreas em que, tradicionalmente, é costume dividir a Química (Físico-Química, Química Orgânica, Química Farmacêutica, Bioquímica, Química Inorgânica, Química Analítica, Química Tecnológica, Química Medicinal, etc.) e, também, pela Ciência dos Computadores (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001).

O advento de instrumentos controlados por computadores tornou possível um aumento de aquisição de dados, sendo que se torna inviável a extração desses dados por meios tradicionais. De fato, a razão de ser desses instrumentos desapareceria sem a aplicação de métodos computacionais para o tratamento e redução dos dados (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001).

Com o avanço e sofisticação da informática nos últimos anos, grande quantidade de informações tem sido cada vez mais rapidamente processada e, com o auxílio de novas ferramentas e metodologias computacionais, resultados melhores e mais precisos vêm sendo obtidos na tentativa de simular uma variedade de parâmetros químicos e correlatos (CARVALHO et al., 2003). Uma das grandes vantagens dos métodos computacionais é seu baixo custo frente a métodos experimentais, uma vez que evitam repetições de análises e reações, além do gasto com reagentes e materiais, visto que simulações podem ser feitas para aperfeiçoar e compreender processos, reações, interações intra e intermoleculares, etc. A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas onde a química desempenha um

importante papel, direto ou indireto. Nesse contexto, conhecimentos mais detalhados sobre processos biológicos, como a interação entre uma enzima (PTE/HuPON1) e seus substratos (OP) devem ser avaliados e simulados utilizando métodos de química computacional.

A disponibilidade dos programas computacionais de modelagem molecular e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de novos compostos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (CARVALHO et al., 2003).

2.7.2 Modelagem molecular

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, pelo uso da química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando a fornecer uma representação tridimensional sob um dado conjunto de dados (CARVALHO et al., 2003; SANT'ANNA, 2002). A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas que possibilita a compreensão da interação, a nível molecular, de uma substância com seu receptor (COHEN, 1996), por meio de simulação computacional. Isso é possível, por meio da geração, manipulação e/ou representação realista dessas estruturas (SILVA, 2006).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular. Ela tem se firmado como uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de um protótipo já existente ou obtido pelo próprio estudo de modelagem molecular. O grande desenvolvimento dessa área deveu-se, em grande parte, ao avanço dos recursos

computacionais em termos de hardware (velocidade de cálculo) e software (programas de modelagem molecular) (RODRIGUES, 2001).

Os métodos teóricos relacionados a essa técnica permitem calcular propriedades de moléculas individuais (conformações estáveis, cargas e interações atômicas), propriedades e energias de moléculas associadas; exibir, sobrepor e comparar modelos moleculares geométricos e eletrônicos, além de acessar, manusear e gerenciar bancos de dados químicos e biológicos (SILVA, 2006). A modelagem e suas representações gráficas são, portanto, ferramentas utilizadas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (BARREIRO; RODRIGUES, 1997; COHEN et al., 1990).

A modelagem molecular fornece informações importantes, permitindo a obtenção de parâmetros específicos de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor (SILVA, 2006). Como exemplos, podemos citar o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica, assim como a energia e os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) etc. Essa ferramenta também tem o potencial de planejar teoricamente novas moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais para um perfeito encaixe no sítio receptor (RODRIGUES, 2001).

A maioria dos programas de modelagem é capaz de desenhar a estrutura molecular, realizando cálculos de otimização geométrica e estudos de análise conformacional. Os arquivos de saída desses cálculos podem ser utilizados como arquivos de entrada para outros programas. Dessa forma, a primeira etapa da modelagem molecular é desenhar a estrutura da molécula. Em seguida, a molécula é otimizada, objetivando encontrar parâmetros geométricos, tais como comprimentos e ângulos de ligação, que estejam próximos aos valores

determinados experimentalmente (CARVALHO et al., 2003; RODRIGUES, 2001).

Como um exemplo de método, temos a mecânica molecular, cujo processo promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os correspondentes cálculos de energia. O programa reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é prever a energia associada com determinada conformação de uma molécula (CARVALHO et al., 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

A escolha do método de minimização de energia vai depender de certos fatores relacionados, por exemplo, o tamanho da molécula, a disponibilidade de parâmetros, dados armazenados e recursos computacionais (CARVALHO et al., 2003). Diversas são as opções quanto ao método de cálculo a ser aplicado em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Esses métodos podem ser clássicos ou quânticos. A aplicação de um ou outro é determinada pelas variáveis: tempo, precisão dos resultados e complexidade do sistema em estudo (COHEN et al., 1990). Dentre os métodos de modelagem molecular, podemos citar o ancoramento molecular (*docking*), dinâmica molecular (MD) e modelagem por homologia.

2.7.2.1 Ancoramento molecular

A simulação computacional do ancoramento molecular (“*docking*”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e um ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada. Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de

menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo, contudo o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI; NIWA; TANAKA, 1994).

Uma maneira interessante de pesquisar a estrutura mais estável do complexo (não necessariamente o mínimo global) foi proposta por Kuntz e colaboradores (KUNTZ et al., 1982). A ideia fundamental inicial desse método é representar, ambos, a molécula ligante e a superfície macromolecular, por um conjunto de esferas e procurar (método estocástico) qual o melhor emparelhamento das esferas. A complementaridade da forma molecular é muito importante no método de ancoramento. Posteriormente, um método mais eficiente para o acoplamento molecular de ligantes flexíveis foi desenvolvido por Leach e Kuntz. O método consiste primeiramente em determinar a posição e a orientação dos fragmentos rígidos do ligante e então pesquisar as conformações da região flexível do ligante de modo sistemático. A energia de interação intermolecular é calculada, por meio da soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas, desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula (LEACH; ZNOJIL, 1992).

As interações entre ligante e receptor requerem estudos complexos. Ligantes precisam mudar sua conformação, à medida que se encaixam no sítio ativo da proteína. Ocorrem também mudanças conformacionais no receptor induzidas pelo ligante de tal modo que se torne possível a ativação ou inibição de uma determinada proteína (GONÇALVES, 2008). Métodos de ancoramento utilizam a energia envolvida no processo para identificar a conformação do ligante energeticamente mais favorável quando ligado ao alvo.

Geralmente, os valores mais baixos de energia representam melhores interações proteína-ligante, comparados com os valores mais elevados de energia. Dessa forma, o ancoramento molecular determina a conformação mais provável do ligante na enzima, levando em conta o modo de interação com a menor energia (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Os valores da função de desempenho do ancoramento (*Docking Scoring Function*), E_{score} , são definidos pela Equação 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

Onde:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

O termo de E_{PLP} é um “potencial linear por partes”, que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos, e outro potencial para a ligação de hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 converte as unidades de energia eletrostática para quilocalorias por mol (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

E_{intra} é a energia interna do ligante:

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{i \in \text{ligand}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexible bonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (3)$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia torsional, onde θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição da energia torsional é utilizada se diversas torsões são determinadas. O último termo, E_{clash} , atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante (Molegro ApS). Em resumo, essas funções são usadas para sobrepor automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde parcialmente rígida (proteína) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

2.7.2.2 Dinâmica Molecular

Simulações de Dinâmica Molecular (MD) têm sido amplamente utilizadas para estudar a dinâmica e estrutura de macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e bicamadas lipídicas (DURRANT; MCCAMMON, 2011; MELLER, 2001). Estudos de MD são geralmente realizados após o ancoramento molecular em conformações selecionados de cada ligante, a fim de proporcionar uma melhor compreensão das interações ligante-enzima como uma função do tempo, e, assim, proporcionar uma explicação possível das forças envolvidas na ligação ligante-receptor ou o papel do solvente na dinâmica de proteínas (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; GUIMARÃES; RAMALHO; FRANÇA, 2014; KARPLUS; MCCAMMON, 2002). Alguns dos programas mais comuns utilizados em estudos de MD são AMBER (WEINER; KOLLMAN, 1981), CHARMM (BROOKS et al., 1983), NAMD (KALÉ et al., 1999; PHILLIPS, 2005) e GROMACS (SCOTT et al., 1999).

Como uma nota histórica, a primeira simulação de MD em uma macromolécula foi realizada em um inibidor da tripsina pancreática bovina, publicada em 1977 por McCammon, Gelin e Karplus (MCCAMMON; GELIN;

KARPLUS, 1977). Embora realizado com um potencial simples, no vácuo, e só para uns poucos picosegundos (ps), esse trabalho seminal foi substancial em substituir a ideia de sistemas estáticos, em que as proteínas eram tratadas como estruturas congeladas sob o conceito de chave e fechadura. Depois disso, milhares de artigos foram produzidos, por meio de técnicas de MD. De acordo com Karplus e McCammon, apenas nos primeiros seis meses de 2002, mais de 260 estudos foram publicados neste campo (DURRANT; MCCAMMON, 2011; KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Em uma simulação geral de MD, as moléculas que têm certa energia cinética são capazes de superar pequenas barreiras de energia potencial, o que permite uma exploração limitada da superfície de energia potencial (PES) na busca de outras conformações estáveis. Cálculos de MD resolvem as equações do movimento de Newton para cada átomo i do sistema molecular, tal como representado na Equação 4:

$$F_i = m_i \cdot a_i \quad (4)$$

Onde F_i é a força que faz com que haja aceleração a_i em um átomo de massa m_i . O tratamento analítico clássico só permite a resolução dessas equações para sistemas com até duas partículas independentes. A resolução para sistemas maiores é feita com a utilização de métodos numéricos adicionais e aproximações para reduzir a complexidade das avaliações gerais de força. Diante disso, podemos citar o Algoritmo de Verlet, que tem como função auxiliar na integração das equações de Newton. Se a posição no tempo t é $r(t)$, a posição depois de um curto intervalo de tempo Δt pode ser obtido pela seguinte série de Taylor, como segue (EQUAÇÃO 5):

$$r(t+\Delta t) = r(t) + \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{d^2r}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (5)$$

A solução numérica então depende do conhecimento da posição $r(t)$, a velocidade dr/dt e a aceleração d^2R/dt^2 para cada átomo. O intervalo de tempo, Δt , de cada etapa do caminho é um parâmetro muito importante em um cálculo de MD. Em primeiro lugar, Δt deve ser pequeno o suficiente para que a aceleração possa ser considerada como constante nesse intervalo; no entanto, intervalos muito curtos fariam com que os tempos de cálculo do caminho completo de reação se tornassem proibitivo. Na prática, o Δt utilizado é de 0,5 a 1 fs de modo a amostrar adequadamente as oscilações de ligações de hidrogênio (DURRANT; MCCAMMON, 2011; MELLER, 2001).

2.7.2.3 Modelagem por homologia

De acordo com Santos Filho e Alencastro (2003), a elucidação das sequências de aminoácidos (estruturas primárias) é uma tarefa relativamente simples. Por isso, nota-se hoje um grande hiato entre o número de estruturas primárias e secundárias disponíveis. Para se ter uma ideia dessa questão, em outubro de 2001, o SWISS-PROT (BAIROCH; APWEILER, 2000; GASTEIGER; JUNG; BAIROCH, 2001), o mais importante banco de dados de estruturas primárias, incluía cerca de 101.602 sequências de resíduos de aminoácidos e, no mesmo período, somente 14.301 estruturas proteicas estavam disponíveis no PDB (Protein Data Bank) (BERMAN et al., 2000), o principal banco de dados de estruturas terciárias de proteínas. Em consequência, foram desenvolvidos outros métodos de elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas. É possível, em princípio, prever a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua estrutura primária (WOLF; GRISHIN; KOONIN, 2000).

A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (“*comparative protein modeling*”)

(D'ALFONSO; TRAMONTANO; LAHM, 2001; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). Essa abordagem baseia-se em alguns padrões gerais que têm sido observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica: (a) homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- α e folhas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias. Outro fato importante é que as proteínas agrupam-se em um número limitado de famílias tridimensionais (WOLF; GRISHIN; KOONIN, 2000). Estima-se que existam cerca de 5.000 famílias proteicas. Consequentemente, quando se conhece a estrutura de, pelo menos um representante de uma família, é geralmente possível modelar, por homologia, os demais membros da família (WOLF; GRISHIN; KOONIN, 2000).

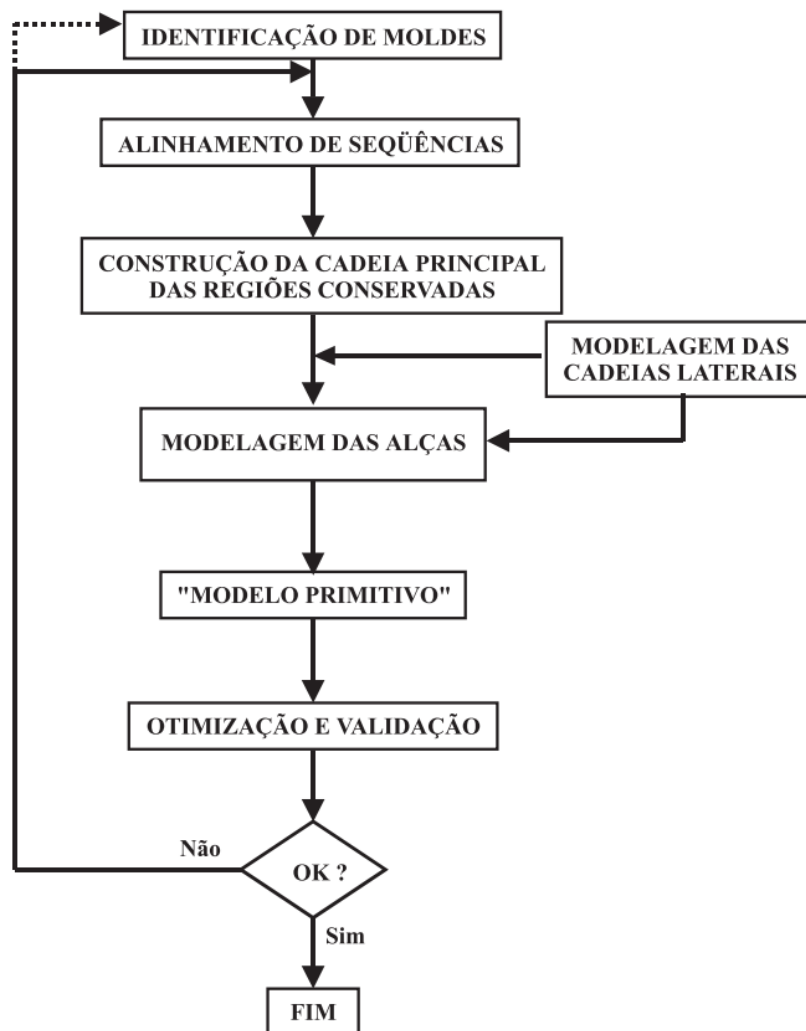
A semelhança entre as sequências de aminoácidos em proteínas homólogas, expressa pelo grau de identidade, é menos preservada do que a semelhança de estruturas tridimensionais. Em outras palavras, as estruturas tridimensionais de proteínas homólogas tendem a se conservar, porque a estrutura ancestral comum é crucial para a manutenção da função das proteínas. Sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas, com cerca de 30% de identidade, apenas, podem ter excelente sobreposição das cadeias principais (“protein backbone”), com desvios de mínimos quadrados (“rmsd”) da ordem de 2 Å (BENNER et al., 1997), comparáveis aos valores de “rmsd” da ordem de 0,7 Å encontrados em proteínas idênticas em diferentes formas cristalinas (CHOTHIA; LESK, 1986) e da ordem da resolução da estrutura cristalográfica de muitas das proteínas disponíveis no PDB.

A modelagem de uma proteína (proteína-problema) pelo método da homologia baseia-se no conceito de evolução molecular. Isto é, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias dessa proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde) implica em similaridade estrutural entre elas (CHOTHIA; LESK, 1986). Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam basicamente em quatro passos sucessivos:

- a) identificação e seleção de proteínas-molde;
- b) alinhamento das sequências de resíduos;
- c) construção das coordenadas do modelo;
- d) validação.

Na figura a seguir, mostra-se um esquema geral do processo de modelagem de proteínas por homologia. Para cada um dos passos existe um grande número de métodos, programas e servidores específicos.

Figura 16 - Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia.



Fonte: Santos Filho e Alencastro (2003).

A qualidade estereoquímica do modelo é de importância fundamental. O programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, o PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993), avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os

ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil, porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

É necessário avaliar também as interações entre a estrutura modelada e o meio, essencialmente água. Nesse tipo de análise, pode-se usar o programa WHATCHECK (HOOFT et al., 1996), que dá informações sobre a formação de regiões centrais hidrofóbicas, a acessibilidade de resíduos e átomos a moléculas de solvente (água), a distribuição espacial de grupos iônicos, a distribuição das distâncias atômicas e das ligações de hidrogênio da cadeia principal. No mesmo contexto, o programa PROSAII (SIPPL, 1993) avalia o ambiente de cada aminoácido da proteína modelada (validação localizada), tendo como referência o ambiente esperado em proteínas análogas de alta resolução.

2.7.3 Princípios de Quântica

Em 1926, o físico austríaco Schrödinger, inspirado na tese de De Broglie e na teoria de Hamilton-Jacobi (uma versão da mecânica clássica), desenvolveu a equação de onda da mecânica ondulatória. Aplicou-se essa equação ao modelo do átomo de Bohr e foi demonstrado que os valores das energias assim quantizadas estavam de acordo com os resultados experimentais e eram exatamente iguais aos que tinham sido obtidos por um método mais abstrato, desenvolvido um ano antes por Heisenberg. Essa equação, hoje chamada equação de Schrödinger, é a base dos cálculos das energias de átomos e moléculas (ALCÁCER, 2007).

A equação de Schrödinger, independente do tempo, pode ser generalizada às três dimensões do espaço:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \right] \Psi(x, y, z) = E \Psi(x, y, z) \quad (6)$$

Atendendo a que é o laplaciano, em geral representado por ∇^2 ou por Δ , podemos escrever a equação de Schrödinger na seguinte forma:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(x, y, z) \right] \Psi(x, y, z) = E \Psi(x, y, z) \quad (7)$$

Aliás, todo o colchete constitui um operador matemático, chamado hamiltoniano, que usualmente se representa por H . Podemos, portanto, escrever a equação de Schrödinger abreviadamente, como na Equação 8, em que r representa o conjunto das três coordenadas de espaço, $r = (x, y, z)$. Na maior parte dos problemas de química, o que se pretende é calcular os valores possíveis da energia do sistema, E (ALCÁCER, 2007).

$$\hat{H}\psi(r) = E\psi(r) \quad (8)$$

Essa equação descreve as funções de onda (os estados) das partículas quando a sua energia está bem definida, i.e., ela descreve os estados estacionários. Com ela podemos obter a maioria dos resultados da mecânica quântica não relativística, como o espectro de energia do átomo de hidrogênio. A equação de Schrödinger é especialmente importante nos cálculos de química quântica, abrangendo diversos métodos computacionais. Nesse sentido, podemos citar a Teoria do Funcional de Densidade (DFT), que é uma técnica amplamente utilizada.

2.7.3.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

Em decorrência do grande número de átomos em proteínas e ao fato de reações envolverem a quebra e formação de ligações químicas, a catálise enzimática é um grande desafio para a química computacional (BORMAN, 2004). Métodos quanto-mecânicos de alto nível teórico são limitados a aplicações em sistemas com número relativamente pequeno de átomos. A combinação dos métodos quanto-mecânicos e de mecânica molecular (QM/MM) excede o domínio dos cálculos QM a macromoléculas. Na região QM, os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície potencial é construída dentro da aproximação Born-Oppenheimer (BORMAN, 2004).

Um método para se obter os resultados de QM é o de funcional de densidade (Density Functional Theory, DFT). A formulação do método ficou a cargo de Hohenberg, Kohn e Sham (KOHN; HOLTHAUSEN, 2001). Segundo Tom Ziegler (1991, p. 651): “A noção básica em DFT, de que a energia de determinado sistema eletrônico possa ser expressa em função de sua densidade, é quase tão antiga quanto a própria mecânica quântica [...]”. Hohenberg e Kohn mostraram também que a energia, função de onda e outras propriedades moleculares são univocamente determinadas por essa densidade de probabilidade eletrônica $\rho [x,y,z]$ (segundo teorema de Hohenberg-Kohn), ou seja, a densidade eletrônica e o Hamiltoniano têm uma relação funcional que permite a computação de todas as propriedades moleculares no estado fundamental sem uma função de onda. Mas esses teoremas não mencionam como encontrar a energia do estado fundamental a partir de ρ ou a partir de ψ . Esse problema foi contornado por Kohn e Sham, na década de 60, quando eles propuseram que a energia puramente eletrônica de uma molécula com muitos elétrons no estado fundamental seria (EQUAÇÃO 9):

$$E_0 = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \Psi_i(\mathbf{1}) | \nabla_1^2 | \Psi_i(\mathbf{1}) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha} \rho^{(1)}}{r_{1\alpha}} dv_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho^{(1)} \rho^{(2)}}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{xc}[\rho] \quad (9)$$

Onde $\Psi_i(\mathbf{1})$, $i=1, 2, \dots, n$ são os orbitais Kohn-Sham, e $E_{xc}[\rho]$ é a energia de troca e correlação. Kohn e Sham também mostraram que “ ρ ” exato para o estado fundamental pode ser determinado pelos orbitais Ψ_i (EQUAÇÃO 10):

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Psi_i|^2 \quad (10)$$

O terceiro teorema de Hohenberg-Kohn diz que $E_0[\rho] \leq E_0[\rho']$, onde ρ é a densidade exata e ρ' a densidade aproximada pela expansão (EQUAÇÃO 10) para “ n ” finito. Esse teorema é equivalente ao teorema variacional de Hartree-Fock.

Os orbitais Kohn-Sham podem ser determinados pela expressão (EQUAÇÃO 11):

$$\hat{F}_{KS}(\mathbf{1}) \Psi_i(\mathbf{1}) = \varepsilon_{i,KS} \Psi_i(\mathbf{1}) \quad (11)$$

Onde \hat{F}_{KS} é o operador de Kohn-Sham apresentado pela Equação 12:

$$\hat{F}_{KS} \equiv -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \sum_{j=1}^n \hat{J}_j(\mathbf{1}) + V_{xc}(\mathbf{1}) \quad (12)$$

Onde o potencial V_{xc} é a principal diferença entre os métodos Hartree-Fock e DFT (MORGON, 1995).

Dessa forma, pode-se minimizar a energia em relação à densidade através das condições de contorno (EQUAÇÃO 13):

$$\frac{\partial E_0}{\partial \tilde{\rho}} = 0, \quad (13)$$

Sendo a integral $\rho' dr = N$, onde N é o número de elétrons do sistema.

O principal problema do método é a falta de um processo sistemático para determinar $E_{xc}[\rho]$, assim vários tipos de funcionais já foram propostos. Este funcional é na realidade, dividido em duas partes: uma de troca e outra de correlação.

Um dos funcionais de troca mais utilizados é o B3, proposto por Becke, em 1993 (BECKE, 1993), que foi utilizado neste trabalho (EQUAÇÃO 14):

$$E_x = (1 - \alpha_0)E_x^{LSDA} + \alpha_0 E_x^{HF} + \alpha_x \Delta E_x^{B88} \quad (14)$$

Para correlação, foi utilizado o funcional proposto por Lee, Yang e Parr (LEE; CHUNG, 2009). A partir daí, conceitos importantes na descrição teórica das reações químicas, tais como potencial químico e, conceito de dureza e moleza (*hardness e softness*), são incorporados na DFT, uma vez que $\rho(\mathbf{r})$ e o número de elétrons N pode ser relacionado mais facilmente do que funções de onda de muitos elétrons.

2.7.4 QM/MM

Diferentes metodologias são necessárias para a modelagem computacional, dependendo das propriedades de interesse e do tamanho do sistema. Para um sistema pequeno, cálculos de QM podem fornecer resultados

precisos e razoavelmente acurados para propriedades importantes, tais como: a estrutura molecular, energias de interação e propriedades espectroscópicas (JORGENSEN, 2013). Técnicas de QM/MM (em inglês, Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) híbridos permitem a modelagem de sistemas maiores, como reações dentro de enzimas, combinando os graus eletrônicos de uma abordagem química quântica com os métodos MM, aumentando o desempenho e diminuindo a demanda computacional (GONCALVES et al., 2014).

As características essenciais que compõem a abordagem QM/MM são como se segue: uma pequena porção é selecionada para o tratamento QM, por exemplo, a um nível *ab initio*, semiempírico, ou Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013). O tratamento por QM é uma técnica que permite os rearranjos eletrônicos relacionados com a quebra e formação de ligações químicas. No estudo teórico e computacional de mecanismos de reação enzimática, a região QM consiste no sítio ativo da enzima, onde a reação geralmente envolve átomos da enzima, substratos e cofatores. A grande parte do sistema, a qual não está diretamente envolvida na reação, é tratada através de técnicas empíricas MM, por meio de um campo de força previamente escolhido. É importante notar que existem diferentes formas de acoplamento das regiões QM e MM (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010).

Uma característica distintiva entre os métodos QM/MM é o acoplamento dessas duas regiões, ou seja, como as interações entre os sistemas QM e MM são tratados (BAKOWIES; THIEL, 1996). A estratégia mais simples de acoplamento envolve a utilização de cargas pontuais na região QM que interagem com o resto da região de MM (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010). No desempenho desse tipo de cálculo, a energia

QM/MM de todo o sistema, $E_{TOTAL}^{QM/MM}$, é calculada como mostrado na Equação 15:

$$E_{TOTAL}^{QM/MM} = E_{TOTAL}^{MM} + E_{QM\ região}^{QM} - E_{QM\ região}^{MM} \quad (15)$$

Onde E_{TOTAL}^{MM} é a energia MM de todo o sistema, $E_{QM\ região}^{QM}$ é a energia QM da região QM e $E_{QM\ região}^{MM}$ é a energia MM da região QM isolada. Vários métodos QM/MM ainda incluem o efeito de polarização na região QM pelo ambiente MM. Isso é importante para várias enzimas, dado o mecanismo de reação (SENTHILKUMAR et al., 2008). Métodos desse tipo estão relacionados com as interações eletrostáticas entre as regiões QM e MM no cálculo (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010; MULHOLLAND, 2007; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013).

A energia total de todo o sistema não pode apenas ser escrita como a soma das energias calculadas para cada subsistema (SENN; THIEL, 2009). É muito importante levar em conta as condições de acoplamento no limite QM/MM. Dependendo do tipo de QM/MM deve haver na região de fronteira (parte entre regiões QM e MM), átomos adicionais que fazem parte do subsistema QM e não é parte de todo o sistema, ou pode consistir de ligações de átomos com características especiais que aparecem em ambos os cálculos QM e MM (HEYDEN; LIN; TRUHLAR, 2007; SENN; THIEL, 2009). A abordagem MM pode, em princípio, ser utilizada dentro de qualquer cálculo de otimização, simulação por Dinâmica Molecular (MD), ou método de Monte Carlo (MC) (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010; SENN; THIEL, 2009).

Métodos QM de alto nível podem ser utilizados para estudar as reações enzimáticas, permitindo o cálculo das barreiras de energia para o processo da reação. Anteriormente, os cálculos a nível QM foram apenas possíveis para

pequenas moléculas, sem a influência da maior região da proteína, mas isso mudou utilizando essa técnica de empregar métodos híbridos QM/MM. Os efeitos de grandes sistemas em uma região QM podem agora ser estimados e corroborados a investigações experimentais (BRAUN-SAND et al., 2005; MULHOLLAND, 2007). Warshel e Levitt aplicaram o primeiro QM/MM à lisozima, da clara de ovo, em 1976 (WARSHEL; LEVITT, 1976). Eles apresentaram os conceitos de QM/MM, detalhando situações essenciais, e os aplicaram a reações enzimáticas.

Um relatório posterior por Field, Bash, e Karplus, em 1990 (FIELD; BASH; KARPLUS, 1990), descreveu em detalhes o acoplamento do campo de força CHARMM para métodos QM semiempíricos (BROOKS et al., 1983). A precisão desse método híbrido foi avaliada e comparada com *ab initio* e resultados experimentais. Desde então, a aplicação de métodos QM/MM tem aumentado rapidamente. Em razão do elevado nível de aplicações, é evidente que a abordagem QM/MM pode proporcionar conhecimento dos mecanismos envolvidos na catálise enzimática (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010). A abordagem QM/MM está agora estabelecida como uma ferramenta valiosa não só para a modelagem de sistemas biomoleculares, mas também para a investigação de sistemas inorgânicos/organometálicos, de estado sólido, e para o estudo de processos em solvente explícito (SENN; THIEL, 2009).

O método QM/MM também pode ser aplicado ao sistema de uma forma sequencial. Na técnica sequencial, primeiro aplica-se a abordagem MM para todo o sistema. Em seguida, uma parte do sistema é cortada e submetida a cálculos QM. O QM/MM sequencial (S-QM/MM) é uma variante da abordagem QM/MM convencional, que procura por valores estatisticamente convergidos para a propriedade de interesse. Isso é de interesse porque um procedimento de amostragem eficiente reduz o número de cálculos QM necessários para obter

esses valores. Existem duas etapas envolvidas: o docking molecular ou simulações de MD são realizados a fim de gerar as configurações, e cálculos QM são executados sobre essas configurações. Assim, há mais do que um programa envolvido no processo (COUTINHO; CANUTO, 1997). À medida que cada passo dos cálculos MM é realizado, uma análise estatística pode ser realizada para selecionar conformações que são relevantes para a propriedade de interesse. Isso pode ser feito utilizando diferentes processos computacionais. Canuto e Coutinho propuseram a metodologia S-QM/MM para estudar os efeitos do solvente sobre as propriedades eletrônicas e estruturais de solutos (CANUTO; COUTINHO, 2000; COUTINHO; CANUTO, 1997; GONÇALVES et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ALCÁCER, L. **Introdução à química quântica computacional**. Lisboa: IST Press, 2007. 305 p.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 26, n. 5, p. 531-568, Sept. 2006.
- AUBERT, S. D.; LI, Y. C.; RAUSHEL, F. M. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. **Biochemistry**, Washington, v. 43 n. 19, p. 5707-5715, Apr. 2004.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 75, n. 5, p. 312–316, May 1997.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 1, p. 45–48, Jan. 2000.
- BAJAJ, P. et al. Interplay between amino acid residues at positions 192 and 115 in modulating hydrolytic activities of human paraoxonase 1. **Biochimie**, Paris, v. 105, p. 202–210, Oct. 2014.
- BAKOWIES, D.; THIEL, W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 100 n. 25, p. 10580-10594, June 1996.
- BARBOSA, J. D. et al. Intoxicações com manifestações neurológicas em ruminantes. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Editora da UFPA, 2005. p. 1-10.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 300-310, jun. 1997.
- BARROS, C. S. L. et al. **Doença do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Vallée, 2006. 207 p.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

BEN-DAVID, M. et al. Catalytic versatility and backups in enzyme active sites: the case of serum paraoxonase 1. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 418, n. 3-4, p. 181–196, May 2012.

BENNER, S. A. et al. Bona fide predictions of protein secondary structure using transparent analyses of multiple sequence alignments. **Chemical Reviews**, Easton, v. 97, n. 8, p. 2725–2844, Dec. 1997.

BENNING, M. M. et al. Threedimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 50, p. 15001-15007, Dec. 1994.

BENSCHOP, H. P.; JONG, L. P. A. de. Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 21, n. 10, p. 368-374, Oct. 1988.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 1, p. 235–242, Jan. 2000.

BIGLEY, A. N. et al. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent vx: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 135, n. 28, p. 10426-10432, July 2013.

BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1834, n. 1, p. 443-453, Jan. 2013.

BOERMANS, H. J. et al. Terbufos poisoning in a dairy herd. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 25, n. 9, p. 335-338, Sept. 1984.

BORMAN, S. A. Much ado about enzyme mechanism. **Chemical and Engineering News**, Washington, v. 82, n. 8, p. 35-39, Aug. 2004.

BRAUN-SAND, S.; OLSSON, M. H. M.; WARSHEL, A. Computer modeling of enzyme catalysis and its relationship to concepts in physical organic chemistry. In RICHARD, J. P. (Ed.). **Advances in physical organic chemistry**: volume 40. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 201-245.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 4, n. 2, p. 187-217, June 1983.

BURATTI, F. M.; TESTAI, E. Evidences for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver. **Toxicology**, Easton, v. 241, n. 1-2, p. 33-46, 2007.

CALDWELL, S. R.; RAUSHEL, F. M. Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 31, n. 1, p. 59-73, Oct. 1991.

CANUTO, S.; COUTINHO, K. From hydrogen bond to bulk: solvation analysis of the N-Pi{*} transition of formaldehyde in water. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, v. 77, n. 1, p. 192-198, 2000.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio/jun. 2003.

CASTRO, A. A. de et al. Molecular docking, metal substitution and hydrolysis reaction of chiral substrates of phosphotriesterase. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Hilversum, v. 19, n. 4, p. 334-344, 2016.

CHAMBERS, J. E.; LEVI, P. E. **Organophosphates chemistry, fate, and effects**. New York: Academic Press, 1992. 440 p.

CHAUHAN, S. et al. Chemical warfare agents. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 113-122, July/Sept. 2008.

CHEN, H. et al. The occurrence and risk assessment of five organophosphorus pesticides in river water from Shangyu, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 188, n. 11, p. 614, Nov. 2016.

CHEN, S. L.; FANG, W.-H.; HIMO, F. Technical aspects of quantum chemical modeling of enzymatic reactions: the case of phosphotriesterase. **Theoretical Chemistry Accounts**, Berlin, v. 120, n. 4, p. 515-522, July 2008.

CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 5, n. 4, p. 823-826, Apr. 1986.

COHEN, N. C. et al. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 33, n. 3, p. 883-894, 1990.

COHEN, N. C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. 361 p.

COLASSO, C. G.; AZEVEDO, F. A. Riscos da utilização de armas químicas. Parte I - Histórico. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 137-172, out. 2011.

COUTINHO, K.; CANUTO, S. Solvent effects from a sequential Monte Carlo - quantum mechanical approach. In: LOWDIN, P. O. et al. (Ed.). **Advances in quantum chemistry**: volume 28. New York: Academic Press, 1997. p. 89-105.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, n. 2-3, p. 246-256, May/June 2001.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, London, v. 9, p. 1-9, Oct. 2011.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and doull's. toxicology: the basic science of poisons**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 763-810.

EDDELSTON, M. et al. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 275-283, May 2002.

EPA's PESTICIDE PROGRAM. Promoting safety for america's future. **FY 2002 Annual Report**. EPA, 2002. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppfod01/annual/2002/2002annualreport.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

EYER, P. A.; WOREK, F. Oximes. In: MARRS, T. C.; MAYNARD, R. L.; SIDELL, F. R. (Ed.). **Chemical warfare agents: toxicology and treatment**. 2. ed. West Sussex: John Wiley, 2007. p. 305-329.

FAIRCHILD, S. Z. et al. Computational characterization of how the VX nerve agent binds human serum paraoxonase 1. **Journal of Molecular Modeling**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 97-109, Jan. 2011.

FEVEREIRO, M. P.; CAETANO, H. V.; SANTOS, M. G. **Cadernos didáticos de ciências**: volume 1. Lisboa: Ministério da Educação, Departamento do Ensino Secundário, 2001. 74 p.

FIELD, M. J.; BASH, P. A.; KARPLUS, M. A combined quantum-mechanical and molecular mechanical potential for molecular-dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 11, n. 6, p. 700-733, July 1990.

FISHER, E. B.; VAN WAZER, R. J. R. Use of organic in phosphorus compounds and its compounds. **Interscience**, New York, v. 2, p. 1961, 1897.

FRANÇA, T. C. C.; SILVA, G. R.; CASTRO, A. T. de. Defesa química: uma nova disciplina no ensino de química. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 2 n. 2, p. 84-104, out. 2010.

GASTEIGER, E.; JUNG, E.; BAIROCH, A. SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database. **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, v. 3, n. 3, p. 47–55, July 2001.

GOLDSMITH, M. et al. Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 90, n. 11, p. 2711–2724, Nov. 2016.

GONÇALVES, A. da S. et al. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Guilderland, v. 32, n. 2, p. 301-307, 2014.

GONÇALVES, R. B. **Desenvolvimento e validação de novos métodos de distribuição da população inicial em algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante**. 2008. Doutorado (Mestrado em Computação) - Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, 2008.

GUIDOTTI, M.; TRIFIRO, F. Chemical risk and chemical warfare agents: science and technology against humankind. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v. 98, n. 9, p. 1018–1025, 2016.

GUIMARÃES, A. P.; RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. C. Preventing the return of smallpox: molecular modeling studies on thymidylate kinase from variola virus. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Guilderland, v. 32, n. 10, p. 1601-1612, 2014.

HAREL, M. et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 11, n. 5, p. 412–419, May 2004.

HEYDEN, A.; LIN, H.; TRUHLAR, D. G. Adaptive partitioning in combined quantum mechanical and molecular mechanical calculations of potential energy functions for multiscale simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 111, n. 9, p. 2231-2241, Mar. 2007.

HOLM, L.; SANDER, C. An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. **Proteins**, New York, v. 28, n. 1, p. 72-82, May 1997.

HONG, S. B.; RAUSHEL, F. M. Stereochemical preferences for chiral substrates by the bacterial phosphotriesterase. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 119, p. 225-234, May 1999.

HOOFT, R. W. W. et al. Errors in protein structures. **Nature**, London, v. 381, n. 6580, p. 272, 1996.

HOUGHTON, P.; REN, Y.; HOWES, M. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, London, v. 23, n. 2, p. 181-99, Apr. 2006.

HU, X. et al. In silico analyses of substrate interactions with human serum paraoxonase 1. **Proteins, Structure Function and Bioinformatics**, New York, v. 75, n. 2, p. 486–498, May 2009.

IYER, R.; IKEN, B.; LEON, A. Developments in alternative treatments for organophosphate poisoning. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 233, n. 2, p. 200-206, Mar. 2015.

JORGENSEN, W. L. Foundations of biomolecular modeling. **Cell**, Cambridge, v. 155, 6, p. 1199-1202, Dec. 2013.

KALÉ, L. et al. NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. **Journal of Computational Physics**, Orlando, v. 151, n. 1, p. 283-312, May 1999.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 9, p. 646-652, Sept. 2002.

KAZLAUSKAS, R. Biology evolves to fight chemistry. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 435-437, 2012.

KISS, Z.; FAZEKAS, T. Arrhythmias in organophosphate poisonings. **Acta Cardiologica**, Bruxelles, v. 34, n. 5, p. 323-330, 1970.

KOCA, J. et al. Mobility of the active site bound paraoxon and sarin in zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 123, n. 5, p. 817-826, Feb. 2001.

KOHN, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **A chemist's guide to density functional theory**. 2. ed. New York: John Wiley, 2001. 293 p.

KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 161, n. 2, p. 269-288, Oct. 1982.

KUO, J. M.; RAUSHEL, F. M. Identification of the histidine ligands to the binuclear metal center of phosphotriesterase by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 14, p. 4265-4272, Apr. 1994.

LAI, K.; DAVE, K. I.; WILD, J. R. Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 24, p. 16579-16584, June 1994.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. 230 p.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, Copenhagen, v. 26, p. 283-291, 1993.

LEACH, P. G. L.; ZNOJIL, M. On the elementary Schrodinger bound-states and their multiplets. **Journal of Mathematical Physics**, New York, v. 33, n. 8, p. 2785-2794, Apr. 1992.

LEE, S. G.; CHUNG, Y. C. Molecular dynamics investigation of interfacial mixing behavior in transition metals (Fe, Co, Ni)-Al multilayer system. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 105, n. 3, p. 4902, Feb. 2009.

LENZ, D. E. et al. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. **Toxicology**, Easton, v. 233, n. 1-3, p. 31–39, Apr. 2007.

LEWIS, V. E. et al. Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. **Biochemistry**, Washington, v. 27, n. 5, p. 1591-1597, Mar. 1988.

LONSDALE, R.; RANAGHAN, K. E.; MULHOILLAND, A. J. Computational enzymology. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 46, n. 14, p. 2354-2372, Apr. 2010.

LUDMTRSKY, A.; KLEIN, H. O. QT prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorous insecticide poisoning. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 49, n. 7, p. 1654-1658, May 1982.

MARTIN, T.; LOBERT, S. Chemical warfare: toxicity of nerve agents. **American Association of Critical Care-Nurses**, Hagerstown, v. 23, n. 5, p. 15-22, 2003.

MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, London, v. 267, p. 585-590, June 1977.

MELLER, J. Molecular dynamics. **eLS**, Torún, p. 1-8, 2001.

MIZUTANI, M.; NIWA, T.; TANAKA, S. On the Law of entropy increasing of a one-dimensional infinite system. **Journal of Mathematics of Kyoto University**, Kyoto, v. 34, n. 4, p. 699-708, 1994.

MORGON, N. H. Paralelização em química. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 481-489, fev. 1995.

MULHOLLAND, A. J. Chemical accuracy in QM/MM calculations on enzyme-catalysed reactions. **Chemistry Central Journal**, London, v. 1, n. 19, p. 1-5, July 2007.

MUNRO, N. B. et al. As fontes, destino e toxicidade dos produtos de degradação de agente de guerra química. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, n. 12, p. 933-938, Dec. 1999.

MUTHUKRISHNAN, S. et al. Mechanistic insights into the hydrolysis of organophosphorus compounds by paraoxonase-1: exploring the limits of substrate tolerance in a promiscuous enzyme. **Journal of Physical Organic Chemistry**, Chichester, v. 25, n. 12, p. 1247–1260, Dec. 2012.

NACHON, F. et al. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 206, n. 3, p. 536-544, Dec. 2013.

NUNES-TAVARES, N. et al. A inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 34, n. 9, p. 1071-1079, Sept. 2002.

OBREGON, A. D. C. **3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi triazolometilados: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase.** 2006. 114 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

OMBURO, G. A. et al. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 19, p. 13278-13283, July 1992.

OSWEILER, G. D. Inseticidas e moluscicidas. In: _____. (Ed.). **Toxicologia veterinária.** Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul, 1998. p. 259-282.

OTTO, T. C. et al. Dramatic differences in organophosphorus hydrolase activity between human and chimeric recombinant mammalian paraoxonase-1 enzymes. **Biochemistry**, Washington, v. 48, n. 43, p. 10416–10422, Nov. 2009.

PATRICK, D. L.; FLANAGAN, J. Contact mechanics and bond rupture in chemical force microscopy: a study using atomistic molecular dynamics simulation. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Amsterdam, v. 221, p. 341-341, 2001.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry.** 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 432 p.

PEREZGASGA, L. et al. Substitution of the catalytic metal and protein pegylation enhances activity and stability of bacterial phosphotriesterase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, n. 5, p. 1236-1247, Mar. 2012.

PETERSON, M. W. et al. VX hydrolysis by human serum paraoxonase 1: a comparison of experimental and computational results. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e20335, 2011.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, Dec. 2005.

RADOSTITIS, E. M. et al. **Veterinary medicine**. 9. ed. London: W. B. Saunders, 2000. 1881 p.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 23, p. 283-438, 1968.

RAMALHO, T. C. et al. Computational enzymology and organophosphorus degrading enzymes: promising approaches toward remediation technologies of warfare agents and pesticides. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 23, n. 10, p. 1041–1061, 2016.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Drogas que inibem a colinesterase**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAUSHEL, F. M. Chemical biology catalytic detoxification. **Nature**, London, v. 469, n. 7330, p. 310–331, Jan. 2011.

RAUSHEL, F. M.; HOLDEN, H. M. Phosphotriesterase: an enzyme in search for its natural substrate. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, New York, v. 74, p. 51-93, 2000.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 3, p. 1-7, maio 2001.

ROMERO, A. M. Commercializing chemical warfare: citrus, cyanide, and an endless war. **Agriculture and Human Values**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 3–26, Mar. 2016.

SACRAMENTO, A. I. S. **Desenvolvimento de um biossensor para monitorização de acetilcolina, um biomarcador associado à Doença de Alzheimer**. 2014. 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2014.

- SAMPLES, C. R. **Investigation of the mechanism of phosphotriesterase:** characterization of the binuclear metal active site by electron paramagnetic resonance spectroscopy. 2005. Thesis (Doctor of Philosophy) - Texas A&M University, Texas, 2005.
- SANAN, T. T. et al. Computational modeling of human paraoxonase 1: preparation of protein models, binding studies, and mechanistic insights. **Journal of Physical Organic Chemistry**, Chichester, v. 23, n. 4, p. 357–369, Apr. 2010.
- SANT'ANNA, C. M. R. Glossary of terms in theoretical organic chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 505-512, maio 2002.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 253-259, mar./abr. 2003.
- SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, H. Treatment of alzheimer's disease: current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, London, v. 2, n. 9, p. 539-547, Sept. 2003.
- SCOTT, W. R. P. et al. The GROMOS biomolecular simulation program package. **The Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 103, n. 19, p. 3596-3607, Apr. 1999.
- SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM methods for biomolecular systems. **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 48, n. 7, p. 1198-1229, 2009.
- SENTHILKUMAR, K. et al. Analysis of polarization in QM/MM modelling of biologically relevant hydrogen bonds. **Journal of the Royal Society Interface**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 207-216, Dec. 2008.
- SHELDON, D. MURPHY: Pesticides. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and douli's.: toxicology: the basic science of poisons**. 2. ed. New York: McGraw-Hill Professional Publishing, 1980. Chap. 16.
- SHEN, T. et al. Molecular dynamics of acetylcholinesterase. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 35, n. 6, p. 332-40, June 2002.

SHIH, T.; KAN, R. K.; MCDONOUGH, J. H. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 157, n. 8, p. 293-303, Dec. 2005.

SIDEL, F. R.; NEWMARK, J.; MCDONOUGH, J. H. Nerve agents. In: TOURINSKY, S. (Ed.). **Textbook of military medicine: medical aspects of chemical warfare** office of the surgeon general. Washington: Borden Institute, 2008. p. 155-219.

SIEGBAHN, P. E. M.; BLOMBERG, M. R. A. Transition metal systems in biochemistry studied by high accuracy quantum chemical methods. **Chemical Reviews**, Easton, v. 100, n. 2, p. 421-437, Feb. 2000.

SIEGEL, A.; SAPRU, H. **Essential neuroscience**. Oxford: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 608 p.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 293-302, June 2005.

SILVA, T. H. A. **Modelagem molecular com o auxilio do computador**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2006. 46 p.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, New York, v. 17, n. 4, p. 355-362, Dec. 1993.

SMART, J. M. A history of chemical and biological warfare: an american perspective. In: SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Borden Institute, 1997. Chap. 2, p. 2-86.

SMITH, M. A. C. Doença de alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 3-7, out. 1999.

STODDART, J. F. **Comprehensive organic chemistry: the synthesis and reaction of organic compounds**. 6. ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 1228 p.

SZINICZ, L. History of chemical and biological warfare agents. **Toxicology**, Easton, v. 14, n. 3, p. 167-181, Oct. 2005.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

TOY, D. F. **Phosphorus chemistry in everyday living**. Washington: The American Chemical Society, 1976. 362 p.

VAN DER KAMP, M. W.; MULHOLLAND, A. J. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology. **Biochemistry**, Washington, v. 52, n. 16, p. 2708-2728, Apr. 2013.

VANHOOKE, J. L. et al. Three-dimensional structure of the zinc-containing Phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 19, p. 6020-6025, May 1996.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymic reactions - dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 103, n. 2, p. 227-249, May 1976.

WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A. AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 2, n. 3, p. 287-303, 1981.

WOLF, Y. I.; GRISHIN, N. V.; KOONIN, E. V. Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 299, n. 4, p. 897-905, June 2000.

WOREK, F. et al. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, Easton, v. 214, n. 3, p. 182-189, Oct. 2005.

WOREK, F.; THIERMANN, H.; WILLE, T. Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 143-148, Feb. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2003 – shaping the future**. Geneva: World Health Organization, 2003. 204 p.

YACOUB, M. et al. Assessment of pesticides poisonings in Tunesis. Experience of tunes poison control center. In: HOREL, S. **Intoxications par les pesticides**. Paris: La Dã©Couverte, 1981.

YEUNG, D. T.; LENZ, D. E.; CERASOLI, D. M. Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. **FEBS Journal**, Oxford, v. 272, n. 9, p. 2225–2230, May 2005.

ZHAN, D. et al. Stereoselectivity of phosphotriesterase with paraoxon derivatives: a computational study. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, Guilderland, v. 34, n. 3, p. 600–611, 2016.

ZHOU, X. et al. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 16, n. 17, p. 8011-8021, Sept. 2008.

ZIEGLER, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. **Chemical Reviews**, Washington, v. 91, n. 5, p. 651-667, July 1991.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 - MOLECULAR DOCKING, METAL SUBSTITUTION AND
HYDROLYSIS REACTION OF CHIRAL SUBSTRATES OF
PHOSPHOTRIESTERASE**

*O artigo 1 foi publicado no Periódico científico: Combinatorial Chemistry &
High Throughput Screening.*

Abstract During World War II, organophosphorus compounds with neurotoxic action were developed and used as the basis for the development of structures currently used as pesticides in the agricultural industry. Among the nerve agents, Tabun, Sarin, Soman and VX are the most important. The factor responsible for the high toxicity of organophosphorus (OP) is the acetylcholinesterase inhibition. However, one of the characterized enzymes capable of degrading OP is Phosphotriesterase (PTE). This enzyme has generated considerable interest for applications of rapid and complete detoxification. Due to the importance of bioremediation methods for the poisoning caused by OP, this work aims to study the interaction mode between the PTE enzyme and organophosphorus compounds, in this case, Sarin, Soman, Tabun and VX have been used, which are potent acetylcholinesterase inhibitors, taking into account the enantiomers "R_p" and "S_p" of each compound, with the S_p-enantiomers presenting the higher toxicity. With that, we were able to demonstrate the existence of the stereochemical preference by PTE in these compounds. With the purpose of increasing the speed of the hydrolysis mechanism, we have proposed a modification in the enzyme active site structure, where Zn²⁺ ions were substituted by Al³⁺ ions. To analyze the stability of Al³⁺ ions in the wild-type PTE active site, MD simulations were also performed. This mutation brought relevant results; in this case, there was a reduction of the reaction energy barrier for all the compounds, mainly for VX in which the reaction presented lower activation energy values, and consequently, a faster hydrolysis process.

Keywords. Enzyme, Phosphotriesterase, QM/MM, MD, Organophosphorus.

1.0 Introduction

Organophosphorus (OP) has been used in the agriculture in pest control for a long time and their overuse can be harmful to the environment and human health. [1]. These compounds have neurotoxic effects on the central nervous system, and their toxicity is related to the acetylcholinesterase (AChE) inhibition and subsequent accumulation of acetylcholine (ACh) [2].

In an attempt to find a bioremediation for organophosphorus poisoning, several enzymes with the potential to degrade these compounds have been isolated and characterized [1]. In this sense, one of the most promising enzymes is Phosphotriesterase (PTE) [3-7].

PTE is a zinc metalloenzyme which is able to hydrolyze different species of OP [8] such as those employed in agriculture and chemical weapons [9, 10]. A deeper understanding of the enzymatic hydrolysis mechanism is essential to raise new insights for the bioremediation process of OP.

This enzyme is an amidohydrolase group member [6]. It is well-known that the PTE enzyme active site consists of two central metals, which are important for catalysis. The wild-type enzyme contains two Zn^{2+} ions per monomer, but divalent cations, such as Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , or Mn^{2+} can replace it without loss of catalytic activity [11].

The catalytic property of PTE enzyme is interesting due to its stereospecificity in the central phosphorus of OP [12]. Once the PTE structure is connected to analogue substrate, diethyl 4-methylbenzylphosphonate, has been shown that substituents are bonded to the central phosphorus of specific forms [13].

It is important to highlight that the stereochemical preference of the PTE enzyme has not been elucidated clearly yet. In this line, efforts have been done to design mutant enzymes able to degrade efficiently the S_p -enantiomers, given that these compounds are more toxic than R_p -enantiomers [14-16].

The reaction pathway followed by PTE consists primarily in the activation of a water molecule, followed by the attack to the central phosphorus, leading to a change of configuration [8]. As commented previously, it has been noticed that the catalytic degradation of OP by PTE is stereoselective. However, OP compounds used as chemical agents are found as a racemic mixture [15, 17]. Then the hydrolysis reaction takes place by a bimolecular nucleophilic substitution (S_N2), where the Asp301 serves as a base, which can remove a hydrogen atom of the water molecule, activating it. Afterwards, the hydroxyl ion formed attacks the central phosphorus [15]. This reaction mechanism is showing in the Fig 1.

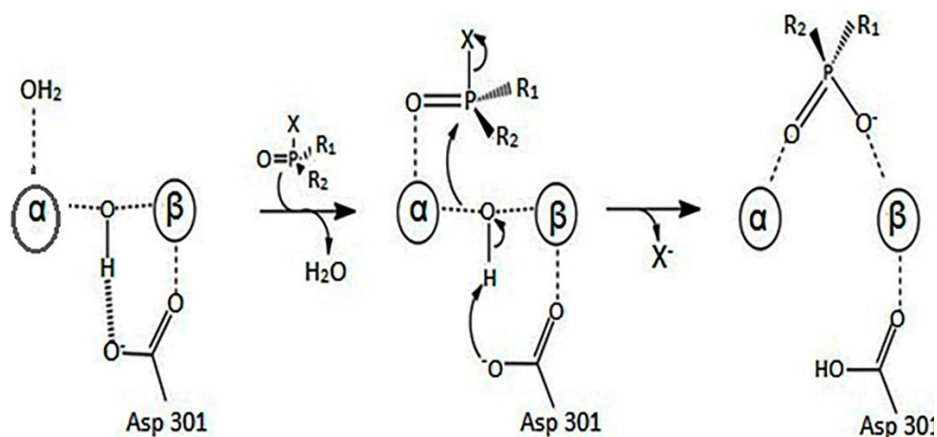


Figure 1 - Proposed reaction mechanism for OP ($\alpha = \beta = \text{Zn}^{2+}$) [15].

According to Bigley and Raushel, 2013 [18], for the hydrolysis mechanism of OP the highest energy gap is associated to distortion of the phosphorus center.

Recent findings reveal that the manipulation of amino acid residues and cofactors in the PTE active site can improve the catalytic efficiency for some OP [19]. Certain metal complexes and molecular imprinted polymers have been used to hydrolyze phosphotriesters [20, 21].

In line with this context, we aim to evaluate the interaction of some OP in the PTE enzyme active site. Thus, QM/MM calculations have been employed, which consist in an interrelation between quantum mechanics and molecular mechanics methods, in order to investigate the reaction mechanism for the nerve agents Tabun, Sarin, Soman and VX, taking into account their enantiomers (R_p and S_p). After that, we have investigated the metal substitution in order to assess how this feature can influence in the organophosphorus degradation, given that the PTE catalytic site contains a metal center, which is responsible for the rate and efficiency of the enzymatic reaction [11]. Despite the great importance of the effect of divalent-trivalent cation exchange on the enzymatic activity, surprisingly little detailed computational work on this subject has appeared. So, it is interesting to investigate the influence of the metal substitution in the degradation process.

2.0 Computational details

2.1 Docking Procedure

For the docking study, four compounds were selected, Sarin (GB), Soman (GD), Tabun (GA) and VX chemical warfare agents (Fig. 2), which, according to the literature, are the most toxic organophosphorus compounds [2]. The docking studies were performed for the compounds in the R_p and S_p conformations.

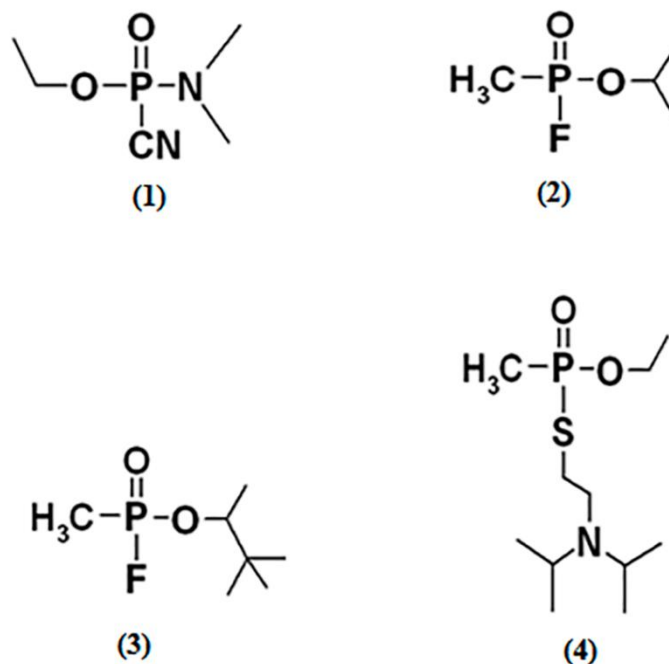


Figure 2 - Structure of the organophosphorus compounds (1) Tabun, (2) Sarin, (3) Soman and (4) VX.

The compounds structures to be used at work were constructed by using *PC Spartan Pro*[®] program [22] and the partial charges related to each atom were determined by quantum methods. The compounds were docked inside the PTE crystallographic structure (PDB code 1DPM; resolution = 2.10 Å) [23] using the *Molegro Virtual Docker program (MVD)*[®] [24], taking into account the same procedures previously used [25, 26]. For the development of the calculations, it was considered a radius of 5 Å, where the residues were kept as flexible, since in this radius, it was possible to find the main amino acid residue which participates in the hydrolysis mechanism, in this case Asp301 [17]. Due to the nature of the docking methods, the calculations were carried out, generating 30 poses (conformation and orientation) for each ligand. The best pose was taken

for additional studies, analyzing the ligand-protein interactions and overlap with Diethyl 4-Methylbenzylphosphonate active ligand [23] inside PTE active site. The pose of each compound was selected according to its best interaction energy with the enzyme and taking into account its accommodation in the active cavity.

The MolDock scoring function employed in the MVD program comes from the piecewise linear potential (PLP), a reduced potential whose properties are fitted to the enzyme-substrate structures, binding data employment and “Generic Evolutionary Method” for molecular docking, using a new arrangement for hydrogen bonds and charges [17, 27]. The docking scoring function values E_{score} are defined by Eq. 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

Where:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

“ E_{PLP} represents *piecewise linear potential*, which consists in the use of two different properties grouping, as described forward: one related to the approximation of the steric term (Van der Waals) among atoms, and the other to hydrogen bonds. The second one is related to electronic interactions among overloaded atoms. In this case, we refer to a Coulomb potential in which the dielectric constant is dependent on the distance ($D(r) = 4r$). The numeric value 332.0 is responsible for the electrostatic energy unit to be given in kilocalories per molecule” [28-30].

E_{intra} is the internal energy of the ligand [31, 32]:

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{ligand}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexiblebonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (3)$$

“The first part of the equation (double sum) is among all couple of atoms in the ligand, taking off those ones which are linked by two bonds. The second one characterizes the torsional energy, where θ is an angle referred to the torsion of the bond” [27]. If several torsions could be determined, each torsional energy is considered and there is the use of an average among them. The last term, E_{clash} , applies a penalty of 1,000 if the distance between two huge atoms is smaller than 2.0 Å, not taking into account infeasible ligand conformations [28-30, 33]. The docking search algorithm that is applied in MVD program considers a progressive algorithm, an interactive optimization methods which are illuminated by Darwinian evolution theory, and a new hybrid search system named guided differential evolution [28-30]. “This hybrid combines the differential evolution optimization technique with a cavity prediction algorithm during the search process, allowing that way a fast and accurate identification of potential binding modes (poses)” [27, 33, 34].

2.2 Molecular Dynamics (MD) simulation

The enzyme/ Zn^{2+} and enzyme/ Al^{3+} systems were simulated using the GROMACS 5.1 package [35, 36], in cubic boxes of approximately 547.50 nm³ containing around 16.382 SPC water molecules. Explicit solvent MD simulations were performed using the force field amber96sb [36]. The two systems were initially subjected to 5000 steps of steepest descent minimization to eliminate any unphysical contacts. Next, water and ions were equilibrated in

the NVT and NPT ensemble at 310 K for 0.1 ns for each step. Subsequent simulations were carried for all system in 1.0 ns. A total of 1000 frames were obtained during this simulation.

To analyze the structures generated after the optimization and MD steps, we used the visual molecular dynamics (VMD) [37] and Swiss-Pdb Viewer [38] programs. Plots of variation of total energy, distance, the variation of random mean square deviation (RMSD) were generated with the Origin program [39].

2.3 QM/MM study

With the large portion of atoms in big systems, such as proteins, the use of accurate theoretical calculations is a major challenge for computational chemistry [40]. However, in an attempt to get more accurate results, taking into account the electronic effects, we have performed QM calculations. In all cases, they were carried out at the density functional theory (DFT) level with Gaussian 09 [41]. Recently, DFT techniques have been employed with success, showing good performance for large systems, such as biomolecules [42, 43]. Further, the calculations were based on the “generalized gradient approximation functional” proposed by Gustin et al, 1999 [44]. This relationship of functional and basis sets has been tested for analogous arrangements [45].

The MM part was obtained from the docking results. Conformations of ligands and amino acid residues, obtained from the molecular docking, were extracted to keep only the QM region, which was formed by water molecules, cofactors (Zn^{2+} or Al^{3+}), His201 and Asp131 amino acid residues [17]. It should be kept in mind that using the sequential QM/MM approach, there is no coupling between QM and MM regions, so the quantum-classical boundary problems were solved with this new methodology [30].

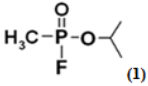
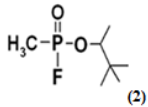
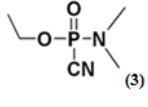
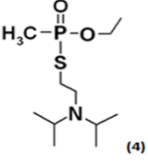
These structures were optimized at the density functional theory (DFT) level with B3LYP density functional with 6-31G* basis set [33, 46, 47]. “All transition states (TS), intermediates and precursors involved were calculated and characterized by calculation of imaginary frequency” [48, 49]. In an attempt to improve the PTE enzyme efficiency, the metal substitution of Zn^{2+} ions by Al^{3+} ions was performed. The same calculations of the reaction mechanism were repeated for this variant enzyme [50].

3.0 Results and discussion

3.1 Docking Study

A cavity prediction algorithm based on a 3D box was used to generate binding sites of the PTE enzyme through the Molegro Virtual Docker program. The cavity volume was 119,296 Å³. The energy values of the ligand-enzyme interactions were calculated to understand better the variations among the binding modes of the molecules in the enzyme active site, as well as to evaluate the structural aspects that modulate the biological activity for nerve agents [51]. Table 1 shows the intermolecular energy values of the most stable conformation of each ligand in the Zn^{2+} -PTE enzyme, taking into account the R_p and S_p -enantiomers of each compound.

Table 1 - Docking results for Sarin, Soman, Tabun and VX inside the Zn²⁺-PTE active site.

Compounds*	R _p			S _p		
	Interaction Energy (kcal.mol ⁻¹)	H-Bonds Residues and H ₂ O	H-Bond Strength (kcal.mol ⁻¹)	Interaction Energy (kcal.mol ⁻¹)	H-Bonds Residues and H ₂ O	H-Bond Strength (kcal.mol ⁻¹)
 (1)	-57.62	His201	-1.774	-56.88	His201	-1.156
		H ₂ O	1.942		H ₂ O	-1.951
 (2)	-70.34	His201	-1.683	-67.95	His201	-1.796
		H ₂ O	-2.500		H ₂ O	-1.039
 (3)	-61.30	His201	-1.567	-60.79	His201	-2.076
		H ₂ O	-0.544		Trp131	-0.442
		H ₂ O	-2.500		H ₂ O	-2.383
 (4)	-60.96	His201	-0.362	-62.99	H ₂ O	-2.500
		Trp131	-1.493		H ₂ O	-2.500

*Compounds: (1) Sarin; (2) Soman; (3) Tabun; (4) VX

It is possible to observe in Table 1 that Sarin presented the highest intermolecular energy value for the R_p and S_p enantiomers, -57.62 kcal.mol⁻¹ and -56.88 kcal.mol⁻¹, respectively. Thus, we can suggest that this ligand presents a

smaller interaction potential in the active site when compared to other compounds analyzed [52, 53]. On the other hand, Soman indicates the lowest intermolecular energy value. In other words, this compound has shown the best interaction in the enzyme active site (Table 1). This compound presented the highest energy difference among the R_p and S_p enantiomers, being $-2.39 \text{ kcal.mol}^{-1}$. This difference is due to the more stable H-bond strength performed by the R_p -enantiomer of this compound [54, 55]. Tabun, in relation to VX, showed similar intermolecular energy values.

With the docking studies of Sarin, Soman, Tabun and VX, it was also possible to evaluate significant H-bonds between OP and residues in the PTE enzyme. According to Table 1, in the PTE active site, the R_p and S_p -enantiomers of Sarin present a hydrogen bond with one water molecule and His201 (Fig. 3). By looking at the H-bond strength values, it can be noted that Sarin, as R_p -enantiomer, performs a more stable interaction with His201, this fact can explain this better interaction of compound in the R_p conformation in the active site. These same interactions occurred for the enantiomers of Soman. The similar interaction energies between the R_p and S_p -enantiomers of Sarin can be explained due to the occurrence of the same interactions in the enzyme active site, which presented similar values. The same is valid for Soman.

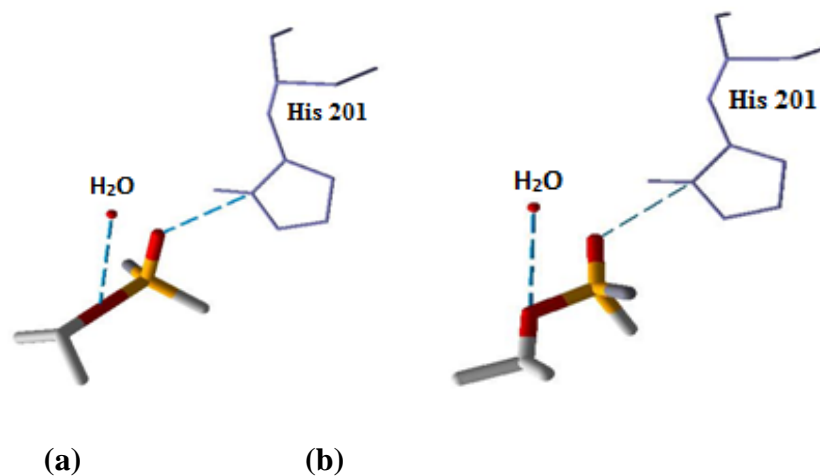


Figure 3 - H-bonds of Sarin as R_p-enantiomer (a) and S_p-enantiomer (b) in Zn²⁺-PTE active site.

It was observed that the R_p-enantiomer of Tabun interacted with one water molecule and His201. These interactions also occurred in Sarin and Soman for both conformations, R_p and S_p. The difference is in the S_p-enantiomer for Tabun, which besides interacting with two water molecules and His201, also show a H-bond with Trp131 (Fig. 4). Thus, it was possible to observe an increased number of H-bonds when compared to Sarin and Soman. This can be explained by the conformational stability adopted by the S_p-enantiomer in the active site (see H-bond strength values in Table 1). Similarly, this occurs for VX in the R_p conformation (Fig.5a).

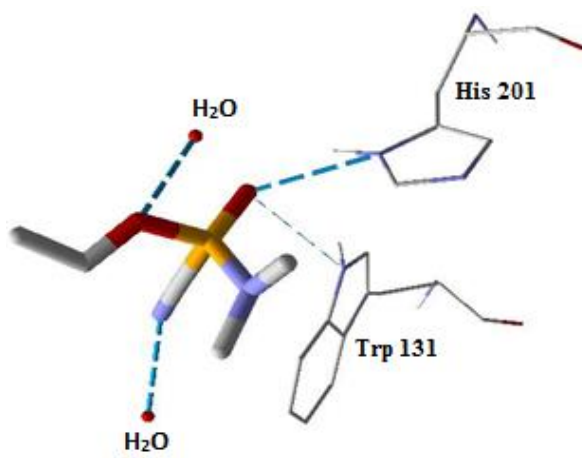


Figure 4 - H-bonds of Tabun as S_p -enantiomer in Zn^{2+} -PTE active site

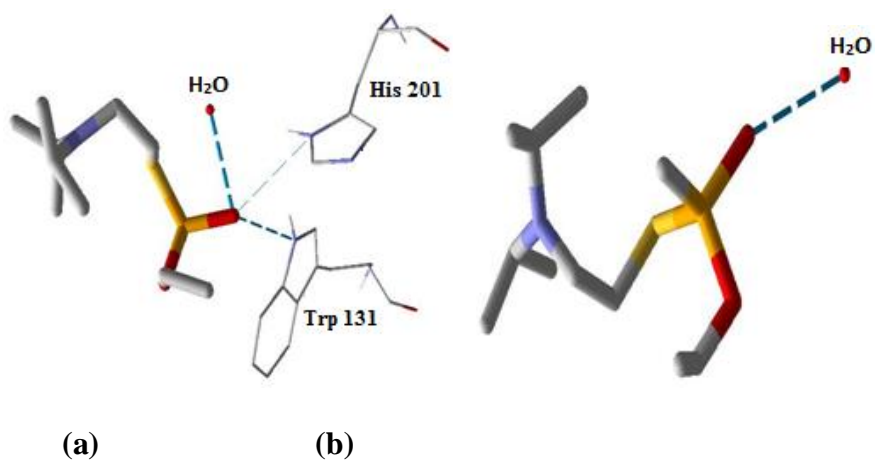


Figure 5 - H-bonds of VX as R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) in Zn^{2+} -PTE active site.

From our theoretical data, all OP can form H-bonds with water, which is of interest for our work, because water molecules are directly involved in the

hydrolysis catalytic mechanism [15]. The lethal nerve agents used in this work, whose structures are shown in Fig. 2, exhibit certain similarities in their structures, since they have two oxygen atoms, one of them being directly connected to the phosphorus center by a double bond and the other by a single bond. The compounds differ from each other by the variation of other groups that constitute the structural formula, thus giving rise to more bulky groups, such as in the structure of Soman and VX. Furthermore, in the docking studies we have observed that these structural differences can influence in the conformation that each one of them will adopt within the PTE active site.

It is known from the literature that R_p and S_p -enantiomers of each compound interact differently in the active site leading to different bioactive conformations [16]. It should be kept in mind, however, that the docking calculations [56, 57] were not able to identify the structural factors for the stereochemical preference in the PTE active site, since we have observed that the R_p and S_p -enantiomers presented very close intermolecular interaction energy values in the enzyme (Table 1). With respect to this, theoretical calculations to determinate the relative activation energy for the R_p and S_p -enantiomers of each compound were carried out to rationalize the selectivity of these compounds in the PTE active site [51].

In order to evaluate the influence on the docking in relation to the displacement of Zn^{2+} cofactors by Al^{3+} , further docking calculations were performed by using $VX-R_p$ and S_p as substrates, in the Al^{3+} -PTE active site. Herein, the VX nerve agent was selected to perform the calculations because of its higher toxicity in relation to other OPs [2]. For $VX-R_p$, an intermolecular energy value of $-69.34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ was observed, suggesting a better stability of this compound when docked in the Al^{3+} -PTE active site, in relation to Zn^{2+} -PTE active site. $VX-R_p$ has interacted with one water molecule (H-Bond strength of $-2.32 \text{ kcal.mol}^{-1}$) and Trp131 amino acid residue (H-Bond strength of -0.65

kcal.mol⁻¹). On the other hand, VX-*S_p* showed an intermolecular energy value of -72.95 kcal.mol⁻¹, also revealing more affinity to Al³⁺-PTE enzyme. In this case, there were interactions with one water molecule (H-Bond strength of -2.39 kcal.mol⁻¹) and the amino acid residues His201 (H-Bond strength of -0.06 kcal.mol⁻¹) and Trp131 (H-Bond strength of -2.48 kcal.mol⁻¹). In terms of stereochemistry, the same trend keeps here for Al³⁺-PTE, in which VX-*S_p* has shown good interaction energy and reactivity in relation to VX-*R*. The best intermolecular interaction energy value for VX-*S_p* can be related to the largest number of H-Bonds found. Fig. 6 reports the analyzed H-Bond.

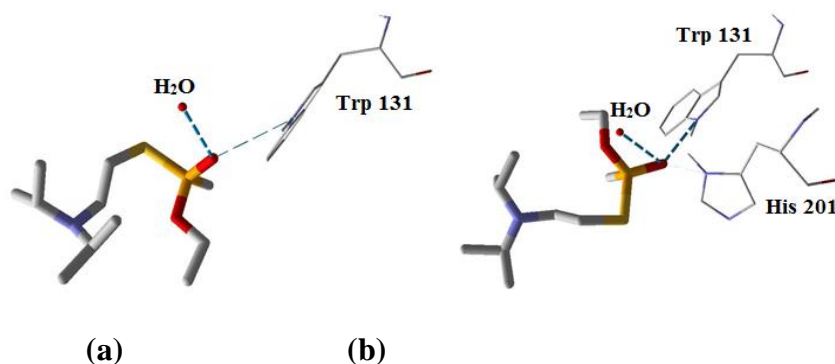


Figure 6 - H-bonds of VX as *R_p*-enantiomer (a) and *S_p*-enantiomer (b) in Al³⁺-PTE active site.

3.2 MD studies

After the docking simulation, the Zn²⁺-PTE and Al³⁺-PTE enzymes were submitted to MD calculations in order to evaluate the behavior of these enzymes, and to evaluate when Zn²⁺ ions are replaced by Al³⁺. The RMSD technique can contribute for understanding of fluctuations occurring on the nanosecond time scale within the three-dimensional structure of enzymes. The

temporal RMSD calculations were carried out on both systems, Zn^{2+} or Al^{3+} ions (Fig. 7).

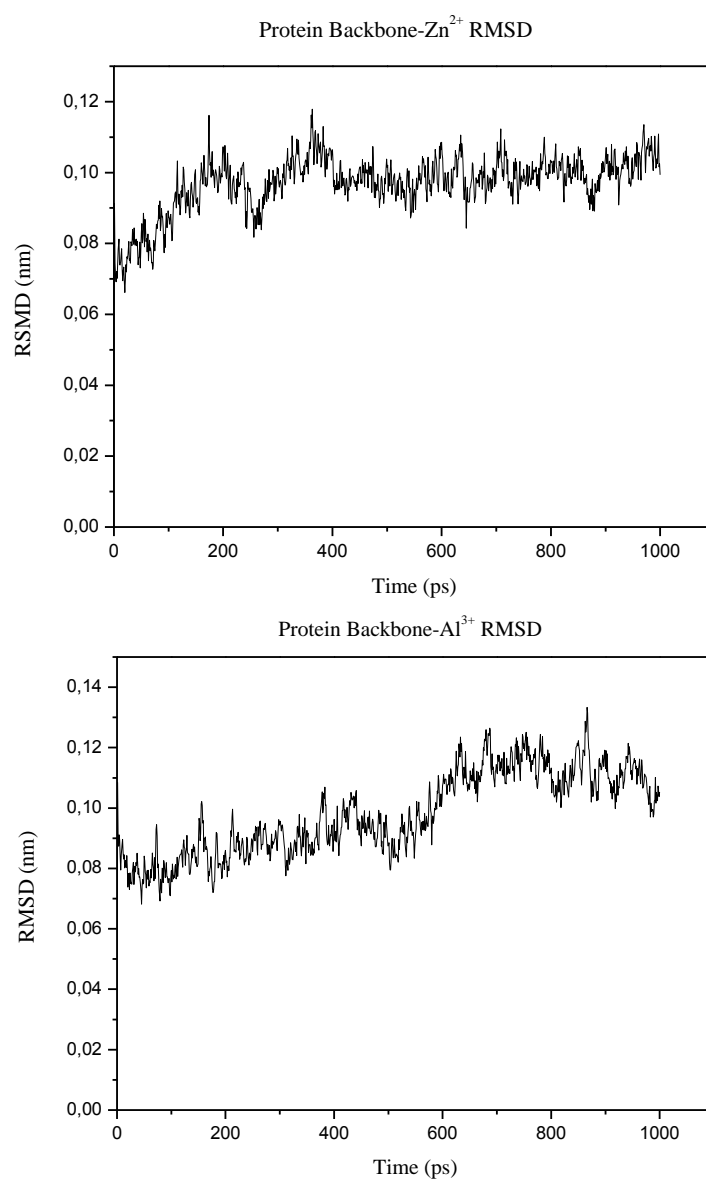


Figure 7 - RMSD graphics for PTE- $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$.

As can be seen in Fig. 7, there is not a large variation in the protein backbone for both enzymes. The wild-type PTE with the Zn^{2+} cofactors presented a relatively constant structure, without significant fluctuation during simulation. According to the RMSD graphics, the protein backbone for Zn^{2+} -PTE was similar to protein backbone for Al^{3+} -PTE. These findings lead us to us to believe that the metal substitution by a trivalent cation does not affect the PTE structure and folding. This RMSD pattern clearly points out that period of time was enough to stabilize the systems and large variations were not observed during the simulation. This result is important due to the attempt of increasing the enzyme reactivity towards OP, keeping in mind that the PTE catalytic efficiency also depends on the metal in the reaction mechanism. Fig. 8 presents the total energy variation for both systems, which the wild-type PTE has similar energy values with both species of metal ions. Thus, our data put in evidence good accommodation of Al^{3+} ions in the active site when compared to Zn^{2+} ions, which is naturally found in the bacterial PTE. By means of MD simulations, we can observe stability along the simulation time for both systems and the overlap between both systems after MD is shown in Fig. 9.

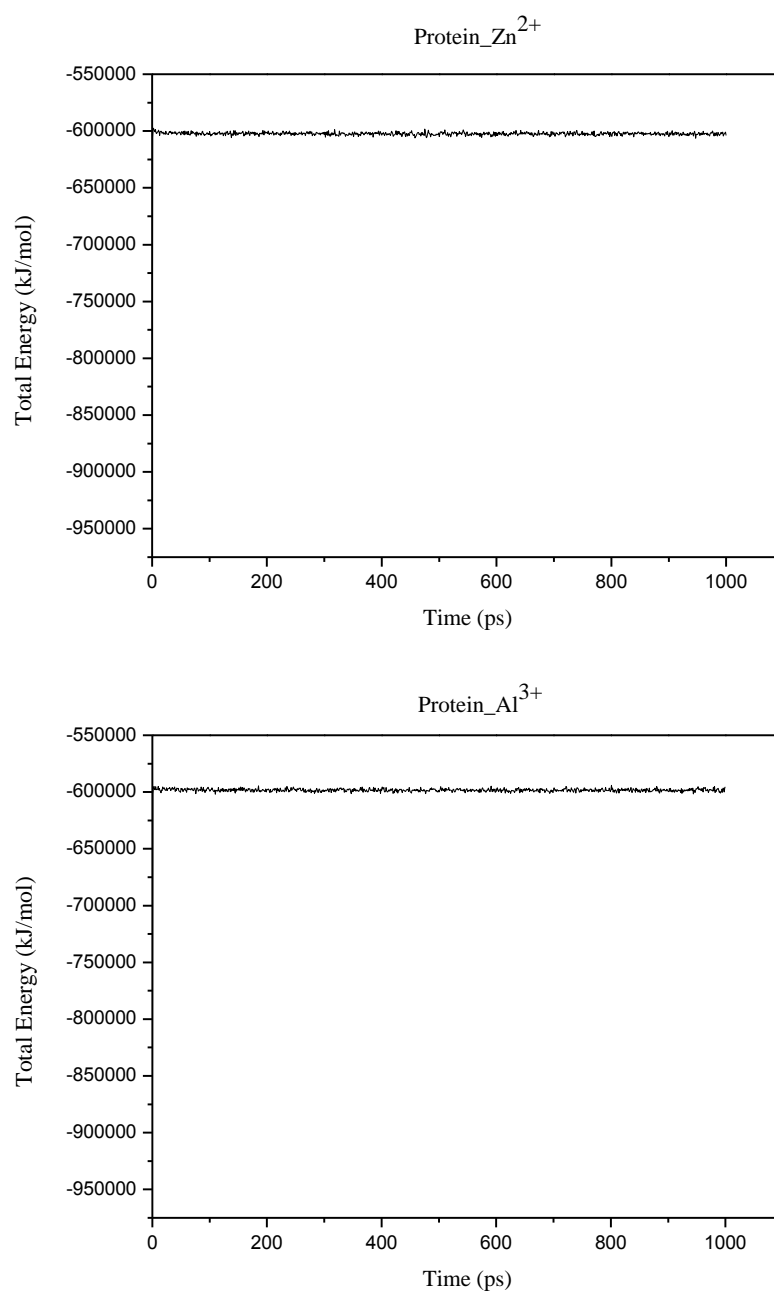


Figure 8 - Total energy from MD simulations.

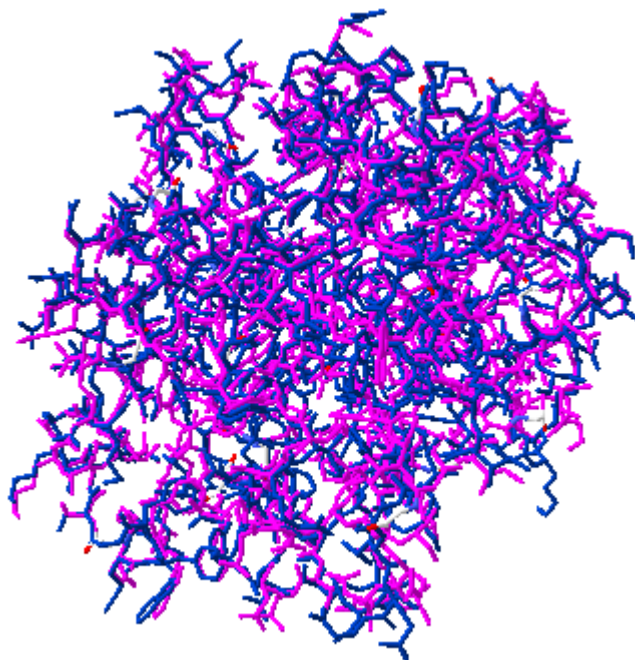


Figure 9 - Overlap between both systems after MD. Zn^{2+} -PTE system is represented in blue.

3.3 Mechanistic studies in the Zn^{2+} -PTE active site

It is clear that to design new and selective organophosphorus degrading agents, it is very important to understand the hydrolysis reaction mechanism [58], and furthermore, it is necessary to take into account the steric and electronic effects in the reaction, also the binding modes of the ligand [59]. In this context, the QM/MM techniques could be employed for the comprehension of the interaction modes between organophosphorus compounds and PTE. In fact, the realization of this work is an important step in understanding the PTE reaction mechanism. The following table shows the QM calculation results carried out at the DFT level with Gaussian 09, as well as some experimental

values of K_{cat}/K_M (catalytic efficiency) of the wild-type PTE for the S_p -enantiomer of each compound [60].

Table 2 - Experimental results and relative activation energy values for Zn^{2+} -PTE with 4 different nerve agents.

Compounds*	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol ⁻¹)	Vibrations	K_{cat}/K_M ($\times 10^4 M^{-1} min^{-1} \pm SD$)**
1(R_p)	77.11	i141.79	
1(S_p)	25.29	i144.62	823 +/- 68
2(R_p)	60.62	i89.43	
2(S_p)	40.55	i109.94	98 +/- 31
3(R_p)	113.1	i122.24	
3(S_p)	0.00	i121.07	69000 +/- 1400
4(R_p)	78.94	i108.56	
4(S_p)	98.69	i132.63	0.94 +/- 0.07

*Compounds: (1) Sarin; (2) Soman; (3) Tabun; (4) VX

**Experimental values of K_{cat}/K_M (catalytic efficiency) from Cherny et al, 2013 [62]

The hydrolysis mechanism takes place according to the following steps: (1) First, the water molecule activation by the transfer of the proton to the Asp131 amino acid residue occurs. (2) Nucleophilic attack of the activated water to the central phosphorus takes place, and then the expulsion of the leaving group (X group) (Fig. 1). According to this figure, the metal has an important role by assisting the water molecule activation and assisting the hydroxyl ion attack to

the P atom, making it a more positive site due to the direct interaction of the metal with the oxygen atom (O=P) [61]. The stereochemistry of the compounds, as well as the characteristics of the leaving group, is fundamental to determine the efficiency of PTE on the transformation steps [14, 62]. Table 2 shows the relative activation energy values, $\Delta\Delta E^\ddagger$, of the R_p and S_p-enantiomers for each compound. The results are given in relation to Tabun for the S_p-enantiomer, which presented the lowest activation energy, making this value equal to zero. These energy values were calculated by DFT calculations from the QM region.

Experimental studies performed by Wille et al [63] have demonstrated the importance of the PTE enzyme for the treatment of the poisoning caused by organophosphorus compounds. In their work, the rate constants for the degradation of the nerve agents Soman and VX by the PTE enzyme were evaluated [64]. According to their results, a rapid decrease of the inhibitory activity towards AChE was observed for Soman, and this compound was more quickly degraded in relation to VX, which is in a good agreement with our theoretical results. So, for VX, a large increase in enzyme amount to process the hydrolysis mechanism is needed, since, according to our theoretical results, VX has shown higher activation energy values when compared to Soman (Table 2).

Furthermore, Table 2 highlights that our theoretical results of relative activation energy ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for the S_p-enantiomers are according with the experimental values presented by Cherny *et al.* [62]. In addition, by analyzing the S_p-enantiomers of the compounds studied, the highest activation barrier value is associated to VX and, in this case, the chemical reaction is substantially slow. On the other hand, the S_p-enantiomer of Tabun presents the lowest activation energy, i.e., for this compound, the PTE enzyme showed the best efficiency for degradation (see K_{cat}/K_M value in Table 2) and consequently the reaction occurs more quickly. After Tabun, the compound with the lowest activation energy value was Sarin (Table 2). From our theoretical calculations,

the descending reactivity order for the PTE wild-type enzyme, considering the S_p -enantiomers of the compounds, is as follows: Tabun > Sarin > Soman > VX, which corroborate with the K_{cat} / K_M values.

Regarding the stereochemical preference of the enzyme, it is important to keep in mind that the hydrolysis of one enantiomer takes place preferentially in relation to the other [13], and our findings put in evidence that we were able to clearly see this characteristic in our study of the reaction mechanism. For Sarin, the enzyme showed a significant selectivity and a preference for the S_p -enantiomer, with an energy varying of $51.82 \text{ kcal.mol}^{-1}$. For Soman, there was a preference for the S_p -enantiomer and an energy difference of $20.07 \text{ kcal.mol}^{-1}$. For Tabun, the best substrate for PTE among those studied, there was also a preference for the S_p -enantiomer and an energy difference of $113.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, with this compound presenting the highest selectivity by enzyme (Table 2). On the other hand, for VX, there was a preference for the R_p -enantiomer and an energy difference of $19.75 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Our goal was to elucidate the preference of wild-type PTE for some organophosphorus compounds, since the preference of the enzyme by R_p and S_p -enantiomers is not clearly reported in the literature so far.

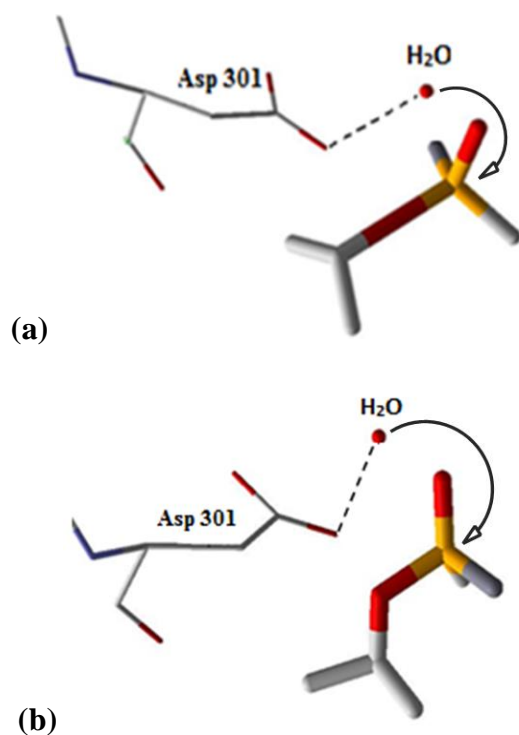


Figure 10 - R_p -enantiomer (a) and S_p -enantiomer (b) of Sarin in Zn^{2+} -PTE active site.

By observing Fig.10, we can observe that the S_p -enantiomer of Sarin provides a more satisfactory conformation that allows an easier attack of the activated water on the phosphorus center [65]. In this conformation, there is a reduction of steric hindrances due to the displacement of groups in the Sarin structure. We also can see this phenomenon in the reaction mechanism of the other compounds studied in this work, and this is due to the stereochemistry, which interferes directly in the reaction speed, as well as the groups that constitute the compound structure. In this sense, the hydrolysis rates of the P-S bond have been shown to be significantly slower as compared to P-O and P-F bonds [14], and this

statement can explain the slowness of the hydrolysis reaction for VX, with this compound being the only one with a P-S bond, which is slowly hydrolyzed. Furthermore, VX has a more bulky group, and it increases the steric hindrance in the active site, with the attack of the water at the phosphorus center becoming more difficult [65].

By observing Table 2, we can realize that the S_p -enantiomer of VX is not a favorable conformation, because there is a bigger steric hindrance than for the R_p -enantiomer. For this compound, the R_p conformation shows itself as being more favorable, allowing a better attack of the water at the phosphorus center. These conditions can, in principle, rationalize the activation energy values obtained for both enantiomers of VX (Table 2), in which the PTE enzyme hydrolyzes preferentially the R_p -enantiomer instead of the most toxic S_p -enantiomer.

3.4 Mechanistic studies in the Al^{3+} -PTE active site

In an attempt to increase the activity of the PTE wild-type [66], mainly for VX that is degraded slowly in the hydrolysis mechanism, modifications in the active site were carried out. It has been well-known that the wild-type enzyme contains two Zn^{2+} ions per monomer, which can be replaced, for example, by Cd^{2+} , Co^{2+} , etc., without loss of catalytic activity of the enzyme [11]. Keeping this in view, we have substituted the Zn^{2+} by Al^{3+} ions, which is a stronger Lewis Acid [67, 68]. Thus, new QM/MM calculations with Al^{3+} instead of Zn^{2+} ions were performed in the PTE enzyme. Table 3 shows the theoretical results with the Al^{3+} ions in the active site from the QM region.

Table 3 - Relative activation energies ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for Al^{3+} -PTE with 4 different nerve agents.

Compounds*	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol ⁻¹)	Vibrations
1 (R_p)	12.33	i321.16
1 (S_p)	18.47	i364.94
2 (R_p)	9.044	i279.03
2 (S_p)	4.286	i320.93
3 (R_p)	0.00	i284.28
3 (S_p)	11.63	i314.21
4 (R_p)	30.54	i334.19
4 (S_p)	30.08	i300.58

*Compounds: (1) Sarin; (2) Soman; (3) Tabun; (4) VX

Aluminum is one of the most abundant metals in the Earth's crust [47], and Al^{3+} ion is known to interact with many enzymes and alter their functions. This interaction between the Al^{3+} ion and biomolecules should be studied in a large system, like an enzyme, but due to the high complexity, the study in subsystems is necessary [69]. In fact, aluminum can form hydrolysis products depending on the pH conditions, being that Al^{3+} is able to form complexes with several ligands, including phosphate and organic compounds [70].

By observing Table 3, it can be seen that PTE with Al^{3+} ions showed a better efficiency in the hydrolysis mechanism. All the compounds showed smaller activation energies indicating that they are more quickly degraded by the enzyme with Al^{3+} ions. The wild-type PTE did not show good efficiency for the degradation of VX; on the other hand, the Al^{3+} -enzyme presented certain efficiency, substantially decreasing the activation energy of this compound, which is a positive aspect.

According to Table 3, it is possible to notice that the Al^{3+} -enzyme, contrary to the wild-type one, presented the best efficiency for the R_p -enantiomer of Tabun, and this also suggest that Al^{3+} ions influence the stereoselectivity of the enzyme. For VX, it still has the highest activation energy values in relation to the other compounds, but they are smaller compared to the wild-type enzyme values. There was an inversion of the stereochemical preference of the PTE enzyme in most of the compounds, being Sarin, Tabun and VX, but Soman that maintained it. It is well-known that Al^{3+} ion has a strong polarizing power [67, 68], and it can allow a more rapid activation of the water to attack the phosphorus center. In addition, this ion, due to the affinity by electrons, more strongly attracts the π -electrons of the double bond between oxygen and phosphorus atoms, weakening the binding and the leaving group being expelled more quickly.

By substituting the divalent cations in the PTE active site, the difference in performance and stereochemical preference can be explained, according to Hong and Raushel [71], as follows: (1) There may be a reduction in the pKa of the bound water molecule leading to an increase of the nucleophilicity [2]. (2) There may be an increase in the electrophilic character of the phosphorus center due to polarization of the P=O as well as P=S bond. This process can, then, facilitate the attack of the hydroxyl ion from the water molecule to the phosphorus center. (3) Neutralization of the negative charge kept on the leaving group.

For Zn^{2+} ion, the tetrahedral structure is the most common, and on the other hand, the Al^{3+} ion, which is a small cation and highly charged, adopts tetrahedral or octahedral geometry, depending on the ligand which it will bind [72]. In this sense, the geometry adopted by Al^{3+} in the PTE active site may have influenced the change in the stereochemical preference of this enzyme for PTE stereochemistry on the most of compounds studied [60, 73].

Conclusions

In this theoretical study, the interaction mode between the PTE wild-type enzyme and organophosphorus compounds, Sarin, Soman, Tabun and VX was evaluated by mean of QM/MM calculations. Our theoretical results corroborate the experimental values of K_{cat}/K_M . The reduction of the activation energy in the Al^{3+} -PTE enzyme shows clearly that this mutant enzyme interacted much more with the OP studied in this work, showing itself more efficient than the wild-type PTE enzyme. By means of MD simulation, it was possible to verify that the metal substitution does not lead to a destabilization in the enzyme active site.

Furthermore, several factors may contribute to the PTE stereochemical preference, such as the structural and electronic parameters of the substrates in the enzyme active site. According to our studies, the displacement of Zn^{2+} ions by Al^{3+} ions changed this preference, as well as decreased the energetic barrier of the reaction. In case of poisoning by OP, a rapid detoxification process is important and this modified PTE can contribute to it. From our results, PTE is an ideal candidate for the bioremediation of the intoxication caused by those compounds. Global efforts have been done in order to eliminate chemical warfare agents, and this is still a broad field of study [74].

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

Authors thank the Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES, and CNPq for the financial support of this research and UFLA for infrastructure and

encouragement in this work. TCR acknowledges University of Hradec Kralove for the research fellowship and support.

References

1. Raushel, F.M.; Holden, H.M. Phosphotriesterase: an enzyme in search for its natural substrate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **2000**, *74*, 51-93.
2. Ecobichon, D.J. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill*, **2001**, *6*, 763-810.
3. Perezgasga, L.; Sánchez, L.S.; Sánchez-Sánchez, L.; Aguila, S.; Vazquez-Duhalt, R. Substitution of the Catalytic Metal and Protein PEGylation Enhances Activity and Stability of Bacterial Phosphotriesterase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2012**, *166*, 1236-1247.
4. Caldwell, S.R.; Raushel, F.M. Transition-state structures for enzymatic and alkaline phosphotriester hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1991**, *31*, 59-73.
5. Yang, H.; Carr, P.D.; McLoughlin, S.Y.; Liu, J.W.; Horne, I.; Qiu, X.; Jeffries, C.M.; Russell, R.J.; Oakeshott, J.G.; Ollis, D.L. Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein. Eng.*, **2003**, *16*, 135-145.
6. Koepke, J.; Scharff, E.I.; Lucke, C.; Ruterjans, H.; Fritzsche, G. Atomic resolution crystal structure of squid ganglion DFPase. *Acta Crystallogr. Sect.*, **2002**, *58*, 1757-1759.
7. Meng, Z.; Yamazaki, T.; Sode, K. Enhancement of the catalytic activity of an artificial phosphotriesterase using a molecular imprinting technique. *Biotechnol. Lett.*, **2003**, *25*, 1075-1080.
8. Dumas, D.P.; Caldwell, S.R.; Wild, J.R.; Raushel, F.M. Purification and properties of the phosphotriesterase for *Pseudomonas diminuta*. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19659-19665.
9. Donarski, W.J.; Dumas, D.P.; Heitmeyer, D.P.; Lewis, V.E.; Raushel, F.M. Structure-activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry.*, **1989**, *28*, 4650-4655.
10. Li, W.S.; Lum, K.T.; Chen-Goodspeed, M.; Sogorb, M.A.; Raushel, F.M. Stereoselective detoxification of chiral sarin and soman analogues by phosphotriesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2083-2091.

11. Omburo, G.A.; Kuo, J.M.; Mullins, L.S.; Raushel, F.M. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 13278-13283.
12. Benschop, H.P.; De Jong, L.P.A. Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, 368-374.
13. Hong, S.B.; Raushel, F.M. Stereochemical Preferences for Chiral Substrates by the Bacterial Phosphotriesterase. *Chem. Biol. Interact.*, **1999**, *119*, 225-234.
14. Hong, S.B.; Raushel, F.M. Stereochemical preference for chiral substrates by the bacterial phosphotriesterase. *Chem. Biol. Interact.*, **1999**, *119-120*, 225-234.
15. Lewis, V.E.; Donarski, W.J.; Wild, J.R.; Raushel, F.M. Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 1591-1597.
16. Tsai, P.C.; Bigley, A.; Li, Y.; Ghanem, E.; Cadieux, C.L.; Kasten, S.A.; Reeves, T.E.; Cerasoli, D.M.; Raushel, F.M. Stereoselective Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents by the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry*, **2010**, *49(37)*, 7978-7987.
17. Chae, M.Y.; Postula, J.F.; Raushel, F.M. Stereospecific enzymatic hydrolysis of phosphorus-sulfur bonds in chiral organophosphate triesters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 1473-1478.
18. Bigley, A.N.; Raushel, F.M. Catalytic Mechanisms for Phosphotriesterases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, *1834(1)*, 443-453.
19. Bigley, A.N.; Xu, C.; Henderson, T.J.; Harvey, S.P.; Raushel, F.M. Enzymatic Neutralization of the Chemical Warfare Agent VX: Evolution of Phosphotriesterase for Phosphorothiolate Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135(28)*, 10426-10432.
20. Singh, M.; Butcher, R.J.; Jasinski, J.P.; Golen, J.A.; Muges, G. Synthesis, characterization and phosphotriesterase mimetic activity of some Zn(II) and Cu(II) complexes. *J. Chem. Sci.*, **2012**, *6*, 1301-1313.
21. Guo, Y.; Wang, R.; Chi, W.; Liu, S.; Shi, H.; Guo, T. One-step synthesis of reactant-product-dual template imprinted capsules as phosphotriesterase mimetic enzymes for pesticide elimination. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 7881.

22. Hehre, W.J.; Deppmeier, B.J.; Klunzinger, P.E. PC SPARTAN Pro. *Wave function Inc., Irvine*, **1999**.
23. Vanhooke, J.L.; Benning, M.M.; Raushel, F.M.; Holden, H.M. Three-Dimensional Structure of the Zinc-Containing Phosphotriesterase with the Bound Substrate Analog Diethyl 4-Methylbenzylphosphonate. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 6020-6025.
24. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3315-3321.
25. Guimarães, A.P.; França, T.C.C.; Ramalho, T.C.; Rennó, M.N.; da Cunha, E.F.F.; Matos, K.S.; Mancini, D.T.; Kuča, K. Docking studies and effects of syn-antiisomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase activators. *J. Appl. Biomed.*, **2011**, *9*, 163-171.
26. Matos, K.S.; Mancini, D.T.; da Cunha, E.F.F.; Kuča, K.; França, T.C.C.; Ramalho, T.C. Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2011**, *10*, 1999-2004.
27. Ramalho, T.C.; Rocha, M.V.J.; da Cunha, E.F.F.; Oliveira, L.C.A.; Carvalho, K.T.G. Understanding the Molecular Behavior of Organotin Compounds to Design their Effective Use as Agrochemicals: Exploration via Quantum Chemistry and Experiments. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2010**, *28(2)*, 227-238.
28. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A new technique for high accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3315-3332.
29. da Cunha, E.F.F.; Mancini, D.T.; Ramalho, T.C. Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 590-600.
30. Ramalho, T.C.; Caetano, M.S.; Josa, D.; Luz, G.P.; Freitas, E.A.; da Cunha, E.F.F. Molecular modeling of Mycobacterium tuberculosis dUTpase: docking and catalytic mechanism studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2011**, *28(6)*, 907-917.
31. de Souza, T.C.S.; Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; Josa, D.; Caetano, M.S. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit. *Mol. Simulat.*, **2008**, *34*, 707-713.

32. Katsemi, V.; Lücke, C.; Koepke, J.; Löhr, F.; Maurer, S.; Fritzsche, G.; Rüterjans, H. Mutational and structural studies of the diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris* shed new light on the catalytic mechanism of the enzyme. *Biochemistry*, **2005**, *44*(25), 9022-9033.
33. da Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; Reynolds, R.C. Binding mode analysis of 2, 4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with *Mycobacterium tuberculosis* and human dihydrofolatereductases. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2008**, *25*, 377-385.
34. Rutkowska-Zbik, D.; Witko, M. Following nature-theoretical studies on factors modulating catalytic activity of porphyrins. *J. Mol. Catal. A.*, **2006**, *258*, 376-380.
35. Kerrigan, J. User manual. In: SpringerReference. Berlin/Heidelberg: *Springer-Verlag*, **1993**, 1-20.
36. Van der Spoel, D.; van Buuren, A.R.; Apol, E.; Meulenhoff, P.J.; Tieleman, D.P.; Sijbers, A.L.T.M.; Hess, B.; Feenstra, K.A.; Lindahl, E.; vanDrunen, R.; Berendsen, H.J.C. GROMACS user manual, version 3.0. Groningen: University of Groningen, **2001**.
37. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics*, **1996**, *14*, 33-38.
38. Guex, N.; Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
39. Edwards, P.M. Origin 7.0: Scientific graphing and data analysis software. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2002**, *42*, 1270-1271.
40. Borman, S.A. Much to do about enzyme mechanism. *Chem. Eng. News*, **2004**, *8*, 35-39.
41. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Zakrzewski, V.G.; Montgomery, J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, J.C.; Dapprich, S.; Millam, J.M.; Daniels, A.D.; Kudin, K.N.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G.A.; Ayala, P.Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J.V.; Baboul, A.G.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng,

- C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E.S.; Pople, J.A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
42. Singh, U.C.; Kollman, P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.*, **1984**, *5*, 129-134.
43. Besler, B.H.; Merz, K.M.; Kollman, P.A. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.*, **1990**, *11*, 431-436.
44. Gustin, D.J.; Mattei, P.; Kast, P.; Wiest, O.; Lee, L.; Cleland, W.W.; Hilvert, D. Heavy atom isotope effects reveal a highly polarized transition state for chorismatase. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1756-1765.
45. Mulholland, A.J. Chemical Accuracy in QM/MM Calculations on Enzyme-Catalysed Reactions. *Chem. Cent. J.*, **2007**, *1*, 19.
46. Puzyn, T.; Mostrag, A.; Falandysz, J.; Kholod, Y.; Leszczynski, J. Predicting water solubility of congeners: chloronaphthalenes--a case study. *J. Hazard. Mater.*, **2009**, *170*(2-3), 1014-22.
47. Zhang, Y.; An, J.; Ye, W.; Yang, G.; Qian, Z.G.; Chen, H.F.; Cui, L.; Feng, Y. Enhancing the promiscuous phosphotriesterase activity of a thermostable lactonase (GkaP) for the efficient degradation of organophosphate pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2012**, *78*(18), 6647-6655.
48. Giacoppo, J.O.; França, T.C.C.; Kuča, K.; da Cunha, E.F.F.; Abagyan, R.; Mancini, D.T.; Ramalho, T.C. Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2014**, *18*, 1-11.
49. Li, R.; Liu, Y.; Zhang, J.; Chen, K.; Li, S.; Jiang, J. An isofenphos-methyl hydrolase (Imh) capable of hydrolyzing the P-O-Z moiety of organophosphorus pesticides containing an aryl or heterocyclic group. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, *94*(6), 1553-1564.
50. Lommerse, J.P.; Motherwell, W.D.; Ammon, H.L.; Dunitz, J.D.; Gavezzotti, A.; Hofmann, D.W.; Leusen, F.J.; Mooij, W.T.; Price, S.L.; Schweizer, B.; Schmidt, U.M.; van Eijck, B.P.; Verwer, P.; Williams, D.E. A test of crystal structure prediction of small organic molecules. *Acta Crystallogr. B.*, **2000**, *56*(4), 697-714.

51. Thangapandian, S.; John, S.; Lazar, P.; Choi, S.; Lee, K.W. Structural origins for the loss of catalytic activities of bifunctional human LTA4H revealed through molecular dynamics simulations. *PLoS One.*, **2012**, *7*(7), e41063.
52. Pala, S.; Dattaa, S.C.; Rezaa, S.K. Interrelationship of Organic Acids and Aluminum Concentrations in Rhizosphere and Nonrhizosphere Soil Solution of Rice in Acidic Soil. *Commun. Soil. Sci. Plan.*, **2011**, *42*, 932-944.
53. Oezguen, N.; Schein, C.H.; Peddi, S.R.; Power, T.D.; Izumi, T.; Braun, W. A "moving metal mechanism" for substrate cleavage by the DNA repair endonuclease APE-1. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **2007**, *68*(1), 313-23.
54. Huang, Z.; Wong, C.F.; Wheeler, R.A. Flexible protein-flexible ligand docking with disrupted velocity simulated annealing. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **2008**, *71*(1), 440-454.
55. Keeffe, J.R. Nucleophilic attack on ketene, 6-methylene-2,4-cyclohexadienylideneketene, 6-oxo-2,4-cyclohexadienylideneketene and 4-oxo-2,5-cyclohexadienylideneketene: an ab initio study. *J. Phys. Org. Chem.*, **2004**, *17*, 1075-1083.
56. Freitas, M.P.; da Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; Goodarzi, M. Multimode Methods Applied on MIA Descriptors in QSAR. *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **2008**, *4*, 273-282.
57. Koca, J.; Zhan, C.G.; Rittenhouse, R.C.; Ornstein, R.L. Coordination number of zinc ions in the phosphotriesterase active site by molecular dynamics and quantum mechanics. *J. Comput. Chem.*, **2003**, *24*(3), 368-378.
58. Dawson, R.M.; Pantelidis, S.; Rose, H.R.; Kotsonis, S.E. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA). *J. Hazard. Mater.*, **2008**, *157*(2-3), 308-314.
59. SANTOS, L.A.; da CUNHA, E.F.F.; FREITAS, M.P.; RAMALHO, T.C. Hydrophobic Noncovalent Interactions of Inosine-Phenylalanine: A Theoretical Model for Investigating the Molecular Recognition of Nucleobases. *J. Phys. Chem. A.*, **2014**, *118*, 5808-5817.
60. Tsai, P.C.; Fox, N.; Bigley, A.N.; Harvey, S.P.; Barondeau, D.P.; Raushel, F.M. Enzymes for the homeland defense: optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Biochemistry*, **2012**, *51*(32), 6463-6475.

61. Raushel, F.M.; Holden, H.M. Phosphotriesterase: an enzyme in search of its natural substrate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **2000**, *74*, 51-93.
62. Cherny, I.; Greisen, P.J.; Ashani, Y.; Khare, S.D.; Oberdorfer, G.; Leader, H.; Baker, D.; Tawfik, D.S. Engineering V-Type Nerve Agents Detoxifying Enzymes Using Computationally Focused Libraries. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *5*, 2394-2403.
63. Wille, T.; Scott, S.; Thiermann, H.; Worek, F. Detoxification of G- and V-series nerve agents by the phosphotriesterase OpdA. *Biocatal. and Biotransfor.*, **2012**, *30(2)*, 203-208.
64. Ramalho, T.C.; França, T.C.; Rennó, M.N.; Guimarães, A.P.; da Cunha, E.F.; Kuca, K. Development of new acetylcholinesterase reactivators: molecular modeling versus in vitro data. *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, *185(1)*, 73-7.
65. Glinka, T.W.; De Laszlo, S.E.; Tran, J.; Chang, R.S. L-161,638: A potent AT-2 selective quinazolinone angiotensin II binding inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 1479-1484.
66. Deeb, O.; da Cunha, E.F.F.; Cormanich, R.A.; Ramalho, T.C.; Freitas, M.P. Computer-assisted assessment of potentially useful non-peptide HIV-1 protease inhibitors. *Chemometr. Intell. Lab.*, **2012**, *116*, 123-127.
67. Clark, J.H. Solid Acids for Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 791-797.
68. Williams, R.J.P. Aluminum and biological systems: an introduction. *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, *149*, 1-9.
69. Larrucea, J. Solvent effect on cation- π interactions with Al³⁺. *J. Mol. Model.*, **2012**, *9*, 4349-4354.
70. Azab, H.A.; El-Nour, K.M.A; Sorrow, S.H. Metal Ion Complexes Containing Dipeptides, Tripeptides, and Biologically Important Zwitterionic Buffers. *J. Chem. Eng. Data.*, **2007**, *52*, 381-390.
71. Hong, S.B.; Raushel, F.M. Metal – Substrate interactions facilitate the catalytic activity of the bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 10904-10912.
72. Martell, A.E.; Hancock, R.D.; Smith, R.M.; Motekaitis, R.J. Coordination of Al (III) in the environment and in biological systems. *Coordin. Chem. Rev.*, **1996**, *149*, 311-328.

73. Masson, P. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol. Lett.*, **2011**, *206(1)*, 5-13.
74. Field, M.J.; Wymore, T.W. Multiscale modeling of nerve agent hydrolysis mechanisms: a tale of two Nobel Prizes. *Phys. Scr.*, **2014**, *89*, 108004.

**ARTIGO 2 - ASYMMETRIC BIOCATALYSIS OF THE NERVE AGENT VX
BY HUMAN SERUM PARAOXONASE 1: MOLECULAR DOCKING AND
REACTION MECHANISM CALCULATIONS**

*O Artigo 2 foi publicado no Periódico científico: Medicinal Chemistry
Research.*

Abstract Organophosphorus compounds (OP) have been employed in agricultural activity for a long time, causing serious public health problems. Due to their toxic properties, these compounds have also been used as chemical weapons. In view of this scenario, the catalytic degradation and the development of bioremediation processes of OP have been of wide interest. Among several enzymes capable of degrading OP, the human serum paraoxonase 1 (HuPON1) has shown good potential for this purpose. To evaluate the interaction mode between the HuPON1 (wild-type and mutants) enzymes and the VX compound, one of the most toxic OP known, molecular docking calculations were conducted. In addition, seeking to analyze the reaction pathway and the stereochemistry preference by HuPON1 and the R_p and S_p enantiomers of VX, QM/MM calculations were performed. Our theoretical findings put in evidence that the wild-type and mutant HuPON1 enzymes strongly interact with VX. Moreover, with the QM/MM study, we observed that the HuPON1 preferentially degrades one enantiomer in relation to the other. The current results indicate key points for designing new, more efficient mutant HuPON1 enzymes for VX degradation.

Keywords Molecular docking • HuPON1 • VX • QM/MM • Mutation • Homology modeling

1.0 Introduction

The overuse of organophosphorus compounds (OP) in the agricultural, domestic and industrial applications has been a serious problem for many decades. Different OP, such as pesticides, are directly introduced into the environment, with only 5% of them reaching the target organism (Rea, 1996). It is well known that these agents have neurotoxic effects on the central nervous system, causing serious public health problems (Ecobichon, 2001).

The toxicity of these agents is due to their binding potential to acetylcholinesterase (AChE), more accurately binding at serine amino acid residue presented in the enzyme active site, not allowing AChE to degrade acetylcholine (Ach), leading to increased levels of this neurotransmitter and producing excessive muscle contractions that eventually cause death through asphyxiation (Ecobichon, 2001; Taylor, 2001). In line with that situation, research has been intensively conducted in order to find processes able to degrade those compounds, avoiding the intoxication. In fact, there are various treatments for poisoning through OP, but they all have significant limitations (Lenz *et al.*, 2007a).

Recently, enzymatic treatment has become an innovative, robust and effective alternative for removing toxic agents (Lenz *et al.*, 2007a). Actually, these “green catalysts” are capable of performing specific reactions very often at an elevated rate not reachable by traditional chemical or physical catalysis (Lenz *et al.*, 2007a; Furlong, 2008). In the last decades, some enzymes have been characterized and one of them, that has shown good potential for this purpose, is the human serum paraoxonase 1 (HuPON1) (Lenz *et al.*, 2007a).

HuPON1 is capable of degrading a wide range of organic esters and OP, which is of significant interest in the medicinal area (Furlong, 2008). For instance, this enzyme is able to cleave pesticides such as paraoxon, and nerve

agents such as VX, Sarin and Soman (**Fig. 1**) (Aharoni *et al.*, 2005; Khersonsky and Tawfik, 2006; Cannard, 2006; Gaidukov and Tawfik, 2007; Furlong, 2008; Yeung *et al.*, 2008; Lenz *et al.*, 2007b). However, the wild-type HuPON1 presents a lower catalytic efficiency than that necessary for significant and efficient protection against intoxication by OP (Rochu *et al.*, 2007a). With this, several mutants from the wild-type enzyme have been proposed in order to improve its efficiency (Cannard, 2006; Yeung *et al.*, 2008; Lenz *et al.*, 2007b; Rochu *et al.*, 2007a). HuPON1 is a Ca^{2+} -dependent serum enzyme whose exact physiological functions are still unknown (La Du *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2002). However, this enzyme shows some important properties, such as anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-atherogenic and anti-diabetic action (Shih *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2002; Mackness and Mackness, 2010; Koren-Gluzer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 1995; Camps *et al.*, 2011).

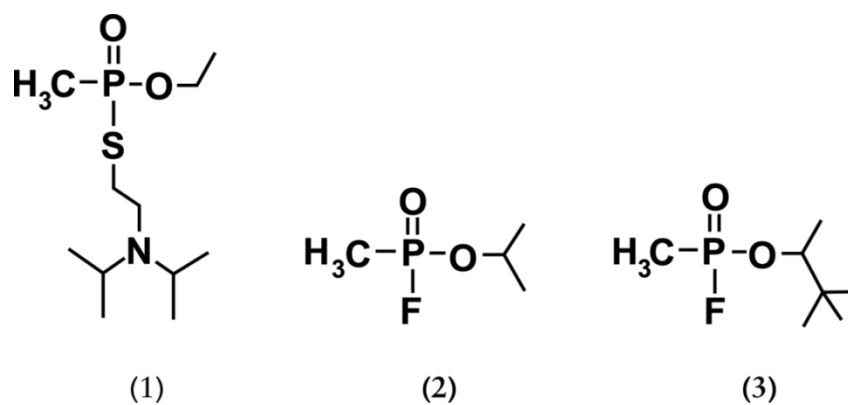


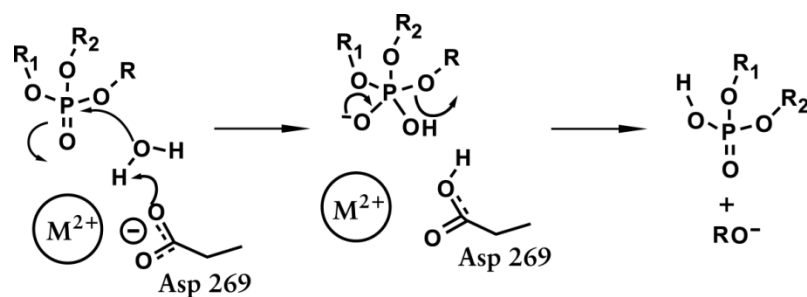
FIGURE 1 Structures of the organophosphorus compounds VX (1), Sarin (2) and Soman (3).

Currently, the crystal structure of HuPON1 has not been elucidated, but high-resolution serum paraoxonase structures have been determined through X-ray crystallography for other organisms (Harel *et al.*, 2004). The structure of this

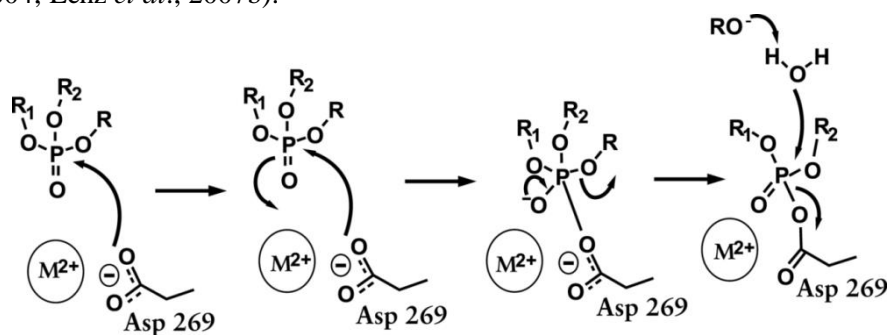
enzyme presents two Ca^{2+} ions and a phosphate group, localized at the active site (Harel *et al.*, 2004). One Ca^{2+} ion with structural function is responsible for maintaining the enzyme structure, and the other is involved directly in the catalytic activity (Kuo and La Du, 1998). The HuPON1 is synthesized in the liver and it is characterized by being bonded to high-density lipoproteins (HDL) in the bloodstream (Yeung *et al.*, 2005). Due to the lack of a complete crystal structure, there is a doubt about the reaction mechanism HuPON1 follows. Thus, the understanding of the HuPON1 substrate recognition mechanism is an important contribution to detail the enzyme-catalyzed reactions in the OP biodegradation process, which can be used as references for designing mutant enzymes with a better degrading activity (Cannard, 2006; Yeung *et al.*, 2008; Lenz *et al.*, 2007b; Rochu *et al.*, 2007a).

One approach to better understand the exact mechanism in which HuPON1 cleaves OP is to determine how the enzyme stabilizes the important chemical intermediates in the reaction pathway. In line with that, we put in evidence three possible potent reaction mechanisms for HuPON1 in the degradation of OP nerve agents (Khersonsky and Tawfik, 2006; Lenz *et al.*, 2007; Yeung *et al.*, 2008; Furlong, 2008; Blum *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2009; Sanan *et al.*, 2010).

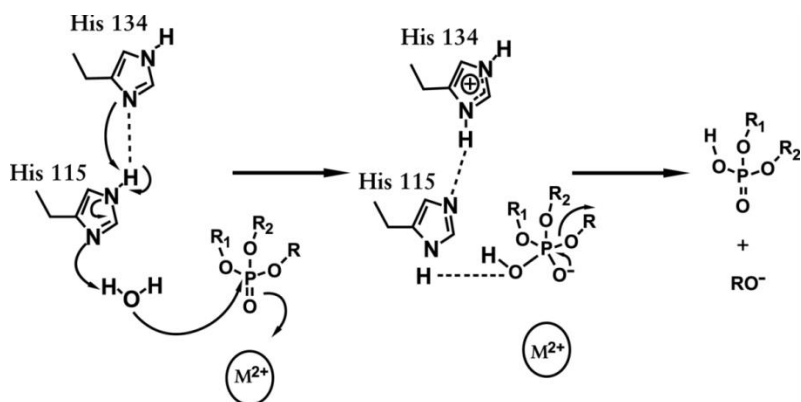
According to previous studies, the first reaction we covered consists of the activation of a water molecule, due to the direct coordination with the catalytic Ca^{2+} ion and removal of a hydrogen atom from the water by Asp269 amino acid residue, leading to the formation of a hydroxyl ion. This activated water directly attacks the OP, more precisely at the phosphorus center, with the expulsion of the leaving group (**Fig. 2-a**) (Dumas *et al.*, 1989; Aubert *et al.*, 2004; Lenz *et al.*, 2007b). This first mechanism reported here is similar to that followed by the Phosphotriesterase enzyme (PTE) in the OP degradation process (Dumas *et al.*, 1989; Aubert *et al.*, 2004).



(a) Mechanism 1 alternative to Worek et al. (Dumas *et al.*, 1989; Aubert *et al.*, 2004; Lenz *et al.*, 2007b).



(b) Mechanism 2 proposed by Worek et al. (Lenz *et al.*, 2007b).



(c) Mechanism 3 proposed by Tawfik et al. (Furlong, 2008)

FIGURE 2 Potent reaction mechanisms followed by the wild-type HuPON1 and its mutants.

For the second possible reaction, no water molecule is involved. In this case, there is an attack on the phosphorus center directly by the Asp269 amino acid residue, equally promoting the expulsion of the leaving group and cleavage of the compound (**Fig. 2-b**) (Lenz *et al.*, 2007b). Finally, the third and last mechanism studied in this contribution consists in the participation of His134 and His115 amino acid residues in the water activation, for the subsequent attack to the OP (**Fig. 2-c**) (Furlong, 2008). Herein, we have proposed that the OP degradation mechanism by the wild-type HuPON1 involves a higher reaction rate in relation to a preferential enantiomer. Probably, the same tendency could be applied to its mutants. Thus, by means of theoretical calculations, it is possible to shed light on those aspects to analyze and confirm this statement.

It is worth mentioning that HuPON1 shows good potential for OP degradation, including VX (Lenz *et al.*, 2007a). Due to the difficulty of degrading VX, this OP has been chosen to take part in our studies, with the wild-type HuPON1 and two mutants, H115Y and V346W. A deeper understanding of the enzymatic hydrolysis mechanism of HuPON1 is essential to raise new insights for the OP bioremediation process. Certainly, the data obtained through this research may lead us to the understanding of the reaction mechanism and the ability of HuPON1 to degrade OP.

In line with that reported so far, the goal of this work is to evaluate the interaction between VX and the wild-type HuPON1 enzyme, including its mutants, H115Y and V346W, by means of molecular docking calculations. In addition, the QM/MM calculations were performed in order to investigate the preferred reaction mechanism for the VX degradation, in an asymmetric biocatalysis, taking into account its enantiomers (R_p and S_p).

2.0 Methods

2.1 Homology modeling and structure minimization

The primary HuPON1 sequence was downloaded from ExPasy (<http://au.expasy.org/>) in the proteomics categories, under the topic of protein sequences and identification, using the UniProtKB database (<http://www.uniprot.org/>). The search for templates with 3D structures available in the Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) was performed with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). The crystallographic structure of recombinant serum paraoxonase 1 (rePON1), at 2.20 Å resolution and R factor = 0.186 (PDB code: 1V04) (Berman *et al.*, 2000), presented the highest sequential identity with HuPON1 (83.7% of sequence identity with the human enzyme), and for this reason, it was chosen as template to build a 3D model of HuPON1. Since, eight aminoacid residues are missing in the 1V04 crystallographic structure, another PON1 template was utilized to model this part in the HuPON1. The **PGIKSFNP** primary sequence in the HuPON1 was modeled from of the 3SRG crystallographic structure obtained from the PDB (Ben-David *et al.*, 2012). The multiple alignment (**Fig. 3**) between templates and the target enzyme was performed using the Clustalw server (Thompson *et al.*, 1994).

The model was constructed on Geno3D server (Combet *et al.*, 2002) and the Swiss-PDB Viewer program (Guex and Peitsch, 1997). In the Geno3D server, a scoring function, assessing favorable interactions (hydrogen bonds, disulfide bridges) and unfavorably close contacts, is applied to select the most likely conformation template. Constraints such as disulfide bonds and cis-prolines can be incorporated into the model building.

The validation of the generated model was performed using the Ramachandran graph (Ramachandran and Sasisekharan, 1968), in which it was

possible to analyze the torsional angle distributions of the ϕ and ψ backbones, responsible for the stereochemical quality of the protein.

After the construction and validation of the model, the Ca^{2+} ions, in which one ion performs structural function and the other Ca^{2+} is directly involved in the reaction mechanism (Kuo and La Du, 1998), were docked to the modeled enzyme by overlap between the target enzyme and enzyme-template with the highest percentage of similarity, using the Swiss-PDB Viewer program (Guex and Peitsch, 1997). The variants H115Y and V346W were obtained by mutation in the HuPON1 active site, i.e., the H115 and V346 amino acids residues were mutated to tyrosine and tryptophan, respectively. This procedure was described previously by Peterson et al. (Peterson *et al.*, 2011).

The generated models were minimized using the GROMACS 5.1 package (Van der Spoel *et al.*, 2001) and the OPLS force field (Jorgensen *et al.*, 1996). The minimization algorithm used was steepest descent and 50000 was the maximum number of steps performed.

2.2 Docking procedure

The docking study was performed using the VX compound (**Fig. 1**), because, according to literature, it is one of the most toxic OP known (Rea, 1996). The docking calculations were carried for the VX in the R_p and S_p conformations. The 3D structures of the two different VX conformations were constructed by using the PC Spartan Pro® (Hehre *et al.*, 1999) program and the partial charges of the atoms were elucidated. The VX was docked inside the crystallographic structures of the wild-type HuPON1 built from the 1V04 template (Harel *et al.*, 2004; Fairchild *et al.*, 2011) and HuPON1 with H115Y and V346W mutations. The docking studies were carried using the Molegro Virtual Docker (MVD®)

program (Thomsen and Christensen, 2006), taking into account the same procedures previously used (Guimaraes *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2011; da Cunha *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). For better results, the amino acid residues within a radius of 5 Å were kept flexible. It is important to highlight that within this radius, it was possible to find the main amino acid residues that participate in the hydrolysis process, such as Asp269 (Lenz *et al.*, 2007b; Furlong, 2008). Due to the nature of the docking methods, the calculations were executed, generating 50 poses (conformation and orientation) for the ligand. The best pose was taken for additional studies, analyzing the ligand-protein interactions inside the wild-type and mutants HuPON1 active site. The best VX pose was selected according to its best interaction energy with the enzyme and taking into account its accommodation in the active cavity, providing the best conformation for the reaction mechanism calculations (QM/MM).

The MolDock scoring function employed in the MVD program comes from the piecewise linear potential (PLP), a simplified potential whose parameters are fitted to protein-ligand structures, binding data scoring functions and further extended in the Generic Evolutionary Method for molecular docking with a new hydrogen bonding term and new charge schemes (Thomsen and Christensen, 2006; Ramalho *et al.*, 2010). The docking scoring function values, E_{score} , are defined by Eq. 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

where, E_{inter} is the intermolecular interaction energy of the ligand-protein and the E_{intra} is the internal energy of the ligand. The E_{inter} is shown in Eq. 2:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

the E_{PLP} term represents the PLP (piecewise linear potential) energy, which consists of the use of two different parameter sets, described as follows: one for approximation of the steric term (Van der Waals) among atoms, and the other potential for the hydrogen binding. The second term $\left(332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right)$ is related to the electrostatic interactions among overloaded atoms. It is a Coulomb potential with a dielectric constant dependent on the distance ($D(r) = 4r$). The numerical value of 332.0 is responsible for the electrostatic energy unit to be given in kilocalories per molecule (Thomsen and Christensen, 2006). The q_i and q_j terms represent the charges of the atoms i and j , respectively. The r_{ij} term indicates the interatomic distance between the atoms i and j (Thomsen and Christensen, 2006).

The E_{intra} is shown in Eq. 3.

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{ligand}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexiblebonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (3)$$

The first part of the equation (double summation) is among all pairs of atoms in the ligand, taking off those which are connected by two bonds. The second term characterizes the torsional energy, where θ is the torsional angle of the bond and θ_0 is its corresponding value in the equilibrium. The average of the torsional energy bond contribution is used if several torsions could be

determined. The last term, E_{clash} , assigns a penalty of 1.000 if the distance between two heavy atoms (more than two bonds apart) is shorter than 2.0 Å, not taking into account infeasible ligand conformations (Thomsen and Christensen, 2006). The docking search algorithm that is applied in the MVD program considers an evolutionary algorithm, the interactive optimization techniques which are inspired by Darwinian evolution theory, and a new hybrid search algorithm called guided differential evolution. This hybrid combines the differential evolution optimization technique with a cavity prediction algorithm during the search process, thus allowing a fast and accurate identification of potential binding modes (poses) (da Cunha *et al.*, 2004a; da Cunha *et al.*, 2004b; Thomsen and Christensen, 2006).

2.3 Sequential - QM/MM study

Large systems, such as proteins, cannot currently be treated exclusively by QM methods with high electronic correlation due to high computational demand (Borman, 2004). Thus, a theoretical strategy able to explore the conformational space of ligands in the enzyme active site is very important. It is well-known that from a theoretical point of view, molecular dynamics simulations can be used to evaluate the molecular flexibility of ligands and receptors. However, it is worth mentioning that some conformational changes occur in the time scale of only dozens of nanoseconds, which could compromise the MD simulation viability for virtual screening studies, for instance.

Based on this context, a sequential QM/MM calculation has been performed, for which the MM part was obtained from the docking results. The VX and amino acid residues conformations, obtained from the molecular docking, were extracted to keep only the QM region, which was formed by one water

molecule, two Ca^{2+} ions (cofactors), as well as Tyr115, Asp269 and VX (R_p and S_p) for Mechanism **1**; one water molecule, two Ca^{2+} ions, Tyr115, Asp269 and VX (R_p and S_p) for Mechanism **2** and one water molecule, cofactors, His115, His134, Tyr115 and VX (R_p and S_p) for Mechanism **3**. For all QM systems, the neighboring peptides within a radius of 5 Å were considered. It should be kept in mind that using the sequential QM/MM approach, there is no coupling between QM and MM regions, so the quantum-classical boundary problems were solved with this new methodology (Ramalho *et al.*, 2011).

These structures were optimized at the density functional theory (DFT) level with B3LYP density functional and 6-31G (d, p) basis set (da Cunha *et al.*, 2004b; Puzyn *et al.*, 2009) using the Gaussian 09 program (Frisch, 1998). This relationship of functional and basis sets has been tested for similar systems (Rutkowska-Zbik and Witko, 2006; da Cunha *et al.*, 2010). Recently, DFT techniques have been employed with success, showing good performance for large systems, such as biomolecules. (Singh and Kollman, 1984; Besler *et al.*, 1990).

All transition states (TS), intermediates and precursors involved were calculated and characterized by frequency calculations (Li *et al.*, 2012; Giacompo *et al.*, 2014). Theoretical studies with the wild-type HuPON1 and its mutants have been performed by several research groups, showing the importance of this subject for the understanding of the enzymatic catalysis (Rochu *et al.*, 2007b; Ben-David *et al.*, 2012; Muthukrishnan *et al.*, 2012; Saleem *et al.*, 2012; Patra *et al.*, 2014).

3.0 Results and discussion

3.1 Modeling by Homology

In the first stage of this work, the primary sequence of the HuPON1 (P27169) was aligned with enzyme sequence templates using the Clustalw server (Thompson *et al.*, 1994). After the alignment (**Fig. 3**), it was revealed that the target enzyme (**Fig. 4-a**) showed more than 80% sequential identity in relation to the enzymes-templates. These results are valid, since according to literature, reliable models have identity values higher than 30% (<http://au.expasy.org/>) (Kufareva *et al.*, 2011).

```

pdb1V04_A  LFDRQSSFQTRFNVHREVTPVELPNCNLVKGIDNGSEDEILPNGLAFISSGLKY----
HuPON1     LFRNHQSSYQTRLNALREVQPVELPNCNLVKGIEGSEDLEILPNGLAFISSGLKYPGIK
pdb3SRG_A  ---RQKSSFQTRFNVHREVTPVELPNCNLVKGIDNGSEDEILPNGLAFISSGLKYPGIM
           :*:**:***:*  *** *****: *****

pdb1V04_A  ---DKSGKILLMDLNEKEPAVSELEIIGNTLDISSFNPHGISTFIDDDNTVYLLVFNHP
HuPON1     SFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTFTDEDNAMYLLVFNHP
pdb3SRG_A  SFDPPKSGKILLMDLNEKEPAVSELEIIGNTLDISSFNPHGISTFIDDDNTVYLLVFNHP
**.*: *****:*.*** ** * :*:***** *.*:*****

pdb1V04_A  GSSSTVEVFKFQEEKSLHLKKTIRHKLLPSVNDIVAVGPEHFYATNDHYFIDPYLKSWE
HuPON1     DAKSTVELFKFQEEKSLHLKKTIRHKLLPNLNDIVAVGPEHFYGTNDHYFLDPYLSWE
pdb3SRG_A  GSSSTVEVFKFQEEKSLHLKKTIRHKLLPSVNDIVAVGPEHFYATNDHYFIDPYLKSWE
: *****:*****:*****:*****:*****

pdb1V04_A  MHLGLAWSFVTTYSPNDVRVVAEGDFDFANGINISPDGKYVYIAELLAHKIHVYEKHWNT
HuPON1     MYLGLAWSYVVYSPSEVRVVAEGDFDFANGINISPDGKYVYIAELLAHKIHVYEKHWNT
pdb3SRG_A  MHLGLAWSFVTTYSPNDVRVVAEGDFDFANGINISPDGKYVYIAELLAHKIHVYEKHWNT
*.*****.* ** * :*****

pdb1V04_A  LTPLRVL SFDTLVDNISVDPVTGDLWVGCHPNGMRIFFYDAENPPGSEVLRIQDILSEEP
HuPON1     LTPLKSLDFNTLVDNISVDPETGDLWVGCHPNGMKIFFYDSENPPASEVLRIQNILTEEP
pdb3SRG_A  LTPLRVL SFDTLVDNISVDPVTGDLWVGCHPNGMRIFFYDAENPPGSEVLRIQDILSEEP|
*****: * *:***** *****:*****:*****:*****:*****

pdb1V04_A  KVTVVYAENGTVLQGSTVAAVYKGLLIGTVFHKALYCDL
HuPON1     KVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKGLLIGTVFHKALYCEL
pdb3SRG_A  KVTVVYAENGTVLQGSTVAAVYKGLLIGTVFHKALYCDL
*** *****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURE 3 Multiple alignment among 1V04, 3SRG and HuPON1 sequences. The “*” indicate the identical residues and “:” similar residues. The “----” indicate the missing residues in the 3D structures of the templates.

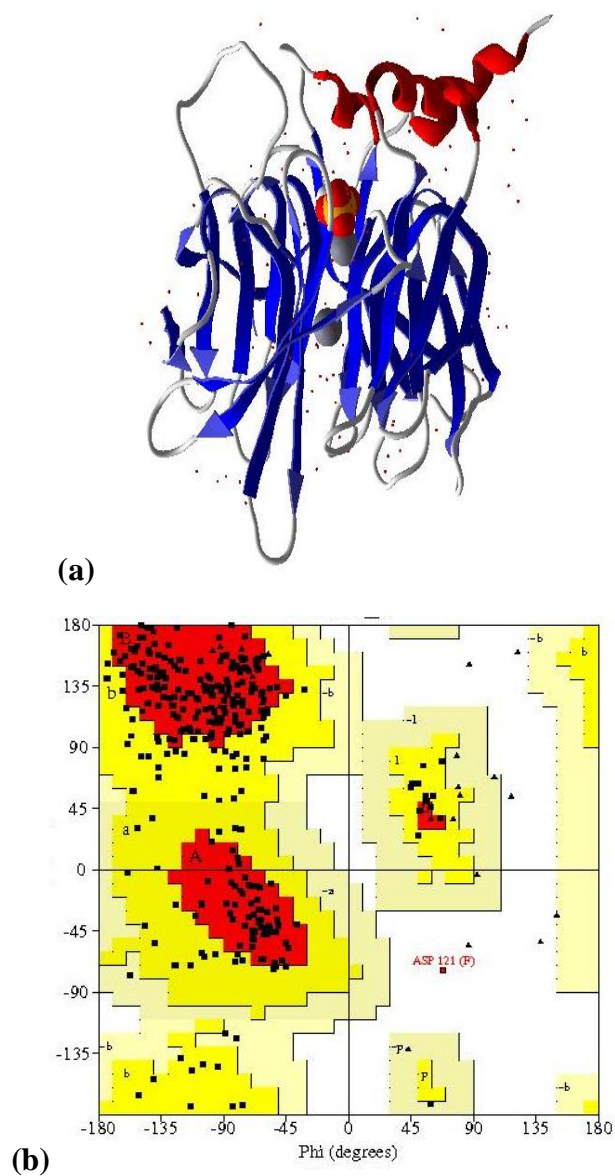


FIGURE 4 (a) 3D structure of the modeled enzyme (b) Ramachandran graph for modeled HuPON1, where the most favorable regions are shown in red, the allowed in yellow, the generously allowed in light yellow and the not allowed in white. Triangles represent the glycine residues and the squares are all other amino acid residues.

The Ramachandran graph generated during the validation of the HuPON1 model presented 99.7% of the residues in favorable regions (**Fig. 4-b**), which is suitable for models generated by homology. It is noteworthy that the Asp121 amino acid residue is found in regions not allowed. However, according to the alignment (**Fig. 3**), it was found that this residue does not make up of the enzyme active site, thus not interfering in the docking calculations.

3.2 Docking Studies

In order to evaluate the first stage of the transformation, docking calculations were carried out. In fact, methods based on the molecular mechanics involving docking procedures are suitable tools to adjust ligands at target sites and to estimate interaction energies (affinity).

For the docking studies, a cavity prediction algorithm based on a 3D box was used to generate binding sites of the HuPON1 enzyme through Molegro Virtual Docker program (Thomsen and Christensen, 2006). The cavity volume values were 283.136 Å³ for wild-type HuPON1, 346.112 and 368.128 Å³ for the H115Y and V346W mutants, respectively. It is quite interesting to notice that the substitution of one amino acid residue, in the mutants' construction, led to an increase in the active cavity volume, in relation to the wild-type enzyme (**Fig. 5**).

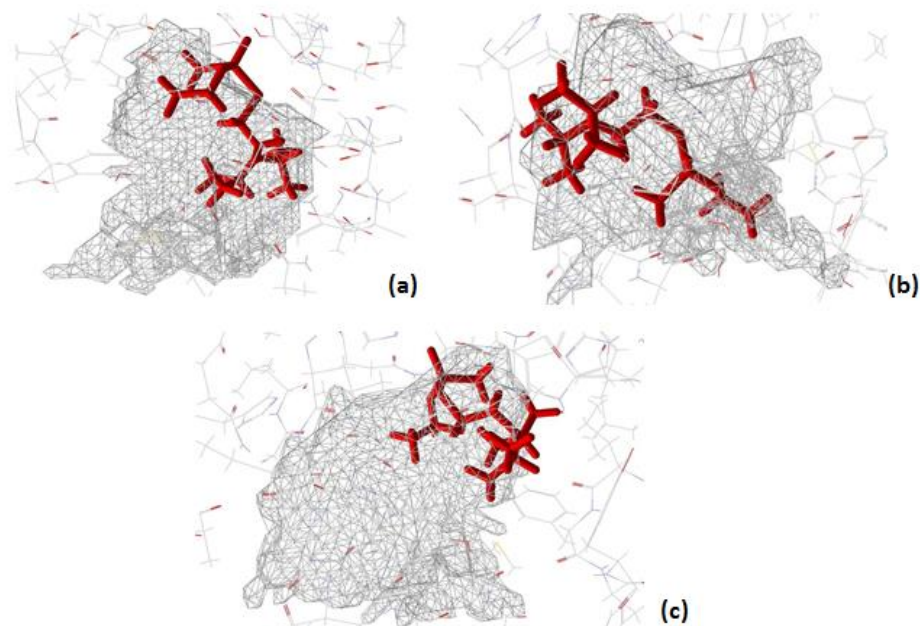


FIGURE 5 The best poses of VX inside the active cavity after docking (a) wild-type HuPON1 (b) H115Y mutant and (c) V346W mutant.

The intermolecular interaction energies between HuPON1 and VX were determined in order to evaluate the structural and electronic aspects that dictate the binding modes of VX in the active site, taking into account its R_p and S_p enantiomers. It is possible to observe in Table 1 that both, VX- R_p and VX- S_p , have shown good intermolecular interaction energy values in the active site of the HuPON1 enzymes.

TABLE 1 Docking results for VX in the R_p and S_p conformations in the wild-type and mutant HuPON1 active site.

Enzymes	Interaction Energy (kcal mol ⁻¹)	Residues and H ₂ O	H-Bond Strength	Interaction Energy (kcal mol ⁻¹)	Residues and H ₂ O	H-Bond Strength
	VX- R_p			VX- S_p		
Wild-type	-47.38	H ₂ O H ₂ O	-2.50 -2.50	-50.33	H ₂ O	-2.50
H115Y	-92.08	Tyr 115 H ₂ O	-2.26 -0.60	-92.90	Tyr 115 H ₂ O	-2.50 -0.75
V346W	-100.28	-	-	-99.81	H ₂ O	-1.37

According to results shown in Table 1, no selectivity was observed for the wild-type HuPON1, this fact is due to the proximity of the intermolecular energy values for the VX- R_p and VX- S_p , -47.38 kcal mol⁻¹ and -50.33 kcal mol⁻¹, respectively. For this enzyme, we observed an intermolecular energy difference of 2.95 kcal mol⁻¹ between the enantiomers. On the other hand, for the mutant H115Y, the VX- R_p and VX- S_p have shown almost the same energy values, -92.08 kcal mol⁻¹ and -92.90 kcal mol⁻¹, respectively. In this case, the energy difference was too small, 0.82 kcal mol⁻¹.

Furthermore, it is possible observed in Table 1 that mutant V346W presented the lowest interaction energy values for both VX enantiomers, thus presenting the most stable and favorable conformations in the active site (see **Fig. 6**). These values were -100.28 kcal mol⁻¹ and -99.81 kcal mol⁻¹ for the VX- R_p and VX- S_p ,

respectively. The energy difference was just $0.47 \text{ kcal mol}^{-1}$ between the enantiomers, with no apparent selectivity (**Table 1**).

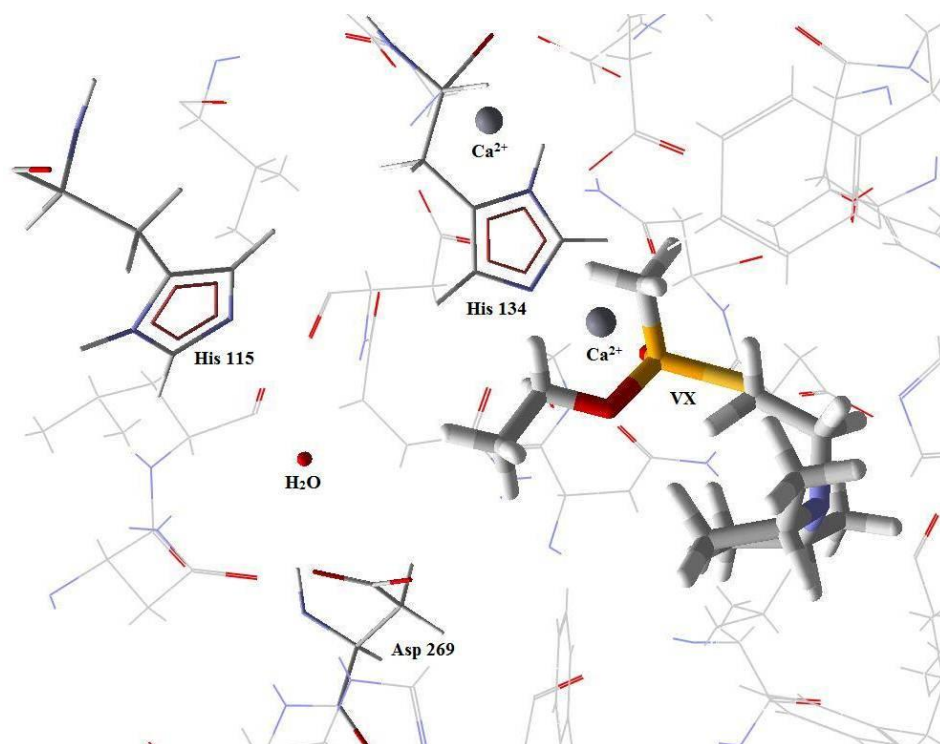


FIGURE 6 The best pose of the VX-*S_p* in active site of the V346W mutant after docking. The key residues of the active site were reported.

According to the docking results, it is possible to establish the following descending order of interaction for both VX enantiomers: V346W mutant > H115Y mutant > wild-type HuPON1. The different volumes of the active cavity may have influenced in this trend. The V346W mutant presented the largest binding site, which assists more significantly for a better accommodation of the ligand within it during the docking procedure. On the other hand, the wild-type enzyme presented the smallest volume of active cavity, in relation to the mutant

enzymes, also according to the descending order exposed just above. It is important to highlight that the VX structure is significantly large and a more bulky cavity favors its accommodation in the enzyme active site (Figure 5).

From the docking studies of VX enantiomers, H-bonds between the enzymes and VX were also evaluated. According to Table 2, VX- R_p performed hydrogen bonds with two water molecules in the wild-type HuPON1 active site. In turn, the VX- S_p also presented the same interaction with water, but in this case with just one molecule (see Fig. 7). The interactions with water molecules can help to stabilize these enantiomers in the wild-type HuPON1 active site and are important for the reaction mechanism studies described ahead.

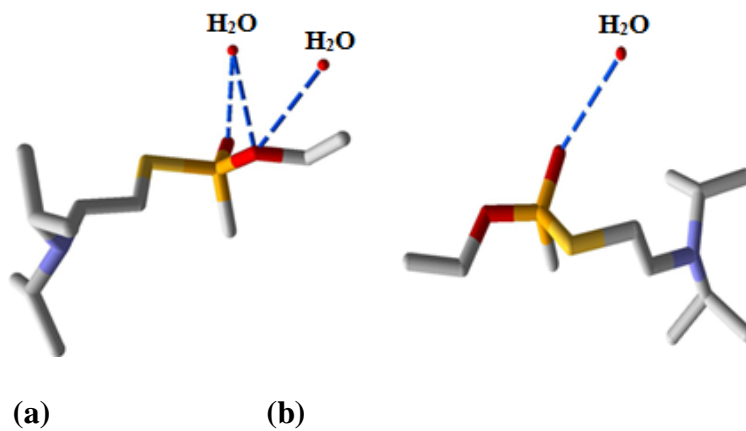


FIGURE 7 H-bonds of VX- R_p (a) and VX- S_p (b) in active site of the wild-type HuPON1 after docking.

For the mutant H115Y enzyme, VX- R_p has shown, in addition to an interaction with one water molecule, a hydrogen bond with the Tyr115 amino acid residue. An interesting factor is that this mutant enzyme was the only one wherein VX performed a hydrogen bond with an amino acid residue, in this case, by both enantiomers. VX- S_p performed a hydrogen bond with one water

molecule and also the Tyr115 amino acid residue (see **Fig. 8**). It is important to highlight that the H115Y mutation caused a more promising binding environment, increasing the number of H-bond interactions, and in this case, even performing H-bonds with amino acid residues, a fact not observed for the wild-type HuPON1.

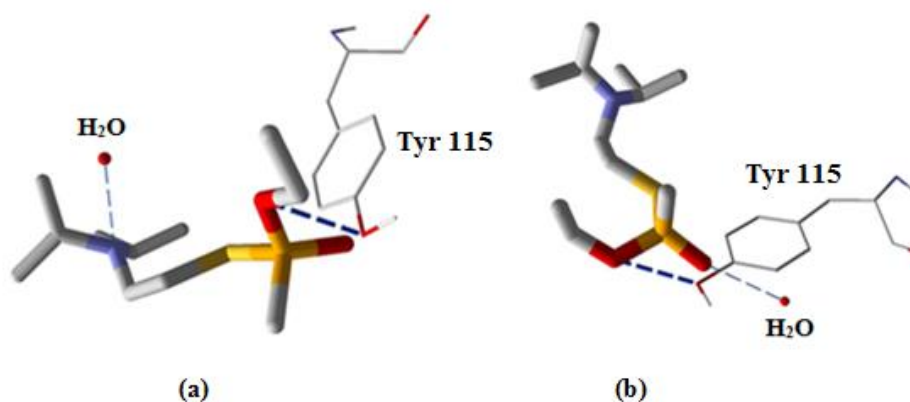


FIGURE 8 H-bonds of VX- R_p (a) and VX- S_p (b) in active site of the H115Y mutant after docking.

By analyzing the interactions performed by VX in the HuPON1 active site with V346W mutation, it is possible to notice that VX- R_p did not perform any hydrogen bond with amino acid residues or water. Due to the lower energy value for VX- R_p , it is understood that this ligand is not stabilized in the active site by hydrogen bonds. The absence of these interactions leads us to believe that there are other factors which make the docking of this ligand so favorable, as for instance, structural factors, allowing a good accommodation of VX- R_p in the enzyme active cavity. On the other hand, VX- S_p is also stabilized in the active site by forming a hydrogen bond with one water molecule, as represented in Figure 9.

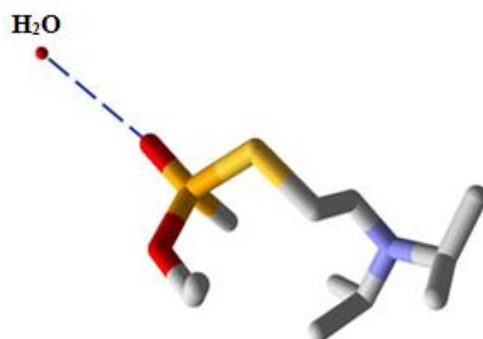


FIGURE 9 H-bond of VX- S_p in active site of the V346W mutant after docking.

With the docking results it is possible to suggest that the HuPON1 mutation processes can contribute to the design of enzymes with increased catalytic activities.

3.3 QM/MM calculations

More recently, the hybrid quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM-MD) approach has emerged as a powerful tool for studying electronic properties in the condensed phase (Borman, 2004). In this approach, electronic structure calculations are carried out during the simulation, energy and its derivatives for the quantum system are also obtained. As many configurations are generated in a sufficiently large MD, the number of QM calculations required in a hybrid QM/MM procedure is too high, since in every step, an energy evaluation of the system is needed. As a result, great computational effort is necessary to carry out this kind of simulation. Aiming to reduce the number of QM calculations, we have worked with a sequential docking (MM)/QM

approach (Goncalves *et al.*, 2014). Our method first applies the MM approach, which is from the docking calculations, to the entire system. Then, a part of the system is cut-out and submitted to the QM approach. The difference occurs in the fact that the QM and MM calculations are done in a sequential way. The following table shows the QM calculation results carried out at the DFT level with Gaussian 09 program (Frisch, 1998) for each mechanism, taking into account the R_p and S_p enantiomers for the VX nerve agent. The results are shown in Table 2.

TABLE 2 Relative activation energies ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for VX- R_p and VX- S_p in the wild-type and mutant HuPON1 active site.

Enzyme	VX	Mechanism 1	Mechanism 2	Mechanism 3
		$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)
Wild-type	R_p	1.51	0	2.06
	S_p	0	30.57	134.72
H115Y	R_p	0	17.08	24.88
	S_p	0	0.63	26.96
V346W	R_p	0	0.94	0.27
	S_p	0	16.90	14.88

The mechanistic studies in both enzyme active sites have brought interesting results, contributing to the understanding of the reaction pathways in which the hydrolysis of OP takes place by the wild-type HuPON1 and its mutants.

By observing Table 2, the hydrolysis of VX- R_p through the wild-type HuPON1 takes place preferentially by Mechanism 2, followed by Mechanisms 1 and 3, respectively. This is an important finding, given that the conformation

adopted by VX- R_p in the wild-type enzyme allowed an easy approximation of the Asp269 amino acid residue for the subsequent attack to the phosphorus center (Lenz *et al.*, 2007b). This same situation does not happen to VX- S_p , given that the hydrolysis reaction took place preferentially by Mechanism **1**, in which there is the activation of a water molecule by coordination with one Ca^{2+} ion and removal of a hydrogen atom by the Asp269 amino acid residue, with the subsequent attack of the hydroxyl ion on the central phosphorus (Dumas *et al.*, 1989; Lenz *et al.*, 2007b; Aubert *et al.*, 2004). By changing the VX conformation in the hydrolysis reaction through the wild-type HuPON1, there is a modification of the main reaction pathway for the process. This fact is due to the availability and localization of the metal ions and amino acid residues in the active site, but also it is related to the stereochemistry adopted by VX in the active site, favoring one mechanism over another. The VX- S_p reveals a very high activation energy value for the reaction *via* Mechanism **3**, 134.72 kcal mol⁻¹, which leads us to believe that this reaction pathway is not likely to happen in this situation. Thus, the following descending activation energy order for VX- S_p degradation is as follows: Mechanism **1** > Mechanism **2** > Mechanism **3**. Due to the very close activation energy values, the cleavage of VX- R_p might take place *via* both mechanisms.

In turn, through mutant H115Y, VX- R_p is hydrolyzed preferentially by Mechanism **1**. The VX- R_p presents some selectivity among the three possible routes. Its descending activation energy order is as follows: Mechanism **1** > Mechanism **2** > Mechanism **3**. The energy difference between Mechanisms **1** and **3** is 24.88 kcal mol⁻¹. On the other hand, VX- S_p has shown a slight tendency to follow Mechanism **1**, but the energy difference between Mechanisms **1** and **2** is too small, 0.63 kcal mol⁻¹. Therefore, there is no selectivity and the cleavage of VX- S_p might follow both Mechanisms **1** and **2**. The exception is in Mechanism **3**, where there was a higher energy cost, 26.96 kcal mol⁻¹, for the

reaction process. So, this reaction pathway is less adequate for the hydrolysis reaction. The descending activation energy order for VX- S_p is similar to VX- R_p , in the mutant H115Y (see Table 2).

For the last mutant enzyme studied here, V346W, VX- R_p has shown no selectivity among the different routes, because the difference among the three possible mechanisms is smaller than 1 kcal mol⁻¹. Since the energy values are so close, VX- R_p might follow any one of the three possible reaction mechanisms, with a slight preference for Mechanism 1. The VX- S_p presented some selectivity for Mechanism 1. Herein, VX- R_p reveals the following descending activation energy order: Mechanism 1 > Mechanism 3 > Mechanism 2. The energy difference between Mechanisms 2 and 3 was just 2.2 kcal mol⁻¹. Regarding the current theoretical findings, for the reaction mechanism *via* wild-type, H115Y and V346W, it is possible to notice a significant tendency for the OP hydrolysis reaction pathway to take place *via* Mechanism 1, but also being able to take place through the other routes. This happens generally when the activation energy values related to these routes are too close, with no selectivity among the reaction mechanisms (Table 2).

After concluding the mechanistic studies in the active site, the main and lowest activation energy values for each enzyme (VX- R_p and VX- S_p) were taken to be related to the catalytic efficiency values described by Peterson et al. (Peterson *et al.*, 2011). These theoretical and experimental results are shown in Table 3.

TABLE 3 Relative values taken from the most favorable reaction pathway for VX in the R_p and S_p conformations in the wild-type and mutant HuPON1 active site.

Enzyme	VX	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)	K_{cat}/K_M (min ⁻¹ mM ⁻¹)*
Wild-type	R_p	16.02	59.8 +/- 11.1
	S_p	0	
H115Y	R_p	20.92	15.0 +/- 5.2
	S_p	18.47	
V346W	R_p	18.19	18.3 +/- 0.1
	S_p	4.35	

*Values of catalytic efficiency from Peterson et al. (Peterson *et al.*, 2011).

By observing Table 3, it is easy to notice that our results corroborate with the experimental K_{cat}/K_M values (catalytic efficiency) (Peterson *et al.*, 2011). The VX- R_p has shown the lowest activation energy value for the wild-type HuPON1, which is according to the catalytic efficiency value. The VX- S_p shows the same tendency. By analyzing these experimental values, the respective order of catalytic efficiency in the degradation of VX (R_p and S_p) is as follows: wild-type HuPON1 > V346W mutant > H115Y mutant (Table 3). The wild-type enzyme has presented the highest catalytic efficiency value, 59.8 +/- 11.1 min⁻¹ mM⁻¹, which correlates very well with our theoretical results obtained in this work (Peterson *et al.*, 2011). As expected, VX- R_p and VX- S_p have shown the lowest energy barriers for the reaction process by the wild-type enzyme in the degradation of VX (R_p and S_p), with the descending activation energy order for the reaction pathway: wild-type HuPON1 > V346W mutant > H115Y mutant.

In this theoretical investigation, the influence of the stereochemistry in the hydrolysis reaction was also analyzed. For the hydrolysis by the wild-type HuPON1, there was a preference by VX- S_p , with it being degraded preferentially in relation to VX- R_p . This tendency has remained for H115Y and V346W mutants. For all enzymes, the cleavage of VX occurred preferentially by VX- S_p . This conformation must be better accommodated in the active site, providing structural conditions which allow a faster degradation process. Given these values, we have a very important result. The cleavage of OP by the wild-type and its mutants takes place preferentially for one enantiomer, in relation to the other.

Conclusions

In this theoretical study, we put in evidence three possible reaction mechanisms for the OP degradation by the wild-type HuPON1 and the enzyme with H115Y and V346W mutations. The interaction modes of both VX enantiomers were analyzed by MM techniques followed by QM calculations, bringing about important data which led us to realize the good activity of HuPON1 in OP compounds.

By the analysis of the preferential reaction pathways to be followed by this enzyme in the hydrolysis reaction, Mechanism **1** shows more favorable aspects, characterized for its lower activation energy values required for the process. But for certain mechanisms, taking into account VX- R_p and VX- S_p , these values presented as being too close, not showing significant preference. In such a case, the hydrolysis reaction could follow other routes or more than one at the same time.

Another important aspect taken from this work is that the HuPON1 enzyme degrades OP in an asymmetric biocatalysis mechanism, whose hydrolysis rate and activity depend on the stereochemistry of the compounds, i.e., the wild-type HuPON1 enzyme and its mutants cleave one enantiomer preferentially in relation to the other. In this line, it is clear that HuPON1 shows to be a good candidate for the bioremediation process of the poisoning caused by OP nerve agents.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Defesa (CAPES/MD) for financial support, and the Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infrastructure and working space. This work was supported by Excellence project FIM UHK.

References

- Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, McQ Gould S, Roodveldt C, Tawfik DS (2005) The "evolvability" of promiscuous protein functions. *Nat Genet* 37:73–76
- Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW (2002) Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 290:391–396
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Aubert SD, Li YC, Raushel FM (2004) Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 43:5707–5715
- Ben-David M, Elias M, Filippi J-J, Duñach E, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS (2012) Catalytic Versatility and Backups in Enzyme Active Sites: The Case of Serum Paraoxonase 1. *J Mol Biol* 418:181–196
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235-242
- Besler BH, Merz KM, Kollman PA (1990) Atomic charges derived from semiempirical methods. *J Comput Chem* 11:431–439
- Blum M-M, Timperley CM, Williams GR, Thiermann H, Worek F (2008) Inhibitory potency against human acetylcholinesterase and enzymatic hydrolysis of Fluorogenic nerve agent mimics by human paraoxonase 1 and squid diisopropyl fluorophosphatase. *Biochemistry* 47:5216–5224

- Borman SA (2004) Much to do about enzyme mechanism. *Chem Eng News* 8:35–39
- Camps J, Pujol I, Ballester F, Joven J, Simó JM (2011) Paraoxonases as Potential Antibiofilm Agents: Their Relationship with Quorum-Sensing Signals in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1325–1331
- Cannard K (2006) The acute treatment of nerve agent exposure. *J Neurol Sci* 249:86–94
- Combet C, Jambon M, Deleage G, Geourion C (2002) Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* 18:213–4
- Da Cunha EFF, Barbosa EF, Oliveira AA, Ramalho TC (2010) Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *J Biomol Struct Dyn* 27:619–625
- Da Cunha EFF, Mancini DT; Ramalho TC (2012) Molecular modeling of the Toxoplasma gondii adenosine kinase inhibitors. *Med Chem Res* 21:590–600
- Da Cunha EFF, Martins RCA, Albuquerque MG, de Alencastro RB (2004a) LIV-3D-QSAR model for estrogen receptor ligands. *J Mol Model* 10:297–304
- Da Cunha EFF, Ramalho TC, de Alencastro RB, Maia ER (2004b) Interactions of 5-deazapteridine derivatives with Mycobacterium tuberculosis and with human dihydrofolate reductases. *J Biomol Struct Dyn* 22:119–130
- Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, Raushel FM (1989) Purification and properties of the phosphotriesterase for Pseudomonas diminuta. *J Biol Chem* 264:19659–19665

- Ecobichon DJ (2001) Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill 6:763–810
- Fairchild SZ, Peterson MW, Hamza A, Zhan CG, Cerasoli DM, Chang WE (2011) Computational characterization of how the VX nerve agent binds human serum paraoxonase 1. *J Mol Model* 17:97–109
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Salvador P, Dannenberg JJ, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K., Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES, Pople JA (1998) Gaussian, Inc., Pittsburgh PA
- Furlong CE (2008) Paraoxonases: an historical perspective. The Paraoxonases: their role in disease, development and xenobiotic metabolism. in: Proteins and cell regulation (Eds: B. Mackness, M. Mackness, M. Aviram, G. Paragh). Springer 3–32
- Gaidukov L, Tawfik DS (2007) The development of human sera tests for HDL-bound serum PON1 and its lipolactonase activity. *J Lipid Res* 48:1637–1646
- Giacoppo JO, França TCC, Kuča K, da Cunha EFF, Abagyan R, Mancini DT, Ramalho TC (2014) Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J Biomol Struct Dyn* 18:1–11

- Goncalves AS, Costa Franca TC, Caetano MS, Ramalho TC (2014) Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. *J Biomol Struct Dyn* 32:301–307
- Guex N, Peitsch MC (1997) Swiss-model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714–2723
- Guimaraes AP, Costa Franca TC, Ramalho TC, Rennó MN, da Cunha EFF, Matos KS, Mancini D, Kuča K (2011) Docking studies and effects of syn-anti isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators. *J Appl Biomed* 9:163–171
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11:412–419
- Hebre WJ, Deppmeier BJ, Klunzinger PE (1999) PC SPARTAN Pro. Wave function Inc., Irvine
- Hu X, Jiang X, Lenz DE, Cerasoli DM, Wallqvist A (2009) In silico analyses of substrate interactions with human serum paraoxonase 1. *Proteins: Struct Funct Bioinf* 75:486–498
- Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J (1996) Development and Testing of the OPLS All-Atom Force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc* **118**:11225–11236
- Khersonsky O, Tawfik DS (2006) The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 281:7649–7656

- Koren-Gluzer M, Aviram M, Meilin E, Hayek T (2011) The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates beta-cell insulin release. *Atherosclerosis* 219:510–518
- Kufareva I, Rueda M, Katritch V, Stevens RC, Abagyan R (2011) Status of GPCR Modeling and Docking as Reflected by Community-wide GPCR Dock 2010 Assessment. *Structure* 19:1108–1126
- Kuo CL, La Du BN (1998) Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases - Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos* 26:653–660
- La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Paromo S, Sorenson RC, Standiford TJ (1999) On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 119:379–388
- Lenz DE, Broomfield CA, Yeung DT, Masson P, Maxwell DM, Cerasoli DM (2007a) Nerve agent bioscavengers: Progress in development of a new mode of protection against organophosphorus exposure. In *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels* (Romano JA, Lukey B, and Salem H, Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL 8:175–202.
- Lenz DE, Yeung D, Smith JR, Sweeney RE, Lumley LA, Cerasoli DM (2007) Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology* 233:31–39
- Li R, Liu Y, Zhang J, Chen K, Li S, Jiang J (2012) An isofenphos-methyl hydrolase (Imh) capable of hydrolyzing the P-O-Z moiety of organophosphorus pesticides containing an aryl or heterocyclic group. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1553–1564
- Li WF, Furlong CE, Costa LG (1995) Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 76:219–226

- Mackness B, Mackness M (2010) Anti-Inflammatory Properties of Paraoxonase-1 in Atherosclerosis. In: Reddy, ST (ed) Paraoxonases in inflammation, infection and toxicology. Springer 660:143–151
- Matos KS, Mancini DT, da Cunha EFF, Kuca K, Franca TCC, Ramalho TC (2011) Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin. *J Braz Chem Soc* 22:1999–2004
- Muthukrishnan S, Shete VS, Sanan TT, Vyas S, Oottikkal S, Porter LM, Magliery TJ, Hadad CM (2012) Mechanistic Insights into the Hydrolysis of Organophosphorus Compounds by Paraoxonase-1: Exploring the Limits of Substrate Tolerance in a Promiscuous Enzyme. *J Phys Org Chem* 25:1247–1260
- Otto TC, Harsch CK, Yeung DT, Magliery TJ, Cerasoli DM, Lenz DE (2009) Dramatic Differences in Organophosphorus Hydrolase Activity between Human and Chimeric Recombinant Mammalian Paraoxonase-1 Enzymes. *Biochemistry* 48:10416–10422
- Patra MC, Rath SN, Pradhan SK, Maharana J, De S (2014) Molecular dynamics simulation of human serum paraoxonase 1 in DPPC bilayer reveals a critical role of transmembrane helix H1 for HDL association. *Eur Biophys J with Biophys Lett* 43:35–51
- Peterson MW, Fairchild SZ, Otto TC, Mohtashemi M, Cerasoli DM, Chang WE (2011) VX Hydrolysis by Human Serum Paraoxonase 1: A Comparison of Experimental and Computational Results. *PLoS One* 6:e20335
- Puzyn T, Mostrag A, Falandysz J, Kholod Y, Leszczynski J (2009) Predicting water solubility of congeners: Chloronaphthalenes-A case study. *J Hazard Mater* 170:1014–1022
- Ramachandran GN, Sasisekharan V (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* 23:283–437

- Ramalho TC, Caetano MS, Josa D, Luz GP, Freitas EA, da Cunha EFF (2011) Molecular modeling of Mycobacterium tuberculosis dUTpase: docking and catalytic mechanism studies *J Biomol Struct Dyn* 28:907–917
- Ramalho TC, Rocha MVJ, da Cunha EFF, Oliveira LCA, Carvalho KTG (2010) Understanding the Molecular Behavior of Organotin Compounds to Design their Effective Use as Agrochemicals: Exploration via Quantum Chemistry and Experiments. *J Biomol Struct Dyn* 28:227–238
- Rea WJ (1996) Pesticides. *J Nutr Environ Med* 6:55–124
- Rochu D, Chabriere E, Masson P (2007a) Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology* 233:47–59
- Rochu D, Chabriere E, Renault F, Elias M, Clery-Barraud C, Masson P (2007b) Stabilization of the active form(s) of human paraoxonase by human phosphate-binding protein. *Biochem Soc Trans* 35:1616–1620
- Rutkowska-Zbik D, Witko M (2006) Following nature- Theoretical studies on factors modulating catalytic activity of porphyrins. *J Mol Catal A: Chem* 258:376–380
- Saleem A, Azam SS, Zarina S (2012) Docking and molecular dynamics simulation studies on glycation-induced conformational changes of human paraoxonase 1. *Eur Biophys J WITH Biophys Lett* 41:241–248
- Sanan TT, Muthukrishnan S, Beck JM, Tao P, Hayes CJ, Otto TC, Cerasoli DM, Lenz DE, Hadad CM (2010) Computational modeling of human paraoxonase 1: preparation of protein models, binding studies, and mechanistic insights. *J Phys Org Chem* 23:357–369
- Shih DM, Gu LJ, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ (1998) Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284–287

- Silva TC, Pires M dos S, de Castro AA, da Cunha EFF, Caetano MS, Ramalho TC (2015) Molecular insight into the inhibition mechanism of plant and rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by molecular docking and DFT calculations. *Med Chem Res* 24:3958–3971
- Singh UC, Kollmanpa (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J Comput Chem* 5:129–145
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.
- Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49:3315–3321
- Van der Spoel D, van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Hess B, Feenstra KA, Lindahl E, van Drunen R, Berendsen HJC (2001) GROMACS user manual, version 3.0. Groningen: University of Groningen.
- Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM (2005) Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. *FEBS J* 272:2225–2230
- Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM (2008) Human paraoxonase I: A potential bioscavenger of organophosphorus nerve agents. In: Mackness, B and Mackness, M and Aviram, M and Paragh, G (ed) *Paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism*. pp 151–170