



FLÁVIA VILLELA SOARES

**ENZIMOLOGIA COMPUTACIONAL APLICADA À
DEGRADAÇÃO DE AGENTES NEUROTÓXICOS
ORGANOFOSFORADOS: CÁLCULOS DE INTERAÇÃO E
MECANISMO DE REAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2017**

FLÁVIA VILLELA SOARES

**ENZIMOLOGIA COMPUTACIONAL APLICADA À DEGRADAÇÃO DE AGENTES
NEUROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS: CÁLCULOS DE INTERAÇÃO 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.

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho
Orientador

**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).

Soares, Flávia Villela.

Enzimologia computacional aplicada à degradação de agentes
neurotóxicos organofosforados : cálculos de interação e mecanismo
de reação / Flávia Villela Soares. - 2017.

63 p. : il.

Orientador(a): Teodorico de Castro Ramalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. dUTPase. 2. Organofosforados neurotóxicos. 3. Degradação.
I. Ramalho, Teodorico de Castro. . II. Título.

FLÁVIA VILLELA SOARES

**ENZIMOLOGIA COMPUTACIONAL APLICADA À DEGRADAÇÃO DE AGENTES
NEUROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS: CÁLCULOS DE INTERAÇÃO E
MECANISMO DE REAÇÃO**

**COMPUTATIONAL ENZYMOLOGY APPLIED TO DEGRADATION OF
ORGANOPHOSPHORUS NEUROXOTIC AGENTS: INTERACTION 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 10 de ABRIL de 2017.

Dra. Maria Cristina Silva

UFMG

Dra. Melissa Soares Caetano

UFOP

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho
Orientador

**LAVRAS - MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser meu alicerce, onde encontro forças para renovar minha fé e acreditar novamente em minhas capacidades.

À minha mãe Gilda pelo amor, dedicação e incentivo; ao meu pai José Valter, por estar novamente presente em minha vida e ser um grande exemplo; aos meus tios e tias por acreditarem na minha capacidade, especialmente à tia Luiza e tia Raquel pelo apoio e ajuda que são fundamentais; ao Léo pela compreensão, amor e por estar sempre ao meu lado, e em especial, ao meu filho Miguel, que todos os dias me motiva ser uma pessoa melhor, a lutar pela vida e por novas conquistas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI) pela realização da pós-graduação, oportunidade de pesquisa e por todo aprendizado adquirido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Ao professor orientador Dr. Teodorico de Castro Ramalho pela orientação, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande importância para a realização do trabalho.

Aos meus amigos Alexandre e Ander por todo auxílio, paciência e parceria durante esses anos. Aos amigos do laboratório de modelagem molecular, pelos ensinamentos compartilhados e pelos bons momentos, e a todos os outros amigos que fizeram parte da minha jornada, pela amizade e companheirismo.

Agradeço a todos que, de certa forma, entenderam minhas ausências e torceram por mim.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O estudo da reatividade e síntese de compostos de fósforo teve início no século XIX, após a descoberta de algumas de suas propriedades tóxicas. Desde então, compostos organofosforados (OP), também denominados neurotóxicos ou agentes dos nervos, são utilizados como armas químicas. A toxicidade destes compostos é devido à inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pelo controle da transmissão de impulsos nervosos. A ação dos neurotóxicos como inibidores da AChE, interrompe a hidrólise da acetilcolina (ACh), e pode conduzir à uma inibição irreversível desta enzima, resultando na síndrome colinérgica. Algumas enzimas têm sido caracterizadas com potencial de degradar OP. Entretanto, até o momento não foi encontrado um agente universal para o tratamento, que seja eficaz contra todos os compostos conhecidos e seus efeitos. Em busca de ampliar as estratégias de utilização da biorremediação, propôs-se avaliar o potencial da enzima dUTPase em degradar agentes dos nervos. A enzima tornou-se uma forte candidata, por apresentar um bom potencial para degradar fosfotriésteres. Foi utilizado metodologia teórica de docking molecular, quimiometria e QM/MM a fim de avaliar o modo de interação da dUTPase com os organofosforados neurotóxicos Sarin e VX, considerando seus enantiômeros " R_p " e " S_p ". Os resultados demonstram que os dois mecanismos de degradação propostos parecem ser promissores, principalmente com relação ao agente VX, em que a enzima apresentou uma considerável estereosseletividade. Isso representa um ponto de partida para conduzir a uma melhor compreensão sobre o mecanismo de hidrólise e reatividade da enzima. Dessa forma, a dUTPase apresenta-se como uma boa opção para expandir a gama de agentes neurotóxicos que podem ser degradados.

Palavras-chave: dUTPase. Organofosforados neurotóxicos. Degradação. Docking molecular. QM/MM.

GENERAL ABSTRACT

The study of the reactivity and synthesis of phosphorus compounds began in the 19th century, after the discovery of some of their toxic properties. Since then, organophosphorus compounds (OP), also called neurotoxins or nerve agents, are used as chemical weapons. The toxicity of these compounds is due to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for controlling the nerve impulses transmission. The action of neurotoxins as AChE inhibitors interrupts the hydrolysis of ACh, and may lead to an irreversible inhibition of this enzyme, resulting in the cholinergic syndrome. Some enzymes have been characterized with the potential to degrade OP. However, to date no universal agent for treatment has been found to be effective against all known compounds and their effects. In search for expanding the strategies of bioremediation, it was proposed to evaluate the potential of dUTPase enzyme in degrading nerve agents. The enzyme has become a strong candidate because it has a good potential to degrade phosphotriesters. Theoretical methodology of molecular docking, chemometrics and QM/MM was used in order to evaluate the interaction mode of dUTPase with the neurotoxic organophosphorus Sarin and VX, considering their enantiomers " R_p " and " S_p ". The results demonstrate that the two proposed degradation mechanisms seem to be promising, especially with respect to the VX agent, in which the enzyme showed considerable stereoselectivity. This stands for a starting point to lead to a better understanding on the hydrolysis mechanism and reactivity of the enzyme. In this way, dUTPase is a good option to expand the range of neurotoxic agents that can be degraded.

Keywords: dUTPase. Neurotoxic organophosphates. Degradation. Molecular docking. QM / MM.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Fósforo	11
2.2	Organofosforados neurotóxicos.....	11
2.3	Enzima acetilcolinesterase: inibição e tratamento	14
2.4	Enzima Desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) humana	17
2.5	Química computacional	21
2.5.1	Modelagem molecular	21
2.5.2	Ancoramento molecular	23
2.5.3	Quimiometria	25
2.5.3.1	Análise de Componentes Principais.....	26
2.5.4	Teoria do funcional de densidade	27
2.5.5	Métodos híbridos QM/MM.....	30
	REFERÊNCIAS	33
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	42
	ARTIGO - <i>ASYMMETRIC BIODEGRADATION OF THE NERVE AGENTS SARIN AND VX BY HUMAN DUTPASE: CHEMOMETRICS, MOLECULAR DOCKING AND HYBRID QM/MM CALCULATIONS</i>	42

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As substâncias químicas são usadas como armas químicas desde a antiguidade. Porém alcançaram considerável importância, com esta finalidade, quando o exército alemão lançou gás cloro contra tropas francesas durante a Primeira Guerra Mundial (SILVA et al., 2012). Desde então o interesse na síntese de compostos que apresentassem toxicidade intensificou.

O uso de armas químicas foi impulsionado na década de 1930, com a descoberta dos compostos organofosforados (OP) por químicos alemães, quando tentavam sintetizar pesticidas mais potentes (ALVIM et al., 2014). Os organofosforados são compostos orgânicos degradáveis, que possuem toxicidade variável, podendo apresentar alta periculosidade quando empregados como agrotóxicos e agentes químicos de guerra.

Esses compostos são chamados de agentes dos nervos ou neurotóxicos por agirem no sistema nervoso central e periférico (MATOS, 2012). Os neurotóxicos são classificados como agentes do tipo G ou do tipo V, sendo os principais representantes dessa classe, Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD), Ciclosarin (GF) e VX (CHAUHAN et al., 2008). Eles são considerados o grupo mais letal dentre os compostos organofosforados (GIACOPPO et al., 2014), já que dispersam com facilidade na atmosfera e possuem potencial para matar centenas de pessoas em um único ataque (ALCANTARA; VANIN, 1992).

Quanto ao mecanismo de ação, atuam inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (DOMINGOS et al., 2003), levando a hiperestimulação do sistema nervoso, e subsequentemente, a insuficiência respiratória e morte (WYMORE et al., 2014). Devido a estes riscos (DALL'ACQUA et al., 2015) alguns processos foram propostos para a reativação da AChE, como por exemplo a administração de oximas. Porém, mostraram uma eficácia limitada, uma vez que não foi encontrado um agente para o tratamento de intoxicação por OP que seja eficaz contra todos os compostos conhecidos (PETRONILHO; VILLAR, 2014).

Algumas enzimas que apresentam potencial de degradar OP têm sido investigadas (MELZER et al., 2009). Porém, ainda há a necessidade de uma melhor compreensão acerca do mecanismo de hidrólise e reatividade para esse processo de biorremediação. Neste contexto, a desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) humana aparece como

uma interessante alternativa. Esta enzima mostrou um bom potencial para degradar fosfotriésteres, o que motivou sua possível utilização na degradação de OP neurotóxicos.

Com o intuito melhorar as estratégias de utilização de enzimas para o tratamento da intoxicação por OP, o trabalho tem como objetivo utilizar estudos teóricos de ancoramento molecular e cálculos Quanto-mecânico/ mecânica molecular (QM/MM), para investigar a degradação de OP a partir da enzima dTUPase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fósforo

Em 1669, o alquimista alemão Henning Brandt, em uma tentativa de produzir ouro descobriu o elemento químico fósforo. A partir de um resíduo obtido pela evaporação da urina, obteve um material branco que brilhava no escuro e ardia como uma chama brilhante (ASHLEY; CORDELL; MAVINIC, 2011). Essas características caracterizaram o nome do elemento, que do latim (Phosphorus) significa “portador de luz”. O fósforo é um não-metal multivalente pertencente à série química do nitrogênio (grupo 15 ou 5 A) que encontra-se na natureza combinado, formando fosfatos inorgânicos. A descoberta do fósforo foi um marco na história da química, pois além de ser o primeiro elemento descoberto desde a Idade Média, foi também o primeiro elemento descoberto que não existia na forma isolada na natureza (com exceção de meteoritos ocasionais).

O fósforo possui cerca de dez variedades alotrópicas, que podem ser classificadas em três categorias principais: branca, vermelha e preta. O fósforo preto, a forma menos reativa, tem uma estrutura lamelar, semelhante à do grafite. Para obtê-la, submete-se o fósforo branco a altas pressões. O fósforo branco, quando exposto à luz solar ou ao calor, é convertido na variedade vermelha, que é mais inerte quimicamente. Ela não fosforesce e não queima pela simples exposição ao ar. Por outro lado, o fósforo branco é extremamente tóxico. Por ser a forma mais reativa quimicamente, tem sido usado por grandes potências para a fabricação de granadas e bombas incendiárias (PEIXOTO, 2002).

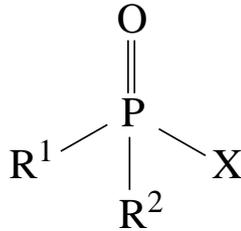
2.2 Organofosforados neurotóxicos

Compostos de fósforo foram utilizados como armas químicas pelos exércitos desde a Primeira Guerra Mundial e durante a Segunda Guerra e na Guerra do Vietnam. Estados Unidos, Israel e a Grã-Bretanha também já utilizaram munições com fósforo (HOLSTEGE; KIRK; SIDELL, 1997; TOKUDA et al., 2006; DELFINO; RIBEIRO; FIGUERO, 2009). No entanto, nas últimas décadas, a tendência é o banimento do seu uso, contra qualquer alvo, civil ou militar, em razão dos severos danos causados pela substância.

Os compostos organofosforados são ésteres derivados de ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico, que possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente, ligado em grupos funcionais diferentes (SANTOS; DONNICI, 2007;

DOMINGOS et al., 2003). Em geral, o fósforo central possui uma ligação dupla com oxigênio ou outro átomo bivalente, e suas três ligações simples podem ser diversas (SILVA; CARDEAL; CARVALHO, 1999), formando diferentes compostos.

Figura 1 – Estrutura geral de organofosforados.

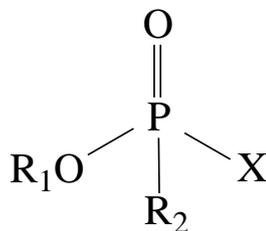


Fonte: Stoddart (1979).

Esses compostos são também empregados como inseticidas, herbicidas e reguladores do crescimento das plantas. Sendo utilizados em aplicações domésticas, bem como no combate de vetores em saúde pública e agentes terapêuticos (LI et al., 2006; JAGA; DHARMANI, 2003). Suas diferentes atividades estão relacionadas com características estruturais, tais como o tipo de heteroátomo ou grupo funcional ligado ao átomo de fósforo e seu estado de oxidação (SANTOS; DONNICI, 2007).

Por produzir seus efeitos no sistema nervoso, recebem a denominação de agentes dos nervos ou neurotóxicos (MATOS, 2012). Em geral, os neurotóxicos utilizados como armas químicas, têm a mesma estrutura básica: um átomo de fósforo central ligado a um átomo de oxigênio, a um grupo “abandonador” (X), a um radical alquila (R) e a um grupo OR (ALVIM et al., 2014), como apresentado na figura 2.

Figura 2 – Estrutura básica de neurotóxicos utilizados como armas químicas.



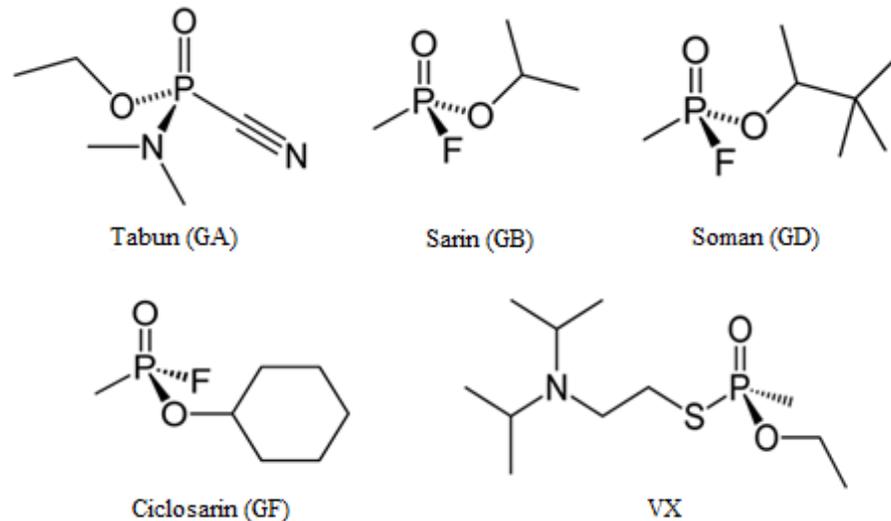
Fonte: Alvim et al. (2014).

Os mais tóxicos, desta classe, possuem um grupo alquila ligado diretamente ao fósforo, além de grupos que podem ser facilmente substituídos por cianetos, flúor e grupos

com enxofre. Essas características estruturais os fazem ser facilmente atacados nucleofilicamente por grupos hidroxilados (PETRONILHO; VILLAR, 2014).

Os primeiros neurotóxicos sintetizados, no final da década de 1930 pelo químico alemão Gerhard Schrader, foram classificados como agentes do tipo G. Os membros mais conhecidos dessa família são: Tabun (etil N, N-dimetilfosforamidocianidato), Sarin [2-(fluoro-metil-fosforil)oxipropano], Soman [2-(fluoro-metil-fosforil)oxi-3,3-dimetil-butano] e Ciclosarin [metil ciclohexafluor fosfonato] que são denominados GA, GB, GD e GF respectivamente (DOMINGOS et al., 2003; GIACOPPO et al., 2014). Posteriormente, foram desenvolvidos compostos mais tóxicos e persistentes no ambiente, classificados como agentes do tipo V. O primeiro deles, denominado VX {S-[2-(diisopropilamino) etil]-O-etil metilfosfonotioato}, foi desenvolvido na Inglaterra. A maioria desses agentes são ésteres fosfóricos que possuem estrutura similar a de compostos utilizados como inseticidas e pesticidas (YANG; SZAFRANIEC; BEAUDRY, 1993; SILVA; BORGES; VILLAR, 2012).

Figura 3 – Estruturas dos principais agentes neurotóxicos.



Fonte: Silva (2012).

De maneira geral, essas substâncias são armazenadas como líquidos. Dependendo de sua volatilidade podem ser descarregadas como nuvens de vapor ou aerossol. Praticamente sem cheiro e incolor, intoxicam via inalação ou penetração cutânea (ALCANTARA; VANIN, 1992; ALVIM et al., 2014).

O processo de intoxicação por neurotóxicos ocorre no sistema nervoso central e periférico (MATOS, 2012), onde esses compostos atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase

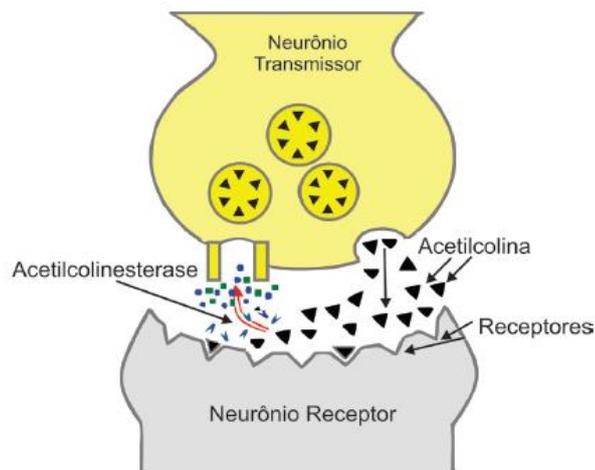
(AChE), que é fundamental para nosso sistema de controle de transmissão nervosa (PETRONILHO; VILLAR, 2014).

O mecanismo de ação desses compostos está diretamente relacionado à sua principal característica, que é a fosforilação de alguns grupos funcionais. Esse processo ocorre principalmente em proteínas, sendo o mais comum reação com serinas, o que acontece fortemente nas enzimas colinesterases, como a AChE (KIBONG et al., 2011; PETRONILHO; VILLAR, 2014).

2.3 Enzima acetilcolinesterase: inibição e tratamento

A enzima acetilcolinesterase (AChE) pertence a família das colinesterases, (RANG; DALE; RITTER, 2001) e possui um importante papel no sistema de transmissão de impulsos nervosos. Ela compõe uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e tem uma alta afinidade por ésteres de colina (ALVIM et al., 2014), como a acetilcolina (ACh). A ACh é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011). Ela atua no controle de atividade de áreas cerebrais envolvidas nas ações de atenção, aprendizagem e memória. Quando esse neurotransmissor é emitido por um neurônio na fenda sináptica, ele vai interagir com os receptores do próximo neurônio, transmitindo o impulso nervoso (PETRONILHO; VILLAR, 2014), como demonstra a figura 4.

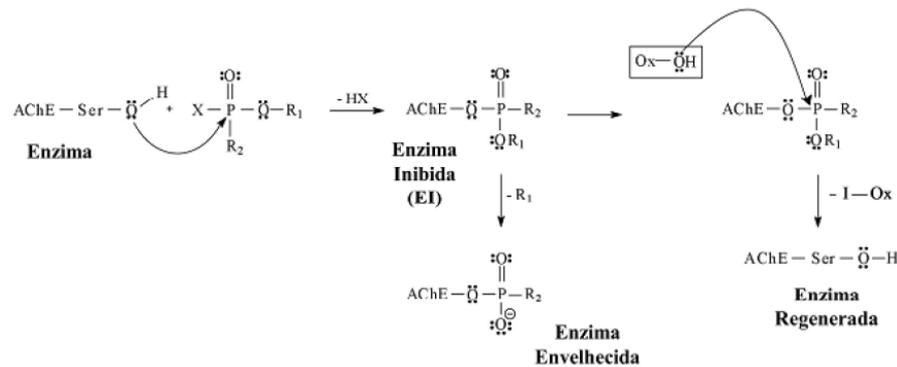
Figura 4 – Esquema do processo de transmissão de impulsos nervosos.



Fonte: Petronilho (2011).

realizada antes que aconteça o envelhecimento (PETRONILHO; VILLAR, 2014), pois com a enzima envelhecida a chance de reativação por uma oxima é mínima (WOREK et al., 2008). A figura 6 demonstra os processos acima mencionados.

Figura 6 – Processo de inibição, envelhecimento e reativação da enzima AChE, onde Ox representa uma oxima e X o grupo abandonador.



Fonte: Petronilho (2014).

Considerando que uma oxima possa ser eficiente contra um agente neurotóxico e inútil contra outro, o processo proposto ainda é considerado limitado (MATOS, 2012). Outros métodos de tratamento, como hidrólise alcalina, incineração e deposição em aterros sanitários, já foram relatados para a desintoxicação de OP, entretanto exigem condições severas e contenção rigorosa (GOTTHARD et. al., 2013; KIM et. al., 2014). Enzimas de degradação apresentam-se como candidatas para o processo de desintoxicação de agentes dos nervos, diante de sua diversidade e taxa de hidrólise rápida, quando comparada a métodos químicos tradicionais (GOTTHARD et. al., 2013; IYER; IKEN; DAMANIA, 2013; RAO et. al., 2014). Em geral, as áreas de pesquisa conduzidas nesses estudos compreendem catálise enzimática, estabilidade proteica, estereosseletividade e preferência de substrato (IYER; IKEN, 2015).

A hidrólise de compostos OP por enzimas proporciona uma técnica de descontaminação promissora, uma vez que reduz consideravelmente a sua toxicidade (FALAHATI-POUR et al., 2015). Algumas enzimas de degradação de OP, especificamente a fosfotriesterase (PTE), paraoxonase (PON1), diisopropil fluorofosfatase (DFPase) e butirilcolinesterase (BuChE), têm mostrado ser eficientes na desintoxicação de vários OP (RAMALHO et al., 2016). Embora a utilização destes "catalisadores verdes" para fins de biorremediação tenha aumentado devido à descoberta de algumas enzimas, a falta de conhecimento de seus mecanismos de ação ainda tem limitado o desenvolvimento desta tecnologia (RAMALHO et al., 2016).

Entretanto, considerando que as investigações acerca dos mecanismos pelos quais a catálise enzimática ocorre ao nível atômico, continuarão a revelar muito mais e contribuir para o desenvolvimento de formas mais eficientes de desintoxicação de OPs (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2010; RAMALHO et al., 2016), ineditamente propôs-se avaliar o potencial da enzima desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) humana, em degradar agentes dos nervos. A proposta de avaliar uma enzima que ainda não foi estudada, com esta finalidade, aponta um caminho alternativo em busca de ampliar as estratégias de utilização da biorremediação, e/ou servir como ponto de partida para a reengenharia de enzimas conhecidas.

2.4 Enzima desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) humana

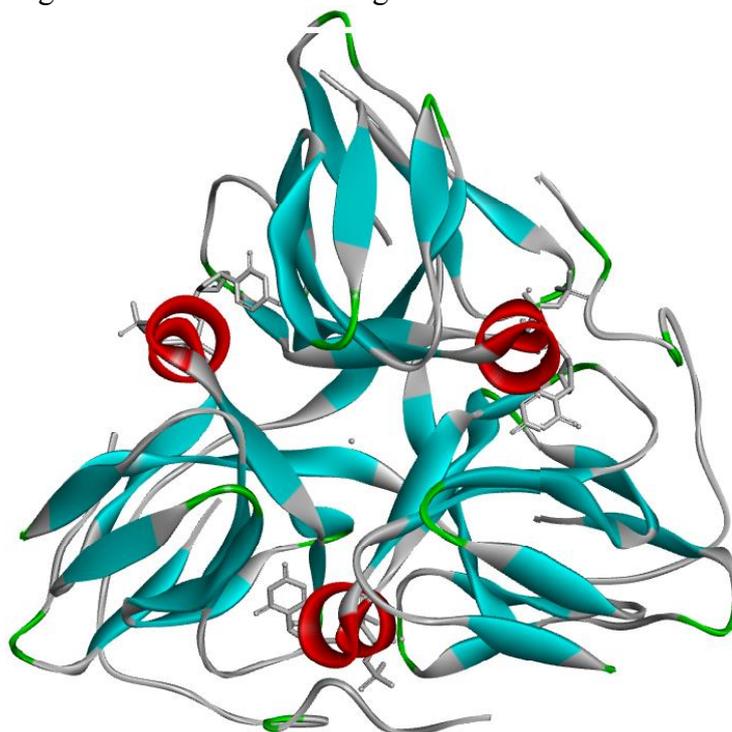
A desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase, conhecida como dUTPase, é uma enzima que pertence à família das hidrolases, especificamente as que atuam sobre anidridos ácidos e anidridos contendo fósforo. Esta enzima humana desempenha um papel fundamental na prevenção da incorporação de uracila ao DNA, por catalisar a clivagem de dUTP (desoxiuridina trifosfato) em dUMP (desoxiuridina monofosfato) e pirofosfato (SHLOMAI; KORNBERG, 1978). Esta reação controla estritamente as relações celulares dUTP (desoxiuridina trifosfato)/dTTP (desoxitimidina trifosfato) (PEARL; SAVVA, 1996).

Existem duas maneiras de a uracila aparecer no DNA: desaminação da citosina, que ocorre espontaneamente a uma baixa taxa, e a troca da timidina por uridina (ACOSTA, 2007), que são nucleosídeos formados a partir da ligação entre uma timina e um anel de desoxirribose, e uma uracila e um anel de ribose, respectivamente (SOARES; SOUZA; FERREIRA, 2001). Neste contexto, vale recordar que uma das maiores diferenças químicas entre DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico) constitui na presença da base nitrogenada timina no DNA e uracila no RNA, embora ambas realizem ligação de hidrogênio similar com a adenina (VÉRTESSY; TÓTH, 2009). O fato de algumas DNA polimerases não conseguirem diferenciar timina de uracila (VÉRTESSY; TÓTH, 2009) faz com que elas sejam capazes de incorporar tanto nucleotídeos de uma como de outra base, dependendo apenas da relação de disponibilidade entre dUTP (desoxiuridina trifosfato) e dTTP (desoxitimidina trifosfato). Desta forma, na célula é necessário que a relação entre os dois nucleotídeos seja suficiente para que o substrato majoritário na construção do DNA seja o dTTP (desoxitimidina trifosfato) (ACOSTA, 2007).

Embora a enzima DNA glicosilase possa reparar o dano causado pela incorporação de uridina (FIGUEIRÊDO, 2013) e excisar a base uracila do DNA, muitos reparos podem desestabilizar a fita de DNA ocasionando a sua quebra que é fatal para a célula (WHITTINGHAM et al., 2005). Esses fatores suportados por alguns estudos relacionados (NASCIMENTO, 2015; RAMALHO et. al., 2011; PUGACHEVA et. al., 2002; LADNER et. al. 2000) à atividade da enzima, caracterizam a dUTPase como um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos para muitas doenças como câncer e doenças infecciosas (NASCIMENTO, 2015).

Ainda que a investigação acerca da atividade da dUTPase seja direcionada à pesquisa biomédica, uma nova história pode ser descrita para a enzima. Baseando-se em estudos que apontam que a enzima apresenta um bom potencial para degradar fosfotriésteres (RAMALHO et. al., 2011), apostou-se na investigação da dUTPase humana (Figura 7) em degradar OP neurotóxicos.

Figura 7 – Estrutura cristalográfica da dUTPase humana.



Fonte: Do autor.

O crescente uso indevido de compostos OP como agentes de guerra química, juntamente com o grande número de intoxicações e os impactos ambientais causados pela quantidade de pesticidas em uso na agricultura, contribuem para a necessidade do surgimento de formas mais eficazes de desintoxicação destes agentes (RAMALHO et al., 2016). O fato de

a catálise enzimática ser uma alternativa promissora (KIM et al., 2014), aliada aos métodos de química computacional, que fornecem maneiras eficientes de investigar a atividade das enzimas, com dados detalhados e perspectivas sobre os processos centrais na catálise biológica (LONSDALE RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010), reforçou a hipótese de que explorar a atividade catalítica da dUTPase, quanto à degradação de OP, pode servir como ponto de partida a fim de contribuir para importantes avanços na engenharia de enzimas.

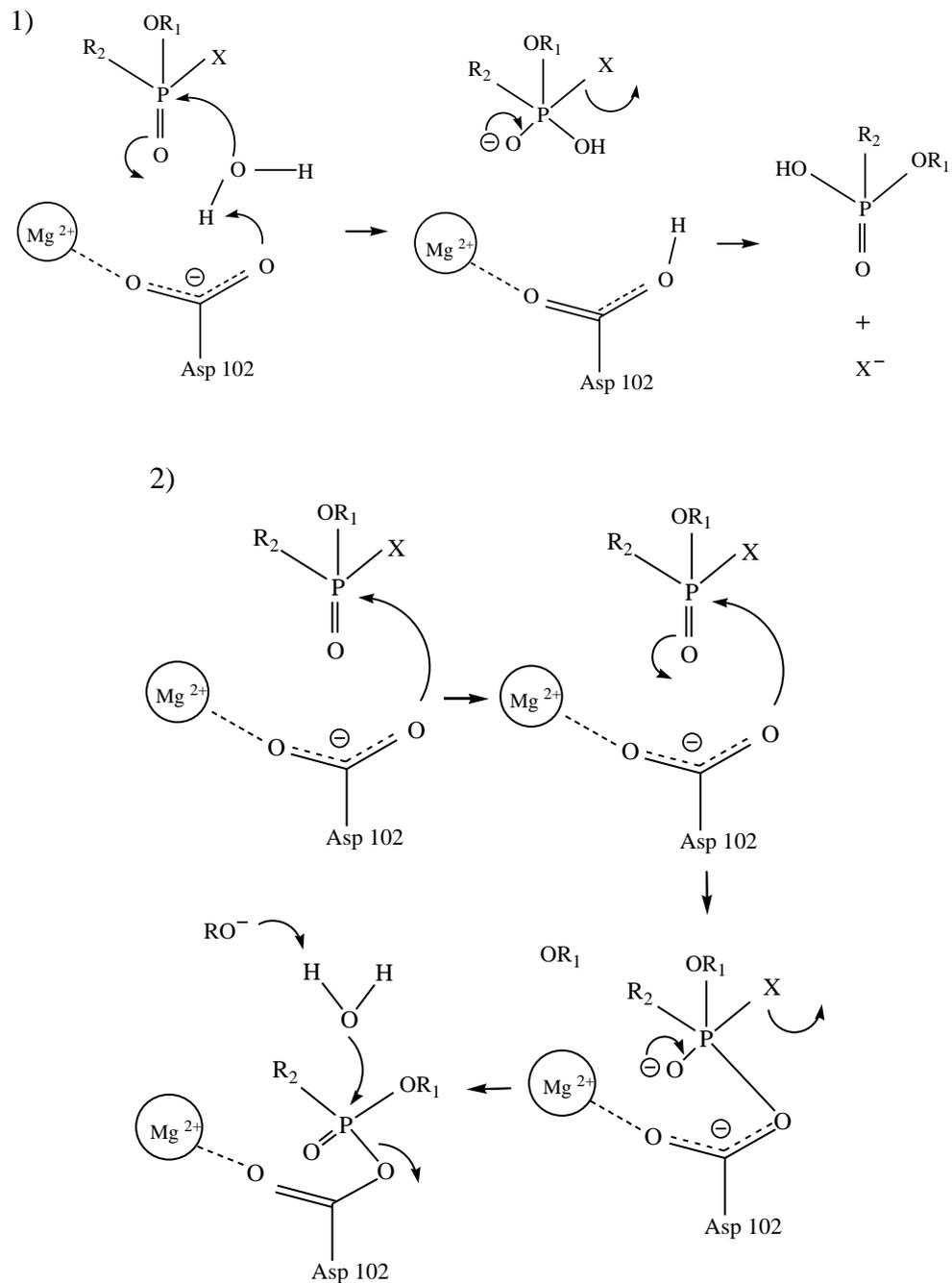
As estruturas cristalinas de alta resolução da dUTPase humana (hDUT) (MOL et al., 1996; VARGA et al., 2007) e outras (LARSSON SVENSSON; NYMAN, 1996; PRASAD et al., 2000; BARABAS et al., 2004; NEMETH-PONGRACZ et al., 2007; DAUTER et al., 1999) forneceram importantes pistas mecanicistas. O sítio catalítico é formado por cinco sequências de aminoácidos conservados. Estas sequências formam o sítio de reconhecimento do substrato e o centro de reação, conferindo elevada seletividade para dUTP em relação a dCTP, dTTP e UTP (Uridina-5'- trifosfato). Esta seletividade é adquirida através de padrões de ligação de hidrogênio que favorecem a ligação da base uracila, e a íntima interação com o açúcar e a base, que exclui o 2'-hidróxil do açúcar ribose e o 5-metil grupo da timina (WHITTINGHAM et al., 2005). As sequências de aminoácidos ainda tem a função de coordenar o íon metal Mg(II) e a cadeia fosfato do nucleotídeo, assim como criar um microambiente bastante isolado. O íon magnésio e uma molécula de nucleotídeo interagem com as três subunidades (VARGA et al., 2008).

O conhecimento atual do mecanismo de ação da atividade da dUTPase é baseado principalmente em abordagens estruturais tridimensionais. Especula-se que se inicia com a clivagem da ligação de α - β pirofosfato, por um ataque nucleofílico da molécula de água catalítica coordenada por um aspartato (Asp 102 na enzima humana), na sequência de aminoácidos que acomoda as porções de uracila e desoxirribose de dUTP (BARABAS et al., 2004). O íon Mg^{2+} realiza a coordenação tripla dos fosfatos contribuindo para uma cadeia de fosfato de conformação cada vez mais compacta, ótima para a catálise.

No presente trabalho, propusemos investigar dois mecanismos de reação para a enzima dUTPase humana na degradação enzimática de agentes dos nervos organofosforados (Figura 8). A primeira reação consiste na ativação de uma molécula de água devido à coordenação direta com o íon Mg^{2+} catalítico e remoção de um átomo de hidrogênio da água pelo resíduo de aminoácido Asp102, levando à formação de um íon hidroxila. Esta água ativada ataca o OP, no centro fosfórico, com a expulsão do grupo de saída (AUBERT; LI; RAUSHEL, 2004; DUMAS et al., 1989; LENZ et al., 2007). Para a segunda reação possível, nenhuma molécula de água está envolvida. Neste caso, haverá um ataque ao centro de fósforo diretamente pelo

resíduo de aminoácido Asp102, igualmente promovendo a expulsão do grupo de saída e clivagem do composto (LENZ et al., 2007). Também propusemos que o mecanismo de degradação de OP pela dUTPase humana seja uma biocatálise assimétrica e, portanto, esta enzima deve clivar um enantiômero com uma taxa de eficiência maior, em relação à outro.

Figura 8 – Mecanismos propostos para degradação de OP pela dUTPase 1) Através de uma molécula de água ativada pelo Asp102 2) Por ataque nucleofílico direto do Asp102.



Fonte: Do autor.

Os métodos e técnicas empregados no campo da química computacional podem ser utilizados para compreender a base física do aumento da taxa de reações químicas por enzimas que degradam OP. A aplicação de métodos computacionais aprimora significativamente o trabalho experimental na elucidação dos mecanismos de catálise enzimática, reduzindo acentuadamente o tempo e os custos de pesquisa (NEMUKHIN et al., 2012). Neste contexto, podem ser empregues várias abordagens teóricas para investigar as interações moleculares entre pequenas moléculas e enzimas (RAMALHO et. al., 2016).

2.5 Química computacional

O avanço tecnológico dos últimos anos tem impulsionado o desenvolvimento do conhecimento. Com isso, a inserção de novas metodologias e ferramentas computacionais vem proporcionando um grande progresso em diversas áreas. Neste contexto, a aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos favorece as áreas onde a química desempenha um importante papel, seja ele direto ou indireto (MATOS, 2012).

O progresso no desenvolvimento de softwares e hardwares aliado a uma redução de custo de materiais informáticos, torna a química computacional uma das áreas mais promissoras deste século. Uma de suas vantagens, quando comparada a métodos experimentais, é o baixo custo, visto que evitam gastos com reagentes e materiais, além de repetição de análises e reações. Sua versatilidade permite aplicações em uma extensa área de pesquisa, já que é uma ferramenta que realiza simulações a fim de otimizar e compreender processos, reações e interações intra e intermoleculares (RAUPP; SERRANO; MARTINS, 2008). Alguns dos mais importantes avanços da química computacional estão relacionados à descoberta de novos fármacos (LENGAUER, 2002) a partir da utilização das metodologias de análises de modelagem e ancoramento molecular (BAREIRO, 2013).

2.5.1 Modelagem molecular

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 através da geração, manipulação e/ou representação realista dessas estruturas (SILVA, 2006). 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 (COHEN, et al. 1988; COHEN et al., 1990). Estas ferramentas podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos compostos de forma direta e indireta (COHEN et al., 1990). Indiretamente, quando não se dispõe da estrutura do receptor, na tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos que elucidem as relações estrutura-atividade biológica. Diretamente, quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico, na tentativa de compreender as interações do complexo ligante-receptor. Ambos os modos tentam otimizar o encaixe da molécula com o receptor (SILVA, 2006).

O fato dos sítios ativos de enzimas e certos sítios receptores serem estereosseletivos e estéreo-específicos justifica o estudo das conformações de moléculas que podem interagir com estes sítios. A interação de uma molécula com o receptor leva a uma mudança conformacional. Logo, um sítio receptor pode ligar-se a apenas uma das várias conformações de uma molécula flexível. Aquela que apresentar uma conformação capaz de se ligar ao receptor, pode desencadear alguma atividade promovendo ou não uma resposta biológica (SILVA, 2006).

Neste contexto, é importante ressaltar que as moléculas desenhadas tridimensionalmente, não necessariamente estão na conformação mais estável. Durante a formação de uma estrutura podem ocorrer distorções na molécula, que envolvem a formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações. Repulsão estérica e eletrostática também podem ser provocadas por interação entre átomos não ligados. Portanto, a minimização de energia e a análise conformacional são utilizadas interativamente, para otimizar a geometria de moléculas e corrigir possíveis distorções (CARVALHO, 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

A escolha do método de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, disponibilidade de parâmetros, dados armazenados e recursos computacionais (CARVALHO, 2003). Diversas são as opções quanto ao método de cálculo a ser aplicado em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos podem ser clássicos ou quânticos (COHEN et al., 1990). A aplicação de um ou outro é determinada pelo compromisso entre tempo e precisão dos resultados e pela complexidade do sistema a ser analisado (COHEN et al., 1990).

2.5.2 Ancoramento molecular

A mecânica molecular (MM) é um importante representante dos métodos clássicos teóricos (COELHO et al., 1999). O processo envolvido nesse método 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 MM é prever a energia associada com determinada conformação de uma molécula (CARVALHO, 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

A simulação computacional do ancoramento molecular (*docking*) é uma das mais importantes técnicas da mecânica molecular, que investiga as interações moleculares entre uma proteína e um ligante (SILVEIRA, 2003). Este tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula sua estabilidade relativa (MIZUTANI et al., 1994).

A técnica de ancoramento molecular ganhou eficiência com estudos realizados por LEACH e ZNOJIL (1992), ao propor que o método consiste em primeiro 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 através da soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas, desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula.

Desta forma, o método utiliza a energia envolvida no processo para identificar a conformação do ligante energeticamente mais favorável quando ligado ao alvo. Geralmente, valores mais baixos de energia representam melhor as interações entre proteína e ligante, quando comparados com valores mais elevados (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

As interações entre ligante e receptor requer complexos estudos. Ligantes precisam mudar sua conformação à medida que se encaixam no sítio ativo da proteína. Podem também ocorrer mudanças conformacionais no receptor, que são induzidas pelo ligante de tal modo que se torne possível à ativação ou inibição de uma determinada proteína (GONÇALVES, 2008).

Os valores da função de desempenho do ancoramento, E_{score} são definidos pela equação 1:

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

Em que,

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

E_{inter} corresponde à energia de interação ligante-proteína. O termo E_{PLP} é um potencial “piecewise linear” 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 fixa as unidades de energia eletrostática em kcal mol^{-1} (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

E_{intra} é a energia interna do ligante, como descrito na equação 3.

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

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 torção da energia, onde θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada 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. Em resumo, estas funções são usadas para sobrepor automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde semi-rígida (proteína) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Tendo em vista que uma grande quantidade de dados é obtida e que muitas vezes apenas algumas variáveis são realmente relevantes, recursos que auxiliem a interpretação desses dados são fundamentais. Neste caso, a quimiometria tem se mostrado de grande importância para a compreensão e análise de dados.

2.5.3 Quimiometria

Atualmente a química se mostra imprescindível, uma vez que apresenta aplicações úteis em diversos campos do conhecimento. Entretanto, por vezes, é considerada complexa. Dentre os motivos, a extração de grandes quantidades de dados envolvendo um considerável número de variáveis, se destaca (LOPES et al., 2010). A necessidade de ferramentas mais sofisticadas para tratar esses dados e extrair informações relevantes, cresceu muito rapidamente, dando origem à quimiometria, que é destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA et al., 1999).

Essa ciência teve início na primeira metade da década de 70 (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006), e atualmente é estabelecida e de uso disseminado (FERREIRA et al., 1999). É uma das áreas mais recentes da química, que tem se mostrado fundamental para a interpretação e análise de dados obtidos pelos diversos métodos instrumentais disponíveis em laboratório. Seu reconhecimento ganhou ênfase com a inserção de recursos computacionais aos laboratórios químicos (LOPES et al., 2010).

A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Iniciada apenas como um método de classificação, hoje se divide em três áreas fundamentais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (POPPI; PASQUINI, 1993). Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas (HOUGHTON; KALIVAS, 2000). No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras que são similares entre si, visando determinar tendências nos dados. Por fim, a calibração multivariada permite estimar a concentração de uma determinada espécie, relacionando um conjunto de padrões com as variáveis físico-químicas de interesse (FERREIRA et al., 1999; RENCHER, 2002).

Os métodos multivariados são os mais adequados para a análise de dados, pois permitem um estudo com várias espécies ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação nos dados. O software MATLAB oferece um ambiente computacional amigável e de alto nível, especialmente na área de álgebra linear, que tem sido usado amplamente e com muito sucesso em quimiometria (MARTENS; NAES, 1989).

Os métodos de análise exploratória são utilizados para extrair informação e detectar tendências nos dados, baseados nas medidas multivariadas das amostras. Desta forma, é possível realizar uma interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Alguns destes métodos compreendem Análise de Discriminantes Lineares (LDA, do inglês Linear Discriminant Analysis), Análise de Discriminantes Mínimos Quadrados Parciais (PLSDA, do inglês Partial Least Square Discriminant Analysis), Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês Principal Component Analysis) e Análise Hierárquica de Cluster (HCA, do inglês Hierarchical Cluster Analysis) (BRERETON, 2007).

2.5.3.1 Análise de Componentes Principais

No contexto de sistemas multivariados de dados, a Análise das Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta utilizada para reduzir o conjunto de dados, mantendo o máximo de informações originais (EVERITT; DUNN, 1991; JOLLIFFE, 2002). O princípio da técnica é condensar os dados sem a perda das informações mais relevantes, de modo a se obter um número menor de variáveis, facilitando assim a interpretação desses dados (LOPES et al., 2010). A análise exploratória através da PCA é largamente empregada em quimiometria (MOITA; MOITA, 1998; SOUSA et al., 2006A; SILVA et al., 2005) tendo cada vez mais novos usuários do meio acadêmico (alunos de graduação, pós-graduação e pesquisadores) e da indústria interessados na sua utilização (SOUZA; POPPI, 2012).

Pode-se dizer que o método é baseado na transformação das variáveis originais de uma matriz de dados, em novas variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC, do inglês Principal Components), que são combinações lineares das variáveis originais. Quando o número de PC é significativamente menor que o número de variáveis iniciais obtém-se uma redução substancial de informação, proporcionando uma melhor visualização do conjunto de dados. Sendo assim, este método pode ser utilizado tanto para a redução de informações, como também para reconhecimento de padrões, seleção de amostras, construção de modelos para calibração multivariada, entre outras aplicações (LOPES et al., 2010).

A maneira mais comum de se representar graficamente o resultado da decomposição em PCA é plotar, entre si em um gráfico, os escores e pesos das componentes principais escolhidas, na maioria das vezes criando um gráfico bi ou tridimensional que permite observar com uma maior clareza a disposição das amostras e a participação das variáveis

naquele padrão observado, além da identificação dos possíveis agrupamentos presentes nos dados (BRETON, 2003; SOUSA et al., 2006B).

Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, mesmo que a informação estatística presente nas n variáveis originais seja a mesma dos n componentes principais, sendo comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 80% desta informação. O gráfico da componente principal 1 versus a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço n dimensional. A análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso (loadings) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico (WANG et al., 2009). Portanto, a tarefa do químico que trabalha com estatística multivariada, consiste em interpretar a distribuição dos pontos no gráfico de PC e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das PC mais importantes (LIMA et al, 2008).

Considerando que esta metodologia foi aplicada a resultados obtidos a partir do ancoramento molecular, e que a química teórica abrange também outros métodos de cálculos, a realização de análises adicionais podem tornar os resultados mais conclusivos. Neste contexto, quando um tratamento mais refinado é requerido, a geometria otimizada pela MM pode ser usada como ponto de partida para cálculos quânticos (SILVA, 2006).

2.5.4 Teoria do funcional de densidade

A mecânica quântica (QM) tornou-se a base teórica de vários campos da Química, em especial da química computacional. Os alicerces da QM foram estabelecidos durante a primeira metade do século XX por Albert Einstein, Werner Heisenberg, Max Planck, Louis de Broglie, Niels Bohr, Erwin Schrödinger, Max Born, John von Neumann, Paul Dirac, Wolfgang Pauli, Richard Feynman e outros. No entanto, alguns aspectos fundamentais da contribuição desses autores ainda são alvo de investigação. Em geral, a mecânica quântica é utilizada para compreender o comportamento de sistemas em escala atômica ou molecular. Ao contrário da MM, os métodos QM fornecem dados sobre a estrutura eletrônica, além de permitirem maior precisão nos resultados, o que implica em um custo computacional (tempo de computação e capacidade de memória necessária) maior (CLARK, 1985; HIRST, 1990).

Um método para se obter os resultados de QM é o da teoria do funcional de densidade (Density Functional Theory, DFT), formulada a partir dos trabalhos de Kohn, Hohenberg e Sham (HOHENBERG, 1964; KOHN; SHAM, 1965). A teoria se tornou popular a partir de meados da década de 80 (MORGON, 1995). Segundo 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 (1964) 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 (1965), na década de 60, quando eles propuseram que a energia puramente eletrônica de uma molécula com muitos elétrons no estado fundamental seria (EQUAÇÃO 4):

$$E_0 = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \Psi_i(1) | \nabla_1^2 | \Psi_i(1) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha\rho}(1)}{r_{1\alpha}} dv_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{xc}[\rho] \quad (4)$$

Em que $\Psi_i(1)$, $i=1, 2, \dots, n$ 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 5)

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Psi_i|^2 \quad (5)$$

O terceiro teorema de Hohenberg-Kohn diz que $E_0[\rho] \leq E_0[\rho']$, em que ρ é a densidade exata e ρ' a densidade aproximada pela expansão (EQUAÇÃO 5) para “n” finito. Esse teorema é equivalente ao teorema variacional de Hartree-Fock.

Os orbitais Kohn-Sham podem ser determinados pela expressão (EQUAÇÃO 6):

$$\hat{F}_{KS}(1)\Psi_i(1) = \varepsilon_{i,KS}\Psi_i(1) \quad (6)$$

Onde \hat{F}_{KS} é o operador de Kohn-Sham apresentado pela Equação 7:

$$\hat{F}_{KS} \equiv -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \sum_{j=1}^n \hat{J}_j(1) + V_{xc}(1) \quad (7)$$

Em que 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 8):

$$\frac{\partial E_0}{\partial \tilde{\rho}} = 0, \quad (8)$$

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 9):

$$E_x = (1 - \alpha_0)E_x^{LSDA} + \alpha_0 E_x^{HF} + a_x \Delta E_x^{B88} \quad (9)$$

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.

Sabe-se que, embora a química teórica, basicamente compreendida em clássica e quântica, possa tratar especificamente diversos sistemas, ainda apresenta falhas. Neste contexto, um novo cenário surgiu com o aparecimento de uma estratégia de cálculos, fruto da combinação entre métodos de mecânica quântica (estrutura eletrônica) e mecânica molecular, conhecida por: *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* - QM/MM, ou métodos híbridos. Diante disso, é possível descrever partes do sistema por um ou outro método, onde as vantagens de um sanam as desvantagens do outro (COELHO et al., 1999).

2.5.5 Métodos híbridos QM/MM

A química computacional ainda enfrenta muitos desafios apesar do grande avanço. Devido ao grande número de átomos em proteínas e ao fato das reações envolverem a quebra e a formação de ligações químicas, alguns métodos apresentam limitações. Neste caso, a combinação dos métodos mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM) estende a possibilidade de aplicação de cálculos computacionais a diversos sistemas (BORMAN, 2004). Essa metodologia, introduzida por WARSHEL e LEVITT (1976), assume que o sistema molecular pode ser dividido em dois subsistemas: as regiões QM e MM. A região MM contém todos os átomos que são tratados explicitamente no cálculo. Na região QM, os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície de potencial é construída dentro da aproximação de Born-Oppenheimer (SZABO; OSTLUND, 1996).

Os métodos híbridos QM/MM permitem a modelagem de sistemas maiores, combinando os graus eletrônicos de uma abordagem química quântica com os métodos de mecânica molecular, aumentando assim o desempenho e diminuindo a demanda computacional (GONCALVES et al., 2014). Nessa abordagem, uma pequena porção é selecionada para o tratamento QM, por exemplo, a um nível *ab initio*, semi-empírico, ou Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2010; VAN DER KAMP; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013). Esse tratamento 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; MULHOLLAND, 2010).

Uma característica distintiva entre os métodos QM/MM é como ocorre o acoplamento destas 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 MM (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2010). No desempenho deste tipo de cálculo, a energia QM/MM de todo o sistema, $E_{TOTAL}^{QM/MM}$, é calculada de acordo com a equação 10:

$$E_{TOTAL}^{QM/MM} = E_{TOTAL}^{MM} + E_{QM\ região}^{QM} - E_{QM\ região}^{MM} \quad (10)$$

Em que 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. Isto é importante para várias enzimas, dado o mecanismo de reação (SENTHILKUMAR et al., 2008). Métodos deste tipo estão relacionados com as interações eletrostáticas entre as regiões QM e MM no cálculo (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2010; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013; MULHOLLAND, 2007).

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 (SENN; THIEL, 2009; HEYDEN; LIN; TRUHLAR, 2007). A abordagem QM/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; MULHOLLAND, 2010; SENN, THIEL, 2009).

Anteriormente, os cálculos a nível QM eram limitados apenas à aplicação em sistemas com número relativamente pequeno de átomos, sem a influência da maior região da proteína. Isso mudou com o emprego dos métodos híbridos QM/MM. Os efeitos de grandes sistemas em uma região QM podem agora ser estimados e corroborados a investigações experimentais (MULHOLLAND, 2007; BRAUN-SAND; OLSSON; WARSHEL, 2005). WARSHEL e LEVITT (1976) aplicaram o primeiro QM/MM à lisozima, da clara de ovo, em 1976. Eles apresentaram os conceitos de QM/MM, detalhando situações essenciais, e aplicou-as a reações enzimáticas.

Posteriormente, FIELD e colaboradores (1990), descreveram em detalhes o acoplamento do campo de força CHARMM para métodos QM semi-empíricos (BROOKS et al., 1983). A precisão deste método híbrido foi avaliada e comparada com o método *ab initio* e resultados experimentais. Desde então, a aplicação de métodos QM/MM tem aumentado rapidamente. Devido ao elevado nível de aplicações, é evidente que a abordagem QM/MM

pode proporcionar conhecimento dos mecanismos envolvidos na catálise enzimática (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOLLAND, 2010). Essa abordagem 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

- ACOSTA, V. M. C. Papel de la desoxiuridina trifosfato nucleotido hidrolasa en la viabilidad celular y la integridad genetica en Trypanosoma brucei. **Tese de Doutorado**, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López- Neyra,” p. 185, 2007.
- ALCANTARA, M. R.; VANIN, J. A. Armas Químicas. **Química Nova** 1992, 15, 62.
- ALVIM, R. S.; VAISS, V. S.; LEITÃO, A. A.; BORGES Jr., I. A Química Teórica a Serviço da Defesa Química: Degradação de Agentes Neurotóxicos em Superfícies de Óxido e Hidróxido de Magnésio. **Revista Virtual de Química**. 2014, 6 (3), 687-723.
- ASHLEY, A.K; CORDELL, D.; MAVINIC, D. A brief history of phosphorus: from the philosopher’s stone to nutrient recovery and reuse. **Chemosphere**, 84: 737–746, 2011.
- AUBERT, S. D.; LI, Y. C.; RAUSHEL, F. M. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase. **Biochemistry**, v. 43 (19), p. 5707-5715, 2004.
- BAKOWIES, D.; THIEL, W. Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100 (25), p. 10580-10594, 1996.
- BARABAS, O.; PONGRACZ, V.; KOVARI, J.; WILMANN, M.; VERTESSY, B.G. (2004). Structural Insights into the Catalytic Mechanism of Phosphate Ester Hydrolysis by dUTPase. **J. Biol. Chem.** 279, 42907-42915.
- BAREIRO, S. B. Avaliação de desempenho de análises de ancoragem molecular em nuvens de computadores por meio de workflows científicos. Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica, 2013.
- BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 98, p. 5648-5652, 1993.
- BORMAN, S.A. Much to do about enzyme mechanism. **Chem. Eng. News**, 2004, 8, 35-39.
- BRAUN-SAND, S.; OLSSON, M. H. M.; WARSHEL, A. Computer Modeling of Enzyme Catalysis and Its Relationship to Concepts in Physical Organic Chemistry. In advances in physical organic chemistry, v. 40; Richard, J. P, Ed.; **Advances in Physical Organic Chemistry**, V. 40, p. 201-245, 2005.
- BRERETON, R.; Chemometrics for Pattern Recognition, John Wiley & Sons: **Chichester**, 2007.
- BRETON, R. G., Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. 2. ed., **John Wiley & Sons, Ltd.**, 2003. p. 187.

BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4 (2), p. 187-217, 1983.

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, mai/jun 2003.

CHAUHAN, S.; CHAUHAN, S.; D'CRUZ, R.; FARUQI, S.; SINGH, K. K.; VARMA, S.; SINGH, M.; KARTHIK, V. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 2008, 26, 113.

CLARK, T. *A handbook of computational chemistry: apractical guide to chemical structure and energy calculations*. **John Wiley & Sons**, Friedrich, 1985.

COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; HERRERA, J. O. M.; MACHADO, S. P. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova** 22(3), 1999.

COHEN, N. C., BLANEY, J. M., HUMBLET, C., GUND, P. & BARRY, D. C. **J. Med. Chem.** 1990, 33, 883.

COHEN, N. D., BLANEY, J. M., HOWARD, A. E. & KOLLMAN, P. A. **J. Med. Chem.** 1988, 31, 1669.

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

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.

DALL'ACQUA, E. L.; ROSSI, B. G.; COUTO, T. B. M. Diagnóstico de intoxicação por organofosforados baseado em quadro clínico. **Revista Brasileira de Medicina**. 2015, RBM Mai 11 V 68 N 5.

DAUTER, Z.; PERSSON, R.; ROSENGREN, A.M.; NYMAN, P.O.; WILSON, K.S.; CEDERGREN-ZEPPEZAUER, E.S. (1999). Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex. **J. Mol. Biol.** 285 , 655 -673.

DELFINO, R. T; RIBEIRO, T. S; FIGUERO, A.; VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009, 20, 407.

DOMINGOS, J. B; LONGHINOTTI, E; MACHADO, V. G; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, 2003, 27, 745.

DUMAS, D. P.; CALDWELL, S. R.; WILD, J. R.; RAUSHEL, F. M. Purification and properties of the phosphotriesterase for *Pseudomonas diminuta*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 19659-19665, 1989.

EVERITT, B. S.; DUNN, G.; *Applied multivariate analysis*, Edward Arnold: London, 1991.

FALAHATI-POUR, S.K.; LOTFI, A.S.; AHMADIAN, G.; BAGHIZADEH, a. Covalent immobilization of recombinant organophosphorus hydrolase on spores of *Bacillus Subtilis*. **J. Appl. Microbiol.**, 2015, 118 (4), 976-988.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22 (5), 1999.

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

FIGUEIRÊDO, F. N. S. Estudo de modelagem molecular de derivados de desoxiuridina como inibidores da duputase de *plasmodium falciparum*. **Monografia** (Graduação). UFPB/CCS - João Pessoa, 2013.

GIACOPPO, J. O. S.; LIMA, W. E. A.; KAMIL, K.; FRANÇA, T. C. C.; da CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C. Guerra Química: Perspectivas no Estudo de Reativadores da Enzima Acetilcolinesterase Inibida por Organofosforados. **Revista Virtual de Química**, 2014, 6 (3), 653-670.

GONCALVES, A. da S.; COSTA FRANCA, T. C.; CAETANO, M. S.; RAMALHO, T. C. 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**, v. 32 (2), p. 301-307, 2014.

GONÇALVES, A. S.; **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES, R.B. Desenvolvimento e validação de Novos Métodos de distribuição da população Inicial em Algoritmos Genéticos para o problema de Docking Proteína-Ligante. Laboratório Nacional de Computação Científica Programa de Pós-graduação em Modelagem Computacional, 2008.

GOTTHARD, G.; HIBLOT, J.; GONZALEZ, D.; ELIAS, M.; CHABRIERE, E. Structural and enzymatic characterization of the phosphotriesterase ophc2 from *pseudomonas pseudoalcaligenes*. **PLoS One**, 2013, 8(11), 1-10.

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**, v. 111 (9), p. 2231-2241, 2007.

HIRST, D. A. *A Computacional Approach to Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1990.

HOHENBERG, P.; KOHN, W.; *Phys. Rev.* 1964, *136*, B864.

HOLSTEGE, C. P.; KIRK, M.; SIDELL, F. R. CHEMICAL WARFARE: Nerve Agent Poisoning. *Critical Care Clinics* 1997, *13*, 923.

HOUGHTON, T. P.; KALIVAS, J. H.; *J. Chem. Educ.* 2000, *77*, 1314.

IYER, R.; IKEN, B. Protein engineering of representative hydrolytic enzymes for remediation of organophosphates. *Biochem. Eng.J.*, 2015, *94*, 134-144.

IYER, R.; IKEN, B.; DAMANIA, A. A comparison of organophosphate degradation genes and bioremediation applications. *Environ., Microbiol. Rep.*, 2013, *5*(6), 787-798.

JAGA, K.; DHARMANI, C.; Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Pública.* 2003; *14*(3):17185.

JOLLIFFE, I. T.; *Principal component analysis*, 2nd ed., Springer: New York, 2002.

KIBONG, K.; OLGA, G. T.; DAVID, A. A.; DAVID, G. C. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews* 2011, *111*, 5345–5403.

KIM, C.S.; SEO, J.H.; KANG, D.G.; CHA, H.J. Engineered whole-cell biocatalyst-based detoxification and detection of neurotoxic organophosphate compounds. *Biotechnol. Adv.*, 2014, *32*(3), 652-662.

KOHN, W.; SHAM, L. J.; *Phys. Rev.* 1965, *140*, A1133.

LADNER, R.D.; LYNCH, F.J. ; GROSHEN, S.; XIONG, Y.P. ; SHERROD, A.; CARADONNA, S.J.; STOEHLMACHER, J. ; LENZ, H.J. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer *Cancer Res.*, *60* (2000), pp. 3493–3503.

LARSSON, G.; SVENSSON, L. A.; NYMAN, P.O. (1996). Crystal structure of the *Escherichia coli* dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat. Struct. Biol.* *3* , 532-538.

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.

LENGAUER, T., (2002), *Bioinformatics-from genomes to drugs*. Weinheim, Wiley-VCH.

LENZ, D. E.; YEUNG, D.; SMITH, J. R.; SWEENEY, R. E.; LUMLEY, L. A.; CERASOLI, D. M. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology*, v. *233*(1-3), p. 31–39, 2007.

LI, J. N.; LIU, L.; FU, Y.; GUO, Q. X. What are the pKa values of organophosphorus compounds? **Elsevier**. Volume 62, Issue 18, 1 May 2006, Pages 4453–4462.

LIMA, K. M. G.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J.; de ANDRADE J. C.; **Quim. Nova** 2008, 31, 700.

LONSDALE, R.; RANAGHAN, K. E.; MULHOLLAND, A. J. Computational Enzymology. **Chemical Communications**, v. 46, p. 2354–2372, 2010.

LOPES, R. E. C.; SANTOS, I. P.; SOARES, F. L. F.; PEREIRA, E. F.; BRAGA, J. W. B. Aplicação da Análise por Componentes Principais (PCA), na identificação de marcas de canetas esferográficas - uma introdução à quimiometria. XV Encontro Nacional de Ensino de Química (XV ENEQ) – Brasília, DF – 2010.

MARTENS, H.; NAES, T. Multivariate Calibration; **Jonh Wiley & Sons**, New York, 1989.

MATOS, K. S.; Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano. **Dissertação de Mestrado**, UFLA, 2012.

MELZER, M., CHEN, J. C. H.; HEIDENREICH, A.; GAB, J.; KOLLER, M.; KEHE, K.; BLUM, M. M. Reversed Enantioselectivity of DiisopropylFluorophosphatase against Organophosphorus Nerve Agents by Rational Design. **J. Am. Chem. Soc.** 2009, 131, 17226–17232.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, v.243, n.2, p.310-326, 1994.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C.; **Quim. Nova** 1998, 21, 467.

MOL, C.D.; HARRIS, J.M.; MCINTOSH, E.M.; TAINER, J.A. (1996). Human DUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a β hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Estrutura* 4, 1077-1092.

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**, v. 1 (19), p. 1-5, 2007.

NASCIMENTO, M. N. do. Desenvolvimento de modelos de QSAR e planejamento de novos inibidores da enzima dUTPase de *Plasmodium falciparum*. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2015.

NEMETH-PONGRACZ, V.; BARABAS, O.; FUXREITER, M.; SIMON, I.; PICHOVA, I.; RUMLOVA, M.; ZABRANSKA, H.; SVERGUN, D.; PETOUKHOV, M.; HARMAT, V.; KLEMENT, E.; HUNYADI-GULYAS, E.; MEDZIHRADESKY, K.F.; KONYA, E.; VERTESSY, B.G. (2007). Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins. **Nucleic Acids Res.** 35, 495 -505.

NEMUKHIN, A.V.; GRIGORENKO, B.L.; LUSHCHEKINA, S.V.; VARFOLOMEEV, S.D. Quantum chemical modelling in the research of molecular mechanisms of enzymatic catalysis. **Russ. Chem. Rev.**, 2012, 81(11), 1011-1025.

OBREGON, A. D. C. 3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados: 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.

ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; SOD-MORIAH, G.; KAPLAN, D.; MIZHARI, D.; SEGALL, Y.; KRONMAN, C.; KARTON, Y.; LAZAR, A.; MARCUS, D.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Stereoselectivity toward VX Is Determined by Interactions with Residues of the Acyl Pocket as Well as of the Peripheral Anionic Site of AChE. **Biochemistry**, 2004, 43, 11255.

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**, San Diego, v. 221, n. 1, p. U341-U341, Apr. 2001.

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry. 2th ed., Ed. **Oxford**, 432, 2001.

PEARL, L.H.; SAVVA, R. (1996). The problem with pyrimidines. **Nat. Struct. Biol.** 3, 485 - 487.

PEIXOTO, E.M.A. Fósforo. **Química Nova na Escola**, 2002, 15.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D.F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**. 2011, 28, 1

PETRONILHO, E. C.; VILLAR, J. D. F. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**. 2014, 6 (3), 671-686.

POPPI, R. J.; PASQUINI, C.; **Chemom. Intell. Lab. Syst.** 1993, 19, 243.

PRASAD, G.S.; STURA, E. A.; ELDER, J.H.; STOUT, C.D. (2000). Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in three crystal forms Acta Crystallogr Sect. D. **Biol.Crystallogr.** 56, 1100-1109.

PUGACHEVA, E.N. ; IVANOV, A.V.; KRAVCHENKO, J.E.; KOPNIN, B.P. ; LEVINE, A.J.; CHUMAKOV, P.M. Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. **Oncogene**, 21 (2002), pp. 4595–4600.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews** 1987, 87, 955.

RAMALHO, T. C. ; de CASTRO, A. A. ; SILVA, D. R. ; SILVA, M. C. ; FRANCA, T. C. C. ; BENNION, B. J. ; KUCA, K. . Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches Toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1041-1061, 2016.

RAMALHO, T. C.; CAETANO, M.S.; JOSA, D.; LUZ, G. P.; FREITAS, E. A.; CUNHA, E. F. F. Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis dUTpase: Docking and Catalytic Mechanism Studies. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**. ISSN 0739-1102 Volume 28, Issue Number 6, (2011).

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; Drogas que Inibem a Cholinesterase. 4ª edição, **Guanabara Koogan**, 2001, 110-115.

RAO, M.A.; SCENZA, R.; ACEVEDO, F.; DIEZ, M.C.; GIANFREDA, L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**, 2014, 107, 145-162.

RAUPP, D.; SERRANO, A.; MARTINS, T. L. C. A evolução da química computacional e sua contribuição para a educação em química. **Revista Liberato**, 2008. Novo Hamburgo, v. 9, n. 12, p. 13-22.

RENCHER, A. C.; *Methods of Multivariate Analysis*, 2nd ed., Wiley: New York, 2002.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, 2007, 30, 159-170.

SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48 (7), p. 1198-1229, 2009.

SENTHILKUMAR, K.; MUJIKA, J. I.; RANAGHAN, K. E.; MANBY, F. R.; MULHOLLAND, A. J.; HARVEY, J. N. Analysis of Polarization in QM/MM Modelling of Biologically Relevant Hydrogen Bonds. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, p. S207-S216, 2008.

SHLOMAI, J.; KORNBERG, A. (1978). Deoxyuridine Triphosphatase of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 253. 3305-3312.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L.; CARVALHO, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando micro extração em fase sólida e CGAR-EM. **Química Nova** 1999, 22, 197.

SILVA, G.R.; BORGES, Jr., I.; VILLAR, J.D.F. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, 2012, 35, 2083.

SILVA, J. B. P.; MALVESTITI, I.; HALLWASS, F.; RAMOS, M. N.; LEITE, L. F. C. da C.; BARREIRO, E. J.; **Quím. Nova** 2005, 28, 492.

SILVA, T. H.A. Modelagem molecular com o auxílio do computador. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em Eucalyptus. *Addubare*, v.2, n.9, p.4-7, 2003.

SOARES, M. C.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Estratégias para a síntese de desoxinucleosídeos. **Quím. Nova**, Vol. 24, n.2, 206-219, 2001.

SOUSA, R. A., et. al. Classificação de água-de-coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICPOES. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654-656, 2006 B.

SOUSA, R. A.; BORGES NETO, W.; POPPI, R. J.; BACCAN, N.; CADORE, S.; **Quím. Nova** 2006A, 29, 654.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Quím. Nova**, Vol. 35, No. 1, 223-229, 2012.

STODDART, J. F.; *Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reaction of organic compounds*. 6th ed., **Oxford**, C1979.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S.; *Modern quantum chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory*, Courier Dover: New York, 1996.

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

TOKUDA, Y.; KIKUCHI, M.; TAKAHASHI, O.; STEIN, G.H. Prehospital management of sarin nerve gas terrorism in urban settings: 10 years of progress after the Tokyo subway sarin attack. *Resuscitation* 2006, 68, 193.

VAN DER KAMP, M. W.; MULHOLLAND, A. J. Combined Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. **Biochemistry**, v. 52 (16), p. 2708-2728, 2013.

VARGA, B.; BARABÁS, O.; KOVÁRI, J., TÓTH, J., HUNYADI- GULYÁS, É.; KLEMENT, É.; MEDZIHRADESKY, KF, TÖLGYESI, F., FIDY, J.; VERTESSY, B.G. (2007). Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS Lett.* 581 ,4783 -4788.

VARGA, B.; BARABÁS, O.; TAKÁCS, E.; NAGY, N.; NAGY, P.; VÉRTESSY, B. G. Active site of mycobacterial dUTPase: Structural characteristics and a built-in sensor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 1, p. 8–13, 2008.

VÉRTESSY, B. G.; TÓTH, J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 97–106, 2009.

WANG, L. Q.; MIZAIKOFF, B.; KRANZ, C.; **J. Chem. Educ.** 2009, 86, 1322.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymatic reactions-dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. **Journal Molecular Biology**. 1976, 103, 227.

WHITTINGHAM, J. L.; LEAL, I.; NGUYEN, C.; KASINATHAN, G.; BELL, E.; JONES, A. F.; BERRY, C.; BENITO, A.; TURKENBURG, J. P.; DODSON, E. J.; RUIZ PEREZ, L. M.; WILKINSON, A. J.; JOHANSSON, N. G.; BRUN, R.; GILBERT, I. H.; GONZALEZ PACANOWSKA, D.; WILSON, K. S. dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. **Structure** (London, England: 1993), v. 13, n. 2, p. 329–338, 2005.

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

WOREK, F.; KOLLER, M.; THIERMANN, H.; SZINICZ, I. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology** 2005, 214, 182.

WYMORE, T.; FIELD, M. J.; LANGAN, P.; SMITH, J. C. and PARKS, J. M. Hydrolysis of DFP and the Nerve Agent (S) Sarin by DFPase Proceeds along Two Different Reaction Pathways: Implications for Engineering Bioscavengers. **J. Phys. Chem. B**. 2014, 118, 4479–4489.

YANG, Y.C.; SZAFRANIEC, L. L.; BEAUDRY, W. T.; **J. Org. Chem.** 1993, 58, 6964.

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 – ARTIGO***ARTIGO - ASYMMETRIC BIODEGRADATION OF THE NERVE AGENTS SARIN AND VX
BY HUMAN DUTPASE: CHEMOMETRICS, MOLECULAR DOCKING AND HYBRID QM/MM
CALCULATIONS***

*O artigo foi submetido no Periódico científico:
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*

Abstract OP nerve agents are among the most toxic chemical substances known. Their toxicity is due to their ability to bind to Acetylcholinesterase (AChE). Currently, some enzymes, such as Phosphotriesterase (PTE), Human Serum Paraoxonase 1 (HuPON1) and Diisopropyl Fluorophosphatase (DFPase), capable of degrading OP, have been characterized. Regarding the importance of bioremediation methods for detoxication of OP, this work aims to study the interaction modes between the human Human Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase (dUTPase) and Sarin and VX, considering their R_p and S_p enantiomers, to evaluate the asymmetric catalysis of those compounds. In previous work, this enzyme has shown good potential to degrade phosphotriesters, and based on this characteristic, we have applied the human dUTPase to the OP degradation. Molecular docking, chemometrics and QM/MM calculations have been employed, showing a good interaction between dUTPase and OP. Two possible reaction mechanisms were tested, and according to our theoretical results, the catalytic degradation of OP by dUTPase can take place via both mechanisms, beyond being stereoselective, i.e., dUTPase cleaves one enantiomer preferentially in relation to other. Chemometric techniques provided excellent assistance for the performing of this theoretical investigation. The dUTPase study shows importance by the fact of it being a human enzyme.

Keywords. Organophosphorus compounds, Molecular docking, Chemometrics, dUTPase, QM/MM.

1.0 Introduction

Organophosphorus compounds (OP) like VX and Sarin (GA) (**Fig. 1**) pose a continuing threat to military and civilian populations, due to their toxic effects acting on the center nervous system. Many thousands of tons of nerve agents have been developed and stocked by several countries since World War II (KNUDSON, 1991). In the search for bioremediation of the intoxication caused by OP, several technologies have been investigated in order to get a rapid and efficient detoxification of the poisoning. In line with that, researchers have been intensively studying new bioremediation processes for this purpose. This is a growing field in medicinal chemistry (Richardt and Blum, 2008).

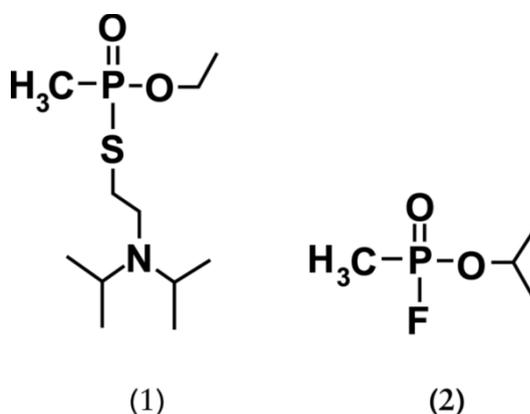


Figure 1 - Chemical structures of the nerve agents VX (1) and Sarin (2).

In the last decade, an increasing number of enzyme-based systems have been investigated and were shown to be effective decontaminants (Ramalho, de Castro, Silva, Silva, Franca, Bennion & Kuca, 2016). This field has shown to be a promising area, allowing the discovery of enzymes capable of degrading OP (Richardt and Blum, 2008). Among those enzymes, we highlight the Phosphotriesterase (PTE), Human Serum Paraoxonase 1 (HuPON1) and Diisopropyl Fluorophosphatase (DFPase) (Blum, Löhr, Richardt, Rüterjans, & Chen, 2006; Hartleib & Rüterjans, 2001; Lenz et al., 2007; Perezgasga, Sanchez-Sanchez, Aguila, & Vazquez-Duhalt, 2012; Raushel & Holden, 2000; Scharff, Koepke, Fritsch, Lücke, & Rüterjans, 2001).

OP nerve agents are among the most toxic chemical substances known (Dacre, 1984). Their toxicity is due to their ability to bind to Acetylcholinesterase (AChE), more precisely, on the Serine amino acid residue. AChE inhibition leads to an uncontrolled increase in the Acetylcholine neurotransmitter (Ach) rate, causing serious cholinergic synapse problems (Taylor, 2001; Ecobichon, 2001). Conventional OP detoxification methods are expensive; require harsh conditions, and strict containment (Gotthard, Hiblot, Gonzalez, Elias, & Chabriere, 2013). “Enzymes are well known for their diversity and ability to perform chemical reactions at elevated rates not reachable by traditional chemical or physical catalysis” (Rao, Scelza, Acevedo, Diez, & Gianfreda, 2014). The use of these

“green catalysts” for bioremediation purposes has increased significantly due to the discovery of new enzymes and re-engineering of known enzymes. “In this scenario, OP-degrading enzymes have attracted much attention as promising candidates for detoxification of nerve agents due to their fast hydrolysis rate compared to chemical methods” (Gotthard et al., 2013; Iyer, Iken, & Damania, 2013; Jeong et al., 2014).

An enzyme that has attracted the interest of researchers is the human Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase (dUTPase) (Mol, Harris, McIntosh, & Tainer, 1996). The enzyme requires divalent metal ions such as Mg^{2+} , which are essential for activity. The dUTPase enzyme has a fundamental role in the nucleotide metabolism, acting as a biological catalyst in the degradation of dUTP to dUMP and pyrophosphate. This enzyme may be employed in other metabolic activities, admitting different functions (Cho, Sun, Yu, Kwon, & Kwon, 2012). The dUTPase active site is demonstrated in Figure 2 below.

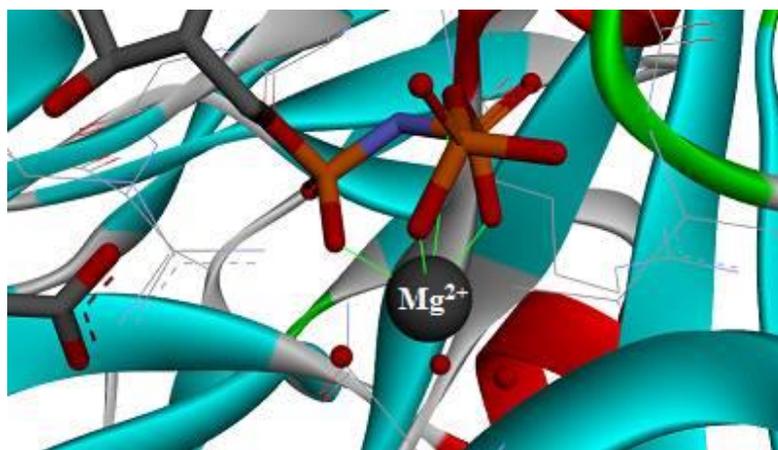


Figure 2 - Active metal center of dUTPase.

The study of enzymes shows good potential for bioremediation of OP (Blum et al., 2006; Hartleib & Rüterjans, 2001; Lenz et al., 2007; Perezgasga et al., 2012; Raushel & Holden, 2000; Scharff et al., 2001). Theoretical calculations have been used as a tool in order to demonstrate the potential of this enzyme to degrade nerve-warfare agents. According to the routes for reaction mechanisms already reported for other degrading enzymes (Aubert, Li, & Raushel, 2004; Dumas, Caldwell, Wild & Raushel, 1989; Furlong, 2008; Hu, Jiang, Lenz, Cerasoli, & Wallqvist, 2009; Khersonsky & Tawfik, 2006; Lenz et al., 2007; Otto et al., 2009; Sanan et al., 2010; Yeung, Lenz, & Cerasoli, 2008), we put in evidence two possible reaction mechanisms for human dUTPase in the degradation of the nerve agents Sarin and VX, taking into account the R_p and S_p enantiomers for each compound.

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 Mg^{2+} ion and removal of a hydrogen atom from the water by the Asp102 amino acid residue, leading to the formation of a hydroxyl ion. This activated water will directly attack the OP, more precisely at the phosphorus center, with the expulsion of the leaving group (Aubert et al., 2004; Dumas et al., 1989; Lenz et al., 2007). For the second possible reaction, no water molecule is involved. In this case, there will be an attack on the phosphorus center directly by the Asp102 amino acid residue, equally promoting the expulsion of the leaving group and cleavage of the compound (Lenz et al., 2007).

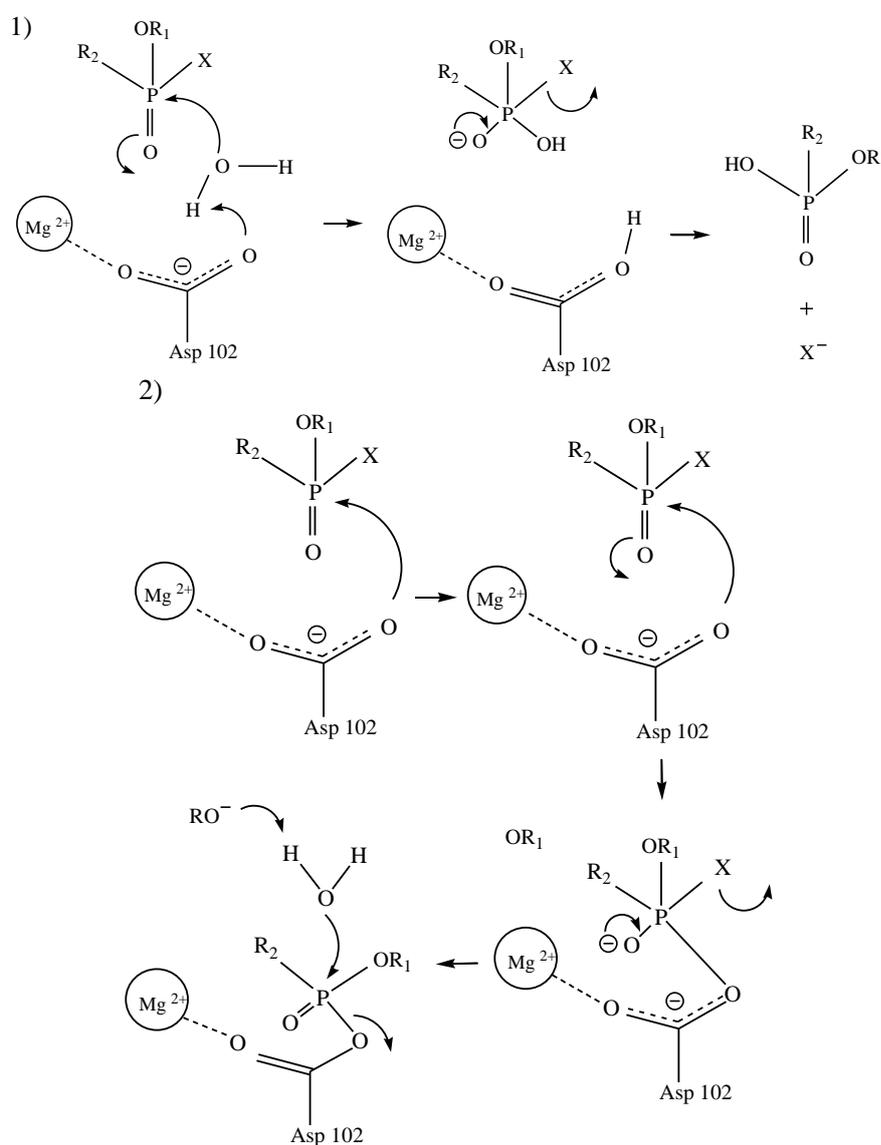


Figure 3 - Proposed hydrolysis reaction mechanisms for dUTPase in the degradation of OP.

We have proposed that the degradation mechanism of OP by the human dUTPase is an asymmetric biocatalysis, and therefore, this enzyme must cleave one enantiomer with a higher

efficiency rate in relation to the other. A deeper understanding of the enzymatic hydrolysis mechanism of dUTPase is essential to raise new insights on the OP bioremediation process.

In line with that reported so far, the goal of this work is to evaluate the interaction between VX and Sarin in the human dUTPase active site, by means of Molecular docking, with the subsequent unveiling of the reaction mechanism, employing the hybrid QM/MM method.

The Phosphotriesterase enzyme (PTE) has shown significant results in previous studies (de Castro, Caetano, Silva, Mancini, da Rocha, da Cunha & Ramalho, 2016), and this theoretical investigation aims to evaluate the dUTPase performance in relation to PTE, by analyzing its affinity with OP and hydrolysis reaction mechanisms.

2.0 Computational details

2.1 Docking Procedure

For the docking study, VX and Sarin were used to perform the calculations. The compounds structures were constructed by using PC Spartan Pro® program (Hehre, Deppmeier & Klunzinger, 1999) and the partial charges of the atoms were elucidated. The compounds were docked inside the crystallographic structure of dUTPase (PDB code 2HQU; resolution = 2.20 Å) (Varga et al., 2007) using the Molegro Virtual Docker program (MVD®) (Thomsen & Christensen, 2006), taking into account the same procedures employed previously (Silva, Torres, Castro, da Cunha, Oliveira, Corrêa & Ramalho, 2015; Guimaraes et al., 2011; Karina S Matos et al., 2011;). For the development of the calculations, a radius of 5 Å was considered, where the residues were kept as flexible. Due to the nature of the docking methods, the calculations were executed, generating 100 poses (conformation and orientation) for the ligand.

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 Generic Evolutionary Method for molecular docking with a new hydrogen bonding term and new charge schemes (Teodorico C Ramalho, Caetano, da Cunha, Souza, & Rocha, 2009). 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 of the use of two different parameter sets, as described ahead: one for approximation of the steric term (Van der Waals) among atoms, and the other potential for the hydrogen binding. The second term 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 & Christensen, 2006).

E_{intra} is the internal energy of the ligand:

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

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 one characterizes the torsional energy. 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} , 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 & 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, Barbosa, Oliveira, & Ramalho, 2010; da Cunha, Ramalho, & Reynolds, 2008; Thomsen & Christensen, 2006).

2.2 Multivariate analysis of main components

At first, 40 low-energy poses were adopted for analysis, within the 100 conformations generated for each OP (Sarin and VX, considering their Rp and Sp enantiomers), taken from the molecular docking calculations. The parameters analyzed are as follows: spatial coordinates (x, y, z) from the phosphorus atom of the nerve agents ((COx P); (COy P); (COz P)), intermolecular interaction energy (ENERGY), hydrogen bonds (H-BOND), attack angle between the oxygen in the Asp102 amino acid residue and phosphorus (DISTANCE ASP – P) and the distance between the water molecule and P in the nerve agent (DISTANCE H₂O – P). For this statistical treatment, we have taken into account the closer water and ASP102 amino acid residue, which presented a spatial localization favorable for the reaction mechanism. A table with the explored data from the docking study was built as preprocessing, and for the PCA methodology, the MATLAB program, version R2012b, was employed (Hanselman & Littlefield, 1997).

2.3 QM/MM methodology

Large systems, such as proteins, cannot currently be treated exclusively by QM methods with high electronic correlation due to the high computational demand. Thus, in this work, mixed quantum and molecular mechanics (QM/MM) combined with docking techniques were performed to determine the most probable reaction pathway for the OP degradation catalyzed by dUTPase. From a theoretical point of view, we have applied a procedure combining docking technique and DFT calculations at the QM/MM interface for the enzymatic mechanism. Actually, this theoretical strategy has been previously employed on other occasions (Goncalves, Costa Franca, Caetano, & Ramalho, 2014; Karina Silvia Matos, da Cunha, Abagyan, & Ramalho, 2014; T C Ramalho, da Cunha, & de Alencastro, 2004; Teodorico C Ramalho et al., 2009) and it has been intensively employed in our research, and with this, computational methods are very important for allowing us to analyze them (Borman, 2004). In an attempt to get more accurate results and electronic effects, QM calculations were carried out at the density functional theory (DFT) level with the Gaussian 09 package (Frisch et al., 1998). DFT methods have been widespread, showing good performance for large systems, such as biomolecules (BESLER, MERZ, & KOLLMAN, 1990; SINGH & KOLLMAN, 1984). The calculations were based on the generalized gradient approximation functional proposed by Gustin et al (Gustin et al., 1999). This relationship of functional and basis sets has been tested for similar systems (da Cunha et al., 2010; Rutkowska-Zbik & Witko, 2006).

All transition states, intermediates and precursors involved were calculated and characterized by calculations identifying imaginary frequencies (Giacoppo et al., 2014; Li et al., 2012). Each conformer was fully optimized at the DFT level, with conjugate gradient and quasi-Newton-Raphson algorithms. The final geometries were obtained with the density functional Becke's three-parameter exchange functional and the gradient-corrected functional of Lee, Yang and Paar (B3LYP) (da Cunha et al., 2008), using the 6-31G (d, p) basis set. The QM system consisted of neighboring peptide bonds, link atoms, crystallographic water molecules, ASP102, VX/Sarin (R_p and S_p), inside a sphere with a radius of 5 Å.

3.0 Results and discussion

3.1 PCA Studies (Principal Component Analysis)

Usually, the low-energy conformations from docking are selected for the reaction mechanism. It should be kept in mind, however, that conformations with the lowest intermolecular energy are not representative (da Cunha, Mancini, & Ramalho, 2012). In this work, we have explored chemometric methods aiming mainly to reduce the number of variables, elimination of redundant data and facilitate results interpretation. The spatial position, distance and attack angle of the atoms involved in the

chemical reaction are valued criteria in the search for a better conformation with a high reactive character. Seeking to show the other variables that "weigh" in the search of a better conformation to the mechanism, a PCA was built (Figure 4), which reports the correlation and significance between energy and other parameters analyzed for the reaction to take place. Starting from 8 initial variables to represent the docking, after the PCA, the same system is represented from 3 new components (CP1, CP2, CP3).

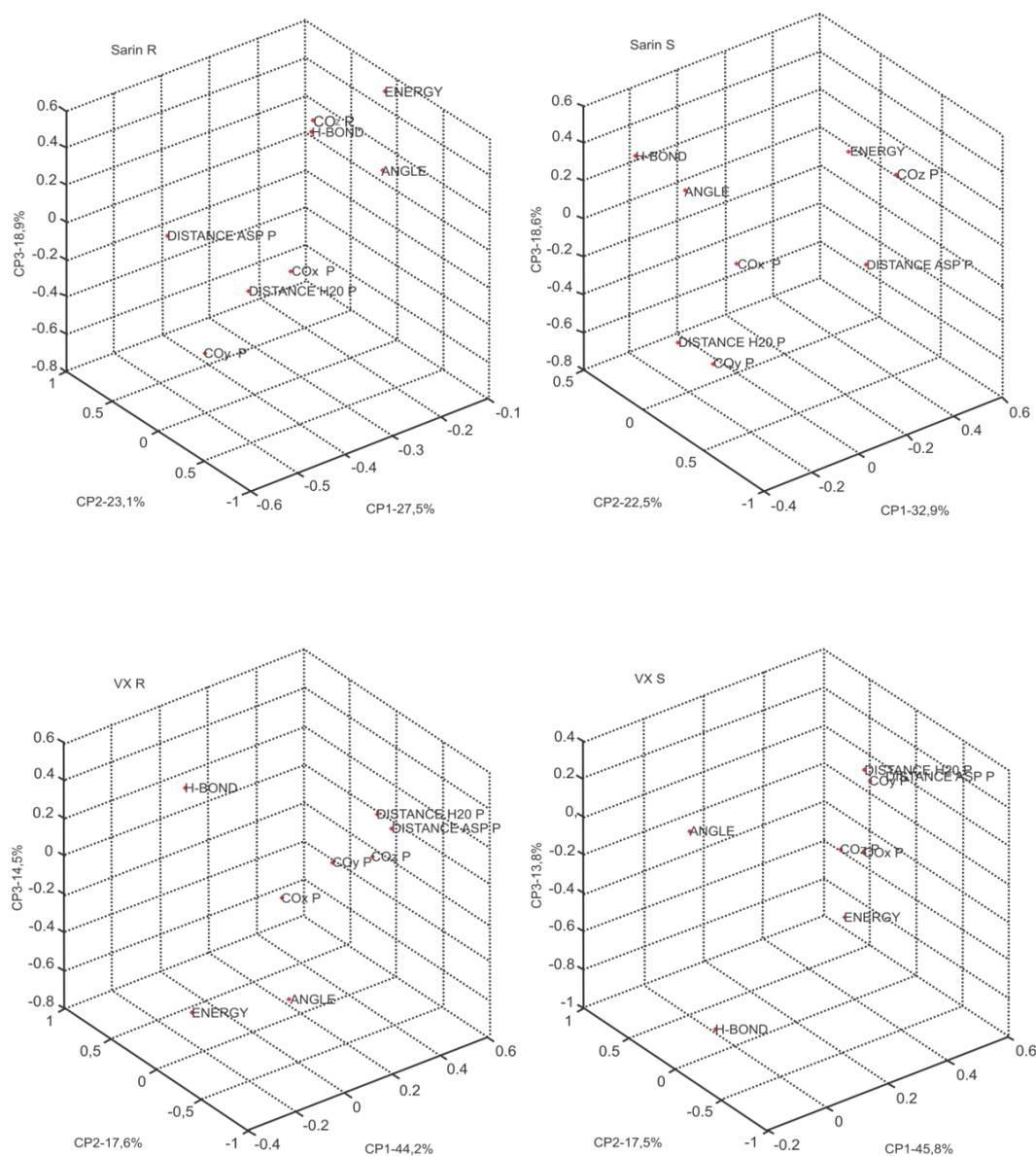


Figure 4 - PCA graphs for the OP (Sarin-Rp/Sp and VX-Rp/Sp).

Analyzing the graphics, we can realize that the energy variable does not represent correlation and high significance, with the other variables analyzed. Thus, according to the results obtained by

multivariate analysis, it was identified that not necessarily a conformation with low intermolecular interaction energy is highly reactive. There are important factors such as the spatial position of the OP phosphorus atom.

3.2 Selection by Occupation Frequency

Since the energy alone cannot be used as the sole parameter to choose a better conformation for the reaction mechanism, an alternative is pointed out in this work by using the PCA chemometric method, in order to minimize and facilitate the exploitation of the docking results, reducing the number of variables and indicating the most representative poses for the reaction mechanism. The selection method is based on the idea of occupancy rate, with the aim of selecting the molecule(s) that contribute less to the standard deviation of the median framework. Figure 5 describes the results of PCA of the OP in study. The three-dimensional graph demonstrates a data representativeness of around 69.5%, 74%, 76.3% and 77.1% for the compounds, respectively.

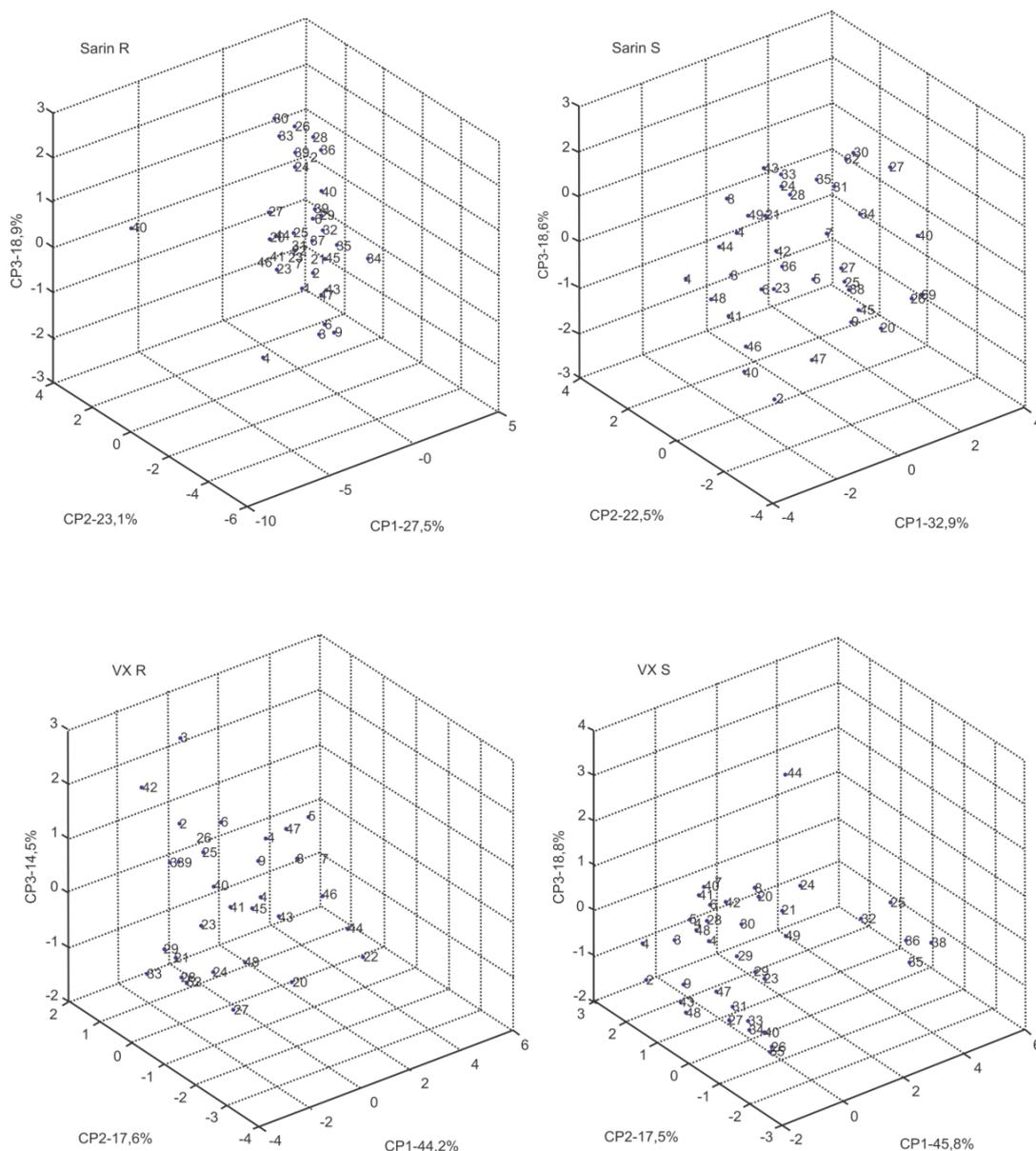


Figure 5 - Three dimensional graph involving the principal components for the OP and dUTPase complex.

The interpretation of a three-dimensional graph can vary from the angle of the axes analyzed. Thus, two-dimensional representations were built by combining the projections in order to maximize the interpretation of data and more objectively evidence the most appropriate poses for the reaction mechanism. The CP1 will always be more representative than CP2, and so on. Figure 6 represents a view angle which allows a better interpretation of the displayed poses for the mechanism and those that diverge from the median frame.

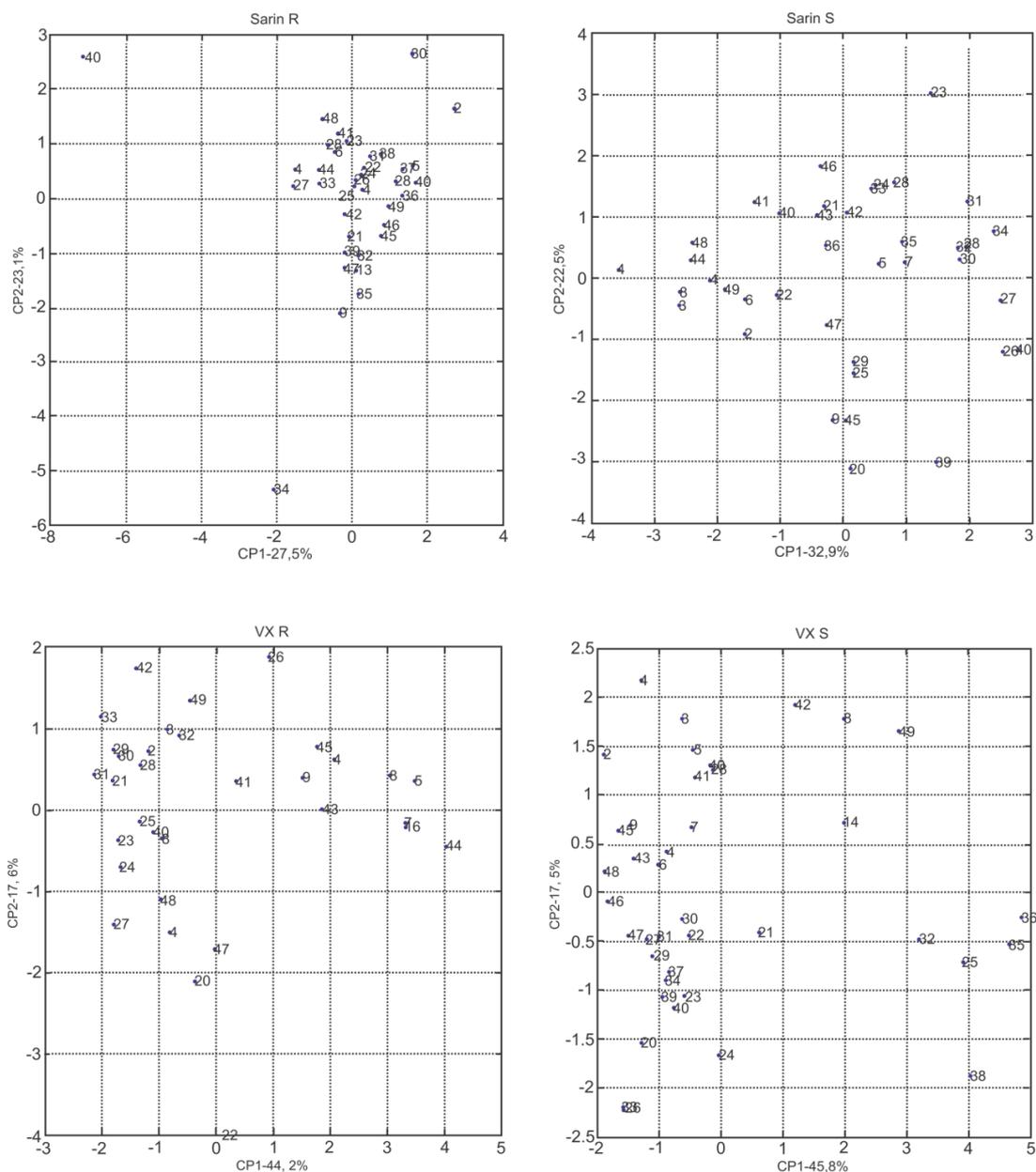


Figure 6 - PC1 x PC2 projection for the dUTPase/OP system.

Figure 6 reports the position of the OP poses, indicating which poses disperse and which contribute less to the deviation from the median structure. The closest poses of both components (CP1 and CP2) are the most suitable for the mechanism, i.e., the conformers which own the greatest similarity with the average structure. Statistically, Poses 25, 5, 11 and 30 were chosen to represent the OP in the reaction mechanism. These are the most suitable poses indicated by PCA. If these poses are not satisfactory for the reaction mechanism, the later conformations will be the next to be evaluated. After choosing the conformations theoretically suitable for the reaction mechanism, the intermolecular interaction energies were calculated; the OP interactions with the amino acid residues and water present in the enzyme active site were revealed. Therefore, we can better understand the OP interaction modes in the human dUTPase active site.

3.3 Affinity: Molecular Docking

In order to evaluate the first stage of the transformation, docking calculations were carried out. In fact, molecular mechanics based methods involving docking procedures are suitable tools to adjust ligands at target sites and to estimate interaction energy (affinity). Both nerve agents were docked in the human dUTPase enzyme, close to Asp102 amino acid residue, located in the active site. All reasonable guidelines related to the cleavage of OP were investigated, following a search of the conformational space and different OP orientations, using the Molegro Virtual Docker® (Thomsen & Christensen, 2006). The ligand-protein interaction energies were calculated to better understand the variations between the binding modes of the substrates in the active site of the enzyme. For the docking studies, a cavity prediction algorithm based on a 3D box was used to generate binding sites in the dUTPase enzyme. Among several binding sites, the active one to be used in this work presented a volume of 62,464 Å³.

Table 1 - Docking energy values of the OP conformations under study chosen by PCA.

Nerve Agent	Intermolecular Energy (kcal.mol⁻¹)	H-bond strength (kcal.mol⁻¹)	H-bond length (Å)	H-bond residues and H₂O
Sarin-R_p	-22.46	-1.80	3.24	Ser 86
		-0.68	3.29	Val 100
		-2.50	2.60	H ₂ O
		-2.50	2.80	H ₂ O
		-0.68	3.29	Val 100
Sarin-S_p	-30.28	-2.50	3.06	H ₂ O
VX-R_p	-41.51	-1.64	3.27	H ₂ O
		-2.50	2.77	H ₂ O
		-2.50	3.08	H ₂ O
		-5.00	3.10	H ₂ O
		-0.44	3.47	Val 100
VX-S_p	-24.38	-2.50	2.87	Phe 158
		-0.05	3.59	Ser 86
		-2.50	3.10	H ₂ O
		-2.50	3.10	H ₂ O

The intermolecular interaction energies between human dUTPase and OP were determined in order to evaluate the structural and electronic aspects that modulate the binding modes of these nerve

agents in the active site, taking into account their R_p and S_p -enantiomers. By observing Table 1, it can be clearly seen that both compounds have shown favorable energy values for the selected poses in the PCA method. According to the docking results, VX- R_p presented the lowest intermolecular interaction energy, being more favorable in relation to its S_p -enantiomer and both Sarin enantiomers. Considering the energy value of $-41.51 \text{ kcal.mol}^{-1}$, VX- R_p seems to be better stabilized in the enzyme active site, whose stability may be favored by structural and electronic effects, provided by the interaction with amino acid residues and water molecules. This less-toxic conformation of VX interacted with several water molecules and the Val100 amino acid residue (Figure7).

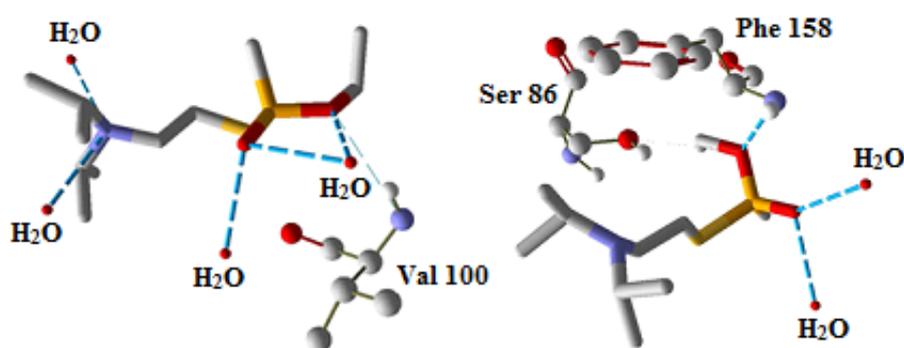


Figure 7 - H-bond interactions of VX- R_p and VX- S_p in the dUTPase enzyme active site, respectively.

The second compound with the best interaction energy is Sarin- S_p , with an energy value of $-30.28 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Interestingly, this pose interacted with one water molecule (Figure 8), showing that there are other factors involved in the stabilization of the compound in the active site. Meanwhile, VX- S_p has shown the third value in energy, $-24.38 \text{ kcal.mol}^{-1}$, taking into account a descending order of stability. This enantiomer performed four hydrogen bonds, two with water molecules and two with amino acid residues, Phe158 and Ser86. Finally, Sarin- R_p has presented an energy value very similar to VX- S_p , $-22.46 \text{ kcal.mol}^{-1}$, but has still shown the highest intermolecular interaction energy. This conformation performed hydrogen bonds with two water molecules and the Val100 and Ser86 amino acid residues (Figure 8).

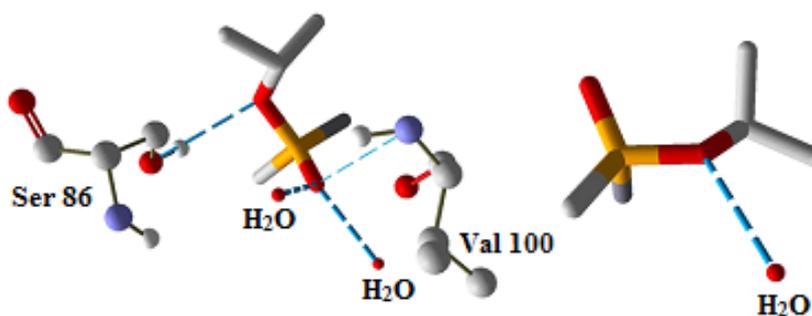


Figure 8 - H-bond interactions of Sarin- R_p and Sarin- S_p in the dUTPase enzyme active site, respectively.

By observing Table 1, it can be seen that, as in other enzymes (Blum et al., 2006; Hartleib & Rüterjans, 2001; Lenz et al., 2007; Perezgasga et al., 2012; Raushel & Holden, 2000; Scharff et al., 2001), the human dUTPase affinity for OP is apparently modulated by stereochemistry. In other words, this enzyme interacts with one enantiomer preferentially in relation to the other, but this tendency will be confirmed by reaction mechanism calculations. According to the molecular docking calculations, dUTPase shows interaction with the OP compound for both enantiomers, with differences in terms of the preferred stereochemistry. These characteristics have been noticed for the PTE enzyme in previous studies (de Castro et al., 2016).

3.4 Mechanistic studies in the human dUTPase active site

More recently, the hybrid quantum mechanical/molecular mechanics (QM/MM) approach has emerged as a powerful method 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 and presented below.

Table 2 - Relative activation energies ($\Delta\Delta E^\ddagger$) for Sarin and VX (R_p and S_p -enantiomers) in the human dUTPase active site.

Nerve Agent	Mechanism 1 $\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol ⁻¹)	Mechanism 2 $\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol ⁻¹)
Sarin- R_p	12.41	5.12
Sarin- S_p	12.31	15.00
VX- R_p	0.00	53.98
VX- S_p	52.26	5.84

The mechanistic studies in the dUTPase active site reveal interesting results, contributing to the understanding of the reaction pathways in which the OP hydrolysis takes place by the human enzyme. The results from the QM/MM calculations are detailed for both Mechanisms **1** and **2** (see Table 2). From these theoretical data, it is easy to observe that VX- R_p was the nerve agent with the most favorable activation energy for the reaction process via Mechanism **1**, i.e., this enantiomer is preferentially degraded by dUTPase in this route. In turn, considering now Mechanism **2**, the enzyme is more reactive for Sarin- R_p , 5.12 kcal.mol⁻¹ higher in relation to VX- R_p via Mechanism **1**. Turning to Mechanism **1**, Sarin- R_p and Sarin- S_p have shown similar energy values, 12.41 and 12.31 kcal.mol⁻¹, respectively. In this context, it is not possible to notice any selectivity by the human dUTPase in this route for Sarin. On the other hand, the enzyme was pretty selective for the VX nerve agent, *via*

Mechanism 1. Thus, by observing the activation energy values described in Table 2, VX-S_p has presented the highest activation energy value, 52.26 kcal.mol⁻¹.

By looking the values from Mechanism 2, dUTPase showed stereoselectivity for both nerve agents, mainly for VX. Sarin-R_p is preferentially degraded in relation to the S_p-enantiomer, with a lower energetic barrier, the difference being about 9.88 kcal.mol⁻¹. The situation changes for VX, given that VX-S_p is preferentially degraded by following this route, with a high activation energy difference, about 48.14 kcal.mol⁻¹, thus showing a significant stereoselectivity in relation to the other enantiomer. Considering these mechanistic studies in the human dUTPase active site, the preferential route for the OP degradation may take place *via* both asymmetric Mechanisms 1 and 2, depending on the kind of OP and its stereochemistry. Regarding both mechanisms analyzed here, VX is supposed to follow a specific mechanism depending on the enantiomer, R_p or S_p. For example, the R_p-enantiomer of this compound allows a better approximation and attack angle for the hydroxyl ion formed from the activation of a water molecule; on the other hand, the S_p-enantiomer provides a more stable situation for the approximation and direct attack by the Asp102 amino acid residue.

Previously, studies were performed with dUTPase by employing the same methodologies (Teodorico C Ramalho et al., 2011). In that case, “the binding orientation and prediction of binding affinities of some potential dUTPase inhibitors were investigated” (Teodorico C Ramalho et al., 2011). The dUTPase enzyme can open a new avenue to study the bioremediation process of organophosphorus compounds.

In relation to the PTE enzyme (de Castro et al., 2016), those theoretical studies corroborated very well with the experimental data from Cherny et al., 2013 (Cherny, Greisen, Ashani, Khare, Oberdorfer, Leader, Baker & Tawfik, 2013). It is important to comment that the same methodology employed on that occasion has been used here in this theoretical investigation. The following table shows some significant data which may assist us in these studies.

Table 3 - Experimental results and relative activation energy values for PTE with Sarin and VX nerve agents (de Castro et al., 2016).

Compounds	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol ⁻¹)	K_{cat}/K_M ($\times 10^4 M^{-1} min^{-1} \pm SD$) **
Sarin-R _p	51.82	
Sarin-S _p	0.00	823 +/- 68
VX-R _p	53.65	
VX-S _p	73.40	0.94 +/- 0.07

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

Table 3 presents the values obtained for the enzymatic degradation (Mechanism 1) related to Sarin and VX, taking into account their R_p and S_p enantiomers, by the PTE enzyme. Herein, it is clear that PTE presented a low activity towards VX, for both enantiomers, due to the high activation energy, and this feature can be rationalized in terms of its higher toxicity in relation to Sarin. On the other hand, according to Table 2, dUTPase presented the highest activity towards VX-R_p. That feature is a very important issue, given the high difficulty of degrading VX. Our findings put in evidence that dUTPase seems to be a good alternative for the degradation of VX and other OP nerve agents.

Conclusions

In this theoretical study, we have presented the human dUTPase enzyme as a potent biological tool for the detoxification of the poisoning caused by warfare nerve agents. By applying dUTPase in the OP degradation, our results are promising. This feature was demonstrated by the molecular docking calculations, supported by statistical chemometrics analysis. The two possible routes for the degradation mechanism seem to be effective. According to our calculations, the reaction process may take place *via* both mechanisms, depending on the OP type and stereochemistry of the compounds. In this line, it is clear that the human dUTPase can be a potential candidate for a bioremediation process of OP nerve agents, and in relation to PTE enzyme, even with an increased reactivity towards to toxic VX. These findings represent a starting point towards the design of new biodegraded enzymes for OP compounds.

Conflicts of interest

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

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.

References

- Aubert, S. D., Li, Y. C., & Raushel, F. M. (2004). Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *BIOCHEMISTRY*, *43*(19), 5707–5715.
- BESLER, B. H., MERZ, K. M., & KOLLMAN, P. A. (1990). ATOMIC CHARGES DERIVED FROM SEMIEMPIRICAL METHODS. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*, *11*(4), 431–439.
- Blum, M. M., Löhr, F., Richardt, A., Ruterjans, H., & Chen, J. C. H. (2006). Binding of a designed substrate analogue to diisopropyl fluorophosphatase: Implications for the phosphotriesterase mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(39), 12750–12757.
- Borman, S. A. (2004). Much to do about enzyme mechanism. *Chemical and Engineering News*, Washington, *8*, 35–39.
- Cherny, I., Greisen, P. J., Ashani, Y., Khare, S. D., Oberdorfer, G., Leader, H., Baker, D., & Tawfik, D. S. (2013). Engineering V-Type Nerve Agents Detoxifying Enzymes Using Computationally Focused Libraries. *ACS Chemical Biology*, *5*, 2394–2403.
- Cho, S. S., Sun, Y., Yu, M., Kwon, S. H., & Kwon, S.-T. (2012). Characterization and PCR applications of dUTPase from the hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus pacificus*. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY*, *51*(6-7), 342–347.
- Dacre, J. C. (1984). Toxicology of some anticholinesterases used as a chemical warfare agents: A review. In Cholinesterases, Fundamental and Applied Aspects (Brzin, M., Barnard, E. A., and Sket, D., Eds.), *Gruyter*, 415–426.
- Da Cunha, E. F. F., Barbosa, E. F., Oliveira, A. A., & Ramalho, T. C. (2010). Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS*, *27*(5), 619–625.
- Da Cunha, E. F. F., Mancini, D. T., & Ramalho, T. C. (2012). Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors. *MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH*, *21*(5), 590–600.
- Da Cunha, E. F. F., Ramalho, T. C., & Reynolds, R. C. (2008). Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with Mycobacterium tuberculosis and human dihydrofolate reductases. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS*, *25*(4), 377–385.
- De Castro, A. A., Caetano, M. S., Silva, T. C., Mancini, D. T., da Rocha, E. P., da Cunha, E. F., Ramalho, T. C. (2016). Molecular Docking, Metal substitution and Hydrolysis reaction of Chiral Substrates of Phosphotriesterase. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *19*, Mar 25.
- Dumas, D. P., Caldwell, S. R., Wild, J. R., Raushel, F. M. (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase for *Pseudomonas diminuta*. *Journal of Biological Chemistry*, *264*, 19659–19665.
- Ecobichon, D. J. (2001). Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill*, *6*, 763–810.
- 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. (1998). Gaussian, Inc., Pittsburgh PA.
- Furlong, C. E. (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.
- Giacoppo, J. O. S., França, T. C. C., Kuèa, K., da Cunha, E. F. F., Abagyan, R., Mancini, D. T., & Ramalho, T. C. (2014). Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 18, 1–11.
- Goncalves, A. da S., Costa Franca, T. C., Caetano, M. S., & Ramalho, T. C. (2014). Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS*, 32(2), 301–307.
- Gotthard, G., Hiblot, J., Gonzalez, D., Elias, M., & Chabriere, E. (2013). Structural and enzymatic characterization of the phosphotriesterase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10.
- Guimaraes, A. P., Costa Franca, T. C., Ramalho, T. C., Renno, M. N., da Cunha, E. F., Matos, K. S., ... Kuca, K. (2011). Docking studies and effects of syn-anti isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators. *JOURNAL OF APPLIED BIOMEDICINE*, 9(3), 163–171.
- Gustin, D. J., Mattei, P., Kast, P., Wiest, O., Lee, L., Cleland, W. W., & Hilvert, D. (1999). Heavy atom isotope effects reveal a highly polarized transition state for chorismate mutase. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 121(8), 1756–1757.
- Hanselman, D., Littlefield, B. C. (1997). Mastering MATLAB 5: A comprehensive tutorial and reference. *Prentice Hall PTR*.
- Hartleib, J., & Rüterjans, H. (2001). High-yield expression, purification, and characterization of the recombinant diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 210–219.
- Hehre, W. J., Deppmeier, B. J., & Klunzinger, P. E. (1999). PC Spartan pro. *Wave function Inc.*, Irvine.
- Hu, X., Jiang, X., Lenz, D. E., Cerasoli, D. M., & Wallqvist, A. (2009). In silico analyses of substrate interactions with human serum paraoxonase 1. *PROTEINS-STRUCTURE FUNCTION AND BIOINFORMATICS*, 75(2), 486–498.
- Iyer, R., Iken, B., & Damania, A. (2013). A comparison of organophosphate degradation genes and bioremediation applications. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 787–798.
- Jeong, Y.-S., Choi, J. M., Kyeong, H.-H., Choi, J.-Y., Kim, E.-J., & Kim, H.-S. (2014). Rational design of organophosphorus hydrolase with high catalytic efficiency for detoxifying a V-type nerve agent. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 449(3), 263–267.

- Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 281(11), 7649–7656.
- KNUDSON, G. B. (1991). OPERATION DESERT SHIELD - MEDICAL ASPECTS OF WEAPONS OF MASS DESTRUCTION. *MILITARY MEDICINE*, 156(6), 267–271.
- Lenz, D. E., Yeung, D., Smith, J. R., Sweeney, R. E., Lumley, L. A., & Cerasoli, D. M. (2007). Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *TOXICOLOGY*, 233(1-3), 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. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 94(6), 1553–1564.
- Matos, K. S., da Cunha, E. F. F., Abagyan, R., & Ramalho, T. C. (2014). Computational Evidence for the Reactivation Process of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Carbamates. *COMBINATORIAL CHEMISTRY & HIGH THROUGHPUT SCREENING*, 17(6), 554–564.
- Matos, K. S., Mancini, D. T., da Cunha, E. F. F., Kuca, K., Franca, T. C. C., & Ramalho, T. C. (2011). Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin. *JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY*, 22(10), 1999–2004.
- Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M., & Tainer, J. A. (1996). Human dUTP pyrophosphatase: Uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *STRUCTURE*, 4(9), 1077–1092.
- Otto, T. C., Harsch, C. K., Yeung, D. T., Magliery, T. J., Cerasoli, D. M., & Lenz, D. E. (2009). Dramatic Differences in Organophosphorus Hydrolase Activity between Human and Chimeric Recombinant Mammalian Paraoxonase-1 Enzymes. *BIOCHEMISTRY*, 48(43), 10416–10422.
- Perezgasga, L., Sanchez-Sanchez, L., Aguila, S., & Vazquez-Duhalt, R. (2012). Substitution of the Catalytic Metal and Protein PEGylation Enhances Activity and Stability of Bacterial Phosphotriesterase. *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*, 166(5), 1236–1247.
- Ramalho, T. C., Caetano, M. S., da Cunha, E. F. F., Souza, T. C. S., & Rocha, M. V. J. (2009). Construction and Assessment of Reaction Models of Class I EPSP Synthase: Molecular Docking and Density Functional Theoretical Calculations. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS*, 27(2), 195–207.
- Ramalho, T. C., Caetano, M. S., Josa, D., Luz, G. P., Freitas, E. A., & da Cunha, E. F. F. (2011). Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis dUTpase: Docking and Catalytic Mechanism Studies. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS*, 28(6), 907–917.
- Ramalho, T. C., da Cunha, E. F. F., & de Alencastro, R. B. (2004). Solvent effects on C-13 and N-15 shielding tensors of nitroimidazoles in the condensed phase: a sequential molecular dynamics/quantum mechanics study. *JOURNAL OF PHYSICS-CONDENSED MATTER*, 16(34), 6159–6170.
- Ramalho, T. C., de Castro, A. A., Silva, D. R., Silva, M. C., Franca, T. C. C., Bennion, B. J. & Kuca, K. (2016). Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. *Current Medicinal Chemistry*, 23, 1041-1061.
- Rao, M. A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145–162.

- Raushel, F. M., & Holden, H. M. (2000). Phosphotriesterase: An enzyme in search of its natural substrate. In *ADVANCES IN ENZYMOLOGY, VOL 74* (Vol. 74, p. 51+).
- Richardt, A., Blum, M.M. (2008). Decontamination of Warfare Agents: Enzymatic Methods for the Removal of B / C Weapons. Weinheim: Wiley-VCH, Germany.
- Rutkowska-Zbik, D., & Witko, M. (2006). Following nature- Theoretical studies on factors modulating catalytic activity of porphyrins. *JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS A-CHEMICAL*, 258(1-2), 376–380.
- Sanan, T. T., Muthukrishnan, S., Beck, J. M., Tao, P., Hayes, C. J., Otto, T. C., ... Hadad, C. M. (2010). Computational modeling of human paraoxonase 1: preparation of protein models, binding studies, and mechanistic insights. *JOURNAL OF PHYSICAL ORGANIC CHEMISTRY*, 23(4, SI), 357–369.
- Scharff, E. I., Koepke, J., Fritsch, G., Lücke, C., & Rüterjans, H. (2001). Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*. *Structure*, 9(6), 493–502.
- Silva, M. C., Torres, J. A., Castro, A. A., da Cunha, E. F.F., Oliveira, L. C. A; Corrêa, A. D. & Ramalho, T. C. (2015). Combined Experimental and Theoretical Study on the Removal of Pollutant Compounds by Peroxidases: Affinity and Reactivity Toward a Bioremediation Catalyst. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*.
- SINGH, U. C., & KOLLMAN, P. A. (1984). AN APPROACH TO COMPUTING ELECTROSTATIC CHARGES FOR MOLECULES. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*, 5(2), 129–145.
- Taylor, P. (2001). Anticholinesterase agents. In Goodman&Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman, J. G., Limbird, L. E., and Gilman, A. G., Eds), *McGraw-Hill*, 175-192.
- Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.*, 49, 3315–3321.
- Tsai, P.-C., Fox, N., Bigley, A. N., Harvey, S. P., Barondeau, D. P., & Raushel, F. M. (2012). Enzymes for the Homeland Defense: Optimizing Phosphotriesterase for the Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents. *BIOCHEMISTRY*, 51(32), 6463–6475.
- Varga, B., Barabas, O., Kovari, J., Toth, J., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., ... Vertessy, B. G. (2007). Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS LETTERS*, 581(24), 4783–4788.
- Yeung, D. T., Lenz, D. E., & Cerasoli, D. M. (2008). Human paraoxonase I: A potential bioscavenger of organophosphorus nerve agents. In Mackness, B and Mackness, M and Aviram, M and Paragh, G (Ed.), *PARAOXNASES: THEIR ROLE IN DISEASE DEVELOPMENT AND XENOBIOTIC METABOLISM* (Vol. 6, pp. 151–170).