



**FLÁVIA VILLELA SOARES**

**AVALIAÇÃO POR MÉTODOS *IN SILICO* DO POTENCIAL  
DE BIORREMEDIAÇÃO DAS ENZIMAS DFPASE E OPDA  
CONTRA AGENTES DE GUERRA QUÍMICA**

**LAVRAS - MG  
2022**

**FLÁVIA VILLELA SOARES**

**AVALIAÇÃO POR MÉTODOS *IN SILICO* DO POTENCIAL DE  
BIORREMEDIAÇÃO DAS ENZIMAS DFPASE E OPDA CONTRA AGENTES DE  
GUERRA QUÍMICA**

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

Prof. (a) Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha  
Orientador(a)

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2022**

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.

Avaliação por Métodos *In Silico* do Potencial de  
Biorremediação das Enzimas DFPase e OpdAContra Agentes de  
Guerra Química / Flávia Villela Soares. - 2022.

108 p. : il.

Orientador(a): Elaine Fontes Ferreira da Cunha.

Coorientador(a): Teodorico de Castro Ramalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1.Organofosforado. 2. Biorremediação. 3.Fosfotriesterase. I.  
da Cunha, Elaine Fontes Ferreira. II. Ramalho, Teodorico de  
Castro. III. Título.

**FLÁVIA VILLELA SOARES**


**AVALIAÇÃO POR MÉTODOS *IN SILICO* DO POTENCIAL DAS ENZIMAS  
DFPASE E OPDA NA BIORREMEDIAÇÃO DE AGENTES DE GUERRA QUÍMICA**

**EVALUATION BY *IN SILICO* METHODS OF THE DFPASE AND OPDA ENZYMES  
POTENTIAL IN THE BIOREMEDIATION OF CHEMICAL WARFARE AGENTS**

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

APROVADO em 13 de maio de 2022.

Prof. Dr. Marcus Vinícius Juliaci Rocha	PMDF
Prof. (a) Dra. Maria Cristina Silva	UFSJ
Prof. Dr. Mateus Aquino Gonçalves	UFLA
Prof. (a) Dra. Melissa Soares Caetano	UFOP

Documento assinado digitalmente  
 ELAINE FONTES FERREIRA DA CUNHA  
Data: 07/06/2022 16:13:23-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. (a) Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha  
Orientador(a)

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2022**

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento não poderia ser outro, senão à Deus. Aquele que me orienta e reforça minha fé diária.

À minha mãe, uma grande incentivadora. Aquela que sempre dedicou sua vida e amor a mim, e é uma das maiores responsáveis por tudo o que sou hoje.

Ao Léo, meu companheiro e grande amigo. Aquele que acredita no meu potencial, que sonha comigo e me lembra, todos os dias, o quanto sou capaz.

Aos meus filhos Miguel e Helena, meus grandes amores, por serem minha motivação e alegria diária. São eles que me permitem descobrir o meu melhor, e reconhecer os motivos pelos quais vale a pena lutar e superar os obstáculos.

Ao meu pai, por estar sempre presente e ser um grande exemplo de vida.

As minhas tias, por todo apoio e carinho dedicados a mim e aos meus filhos em todos os momentos.

À minha terapeuta Rayane, que tem sido fundamental para que eu supere as minhas dificuldades e saiba lidar com cada uma delas.

Aos professores Elaine e Teodorico, pela orientação, ensinamentos compartilhados, incentivo, apoio e confiança, que foram de suma importância para a realização dessa incrível vivência acadêmica.

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.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001\*. Ao CNPq e à FAPEMIG pelo financiamento concedido para a realização deste projeto.

Aos amigos conquistados durante essa etapa, em especial, ao Alexandre, por todo auxílio, paciência e parceria nesses anos.

Aos amigos do Grupo de Química Computacional, pelos momentos e experiências vividas, 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

Os compostos organofosforados empregados como agentes de guerra estão entre as substâncias químicas mais tóxicas conhecidas. Essa toxicidade é devida à sua capacidade de se ligar à acetilcolinesterase (AChE), podendo conduzir à uma inibição irreversível desta enzima, que resulta na síndrome colinérgica. Os tratamentos utilizados atualmente ainda apresentam limitações. Como alternativa, a comunidade médica e científica de diversas áreas, estão investigando enzimas como sequestradores naturais (bioscavengers) para uso em tratamentos profiláticos e terapêuticos, e neste quadro incluem-se as fosfotriesterases (PTEs). A fim de ampliar as estratégias de utilização da biorremediação, propôs-se avaliar o potencial das enzimas DFPase e OpdA em degradar agentes dos nervos. Estudos encontrados na literatura apontam ambas as enzimas com bom potencial de degradação. Com base no exposto e considerando a necessidade de pesquisas mais profundas, esse trabalho se apoiou na utilização de metodologias teóricas para investigar os modos de interação das enzimas com os OPs Tabun, Soman, Sarin e Ciclosarin, utilizando como base estudos experimentais para a validação da pesquisa. Cálculos de ancoramento molecular e QM/MM, principalmente, respaldam as análises, sendo suportados por ferramentas de quimiometria, AIM e Fermo, afim de garantir um suporte complementar. Nossos achados apontam resultados promissores para a degradação catalítica dos agentes neurotóxicos em estudo. Além disso, sugerem, com relação ao desempenho das duas enzimas, que a eficiência de degradação, depende fortemente da estrutura do agente OP e de sua estereoquímica. Dessa forma, acredita-se que a pesquisa trouxe contribuições significativas para uma compreensão mais profunda do processo de biodegradação de agentes nervosos de guerra por meio de enzimas, uma vez que dispõem de informações que podem contribuir para a modificação estrutural enzimática, visando biodegradações mais eficientes.

**Palavras-chave:** Organofosforados. Intoxicação. Fosfotriesterases. Bioremediação.

## GENERAL ABSTRACT

Organophosphate compounds used as war agents are among the most toxic chemicals. This toxicity is due to its ability to bind acetylcholinesterase (AChE), which can lead to an irreversible inhibition of this enzyme, which results in the cholinergic syndrome. Concepts today are inherent. As, the medical and scientific community of different areas, are investigating enzymes as natural sequestrants (bioscavengers) for use in prophylactic and therapeutic treatments, and in this picture they are included as phosphotriesterases (PTEs). In order to expand the use of bioremediation strategies, it was proposed to evaluate the potential of DFPase and OpdA enzymes to degrade nerve agents. Studies found in the literature indicate both enzymes with good degradation potential. Based on the above and considering the need for deeper research, this work was supported by the use of theoretical methodologies to investigate the modes of interaction of enzymes with OPs Tabun, Soman, Sarin and Ciclosarin, using as a basis experimental studies for the validation of search. Molecular anchoring and QM / MM calculations mainly support the analysis, accounting for chemometric tools, AIM and Fermo, in order to ensure complementary support. Our findings point to promising results for the catalytic degradation of the neurotoxic agents under study. Furthermore, success, regarding the performance of the two enzymes, is that the degradation efficiency strongly depends on the structure of the OP agent and its stereochemistry. Thus, it is believed that the research brought contributions to a deeper understanding of the process of biodegradation of war nervous agents through enzymes, since it provides information that can contribute to enzymatic structural modification, complement more efficient biodegradation.

**Keywords:** Organophosphates. Intoxication. Phosphodiesterases. Bioremediation.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1- Introdução e Referencial Teórico</b> .....	9
<b>1 Introdução</b> .....	10
<b>2 Referencial teórico</b> .....	11
2.1 Uso de substâncias tóxicas como armas químicas .....	11
2.2 Compostos organofosforados empregados como agentes químicos .....	12
2.3 Processo de inibição da acetilcolinesterase .....	15
2.4 Remediação de organofosforados .....	17
2.5 Enzimas fosfotriesterases e o processo de biorremediação .....	19
2.5.1 Enzima Diisopropil fluorofosfatase .....	20
2.5.2 Enzima degradante <i>Agrobacterium radiobacter</i> .....	24
2.6 Química computacional.....	29
2.6.1 Modelagem molecular.....	30
2.6.2 Ancoramento molecular .....	31
2.6.3 Quimiometria .....	33
2.6.3.1 Análise de Componentes Principais .....	34
2.6.4 Teoria do funcional de densidade.....	36
2.6.5 Métodos híbridos QM/MM .....	38
2.6.6 Orbital Molecular de Fronteira Efetivo para a reação .....	41
2.6.7 Teoria de átomos em moléculas de Bader.....	42
<b>3 Objetivos</b> .....	43
<b>4 Referências</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 2-Theoretical studies applied to the evaluation of the DFPase bioremediation potential against chemical warfare agents intoxication</b> .....	56
<b>CAPÍTULO 3-Development of technologies applied to the biodegradation of warfare nerve agents: theoretical evidence for asymmetric homogeneous catalysis</b> .....	83
<b>Conclusão</b> .....	108



## **CAPÍTULO 1**

### *Introdução e Referencial Teórico*

## 1 Introdução

Relatos encontrados na literatura revelam que substâncias químicas tóxicas são empregadas como agentes de guerra desde a antiguidade. Os agentes químicos usados com esta finalidade são classificados através do mecanismo de ação tóxica para o ser humano (COLASSO; AZEVEDO, 2011). Dentre os que compõem essas classes, os neurotóxicos, pertencem àqueles que têm sido utilizados pelos exércitos, como armas químicas, desde a Segunda Guerra Mundial (SMART, 1997). Embora a luta pelo banimento de seu uso seja antiga, atualmente, o assunto ganhou destaque mundial. Acontecimentos envolvendo a crise dos refugiados na Europa e os ataques do Estado Islâmico vêm alarmando a população mundial quanto ao uso de armas químicas. Este cenário preocupante indica que o desenvolvimento, a produção e o uso dessas armas representam uma ameaça real. Os diversos danos causados por estas substâncias e a facilidade de serem empregadas (ALCANTARA; VANIN, 1992) têm alertado a comunidade científica sobre a importância de estudos em busca de ferramentas de defesa.

Os agentes neurotóxicos, também denominados agentes dos nervos, são aqueles que causam algum tipo de dano ao sistema nervoso (MATOS, 2012). Em geral, são compostos organofosforados (OP) que apresentam afinidade por enzimas colinesterases, sendo neste caso, a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) responsável por sua toxicidade (CHAMBERS; LEVI, 1992). A ação dos neurotóxicos como inibidores da AChE interrompe a hidrólise da acetilcolina (ACh), podendo conduzir à uma inibição irreversível, que resulta na síndrome colinérgica (ORDENTLICH et al., 2004). As atuais estratégias existentes de desintoxicação de OP ainda são limitadas (PETRONILHO; VILLAR, 2014; WYMORE, 2014). Diante ao exposto e considerando o conhecimento estrutural destas substâncias, a catálise enzimática tem sido visada por pesquisadores como uma alternativa promissora.

Em geral, as áreas de pesquisa que conduzem esses estudos revelam que as fosfotriesterases apresentam potencial para degradar uma variedade de triésteres OP's, clivando as ligações P-O, P-F, P-CN e P-S com desempenho significativo (PEREZGASGA et al., 2012). Contudo, uma melhor compreensão acerca do mecanismo de hidrólise e a reatividade para o processo de biorremediação ainda é necessário. Visto que os métodos computacionais, utilizados para compreender as reações químicas regidas por enzimas que degradam OPs, são capazes de viabilizar a elucidação dos mecanismos de catálise enzimática, metodologias teóricas de ancoramento molecular e estudos QM/MM, principalmente, respaldam este estudo.

Motivado por pesquisas e estudos experimentais, que apresentam as enzimas DFPase e OpdA, capazes de degradar agentes de guerra química, altamente tóxicos (ELY, et al., 2010) e partindo ainda do conhecimento de que há muito para ser desvendado, é proposto neste trabalho, investigar o potencial delas em catalisar a hidrólise dos OP's Tabun, Soman, Ciclosarin e Sarin. É importante mencionar que a seleção dos OPs investigados para cada enzima, foi baseada em estudos experimentais, a fim de comparar e validar os resultados obtidos.

## **2 Referencial teórico**

### **2.1 Uso de substâncias tóxicas como armas químicas**

Há milhares de anos o uso de substâncias químicas, como artifício bélico, tem assinalado a história mundial. No entanto, a guerra química considerada moderna foi introduzida no século XIX, com o surgimento de bombas incendiárias de arsênio, que liberavam nuvens de fumaça tóxica em linhas inimigas (GOLISZEK, 2004). O termo “guerra química” é empregado para designar guerras que utilizam armas com efeitos químicos e poder de destruição, como gases tóxicos, ácidos, substâncias irritantes etc (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009). Os compostos empregados para esse fim se classificam em agentes neurotóxicos (Tabun, Sarin), agentes vesicantes (gás mostarda, levisita), agentes sanguíneos (cloreto de cianogênio, cianeto de hidrogênio) e agentes sufocantes (fosgênio, cloro), conforme atuam no organismo humano (COLASSO; AZEVEDO, 2011).

A descoberta de grande parte dessas substâncias, dentre as quais é possível mencionar cloro, cianeto de hidrogênio, fosgênio e dicloroetilsulfeto (conhecido como agente mostarda), ocorreu entre os séculos XVIII e XIX (SMART, 1997). No entanto, ainda que existam alguns casos isolados, elas foram aplicadas mais intensamente na Primeira Guerra Mundial. Utilizadas com o intuito de incapacitar os inimigos, sem a utilização de explosivos, essas substâncias também eram capazes de atingir uma área maior do que aquela que alcançariam os ataques de artilharia. Desta forma, causando efeitos desastrosos para os combatentes e civis (SMART, 1997; HILMAS et al. 2008).

A pesquisa e a produção de armas químicas foram impulsionadas com o surgimento dos compostos organofosforados, em 1936. Nesse ano, o alemão Gerhard Schrader, na tentativa de produzir um inseticida, com base em substâncias orgânicas e fósforo em sua composição, descobriu acidentalmente o Tabun e estabeleceu a fórmula geral dos OP's (ALCANTARA;

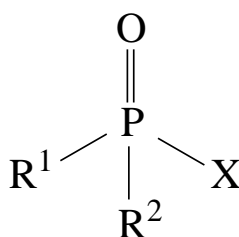
VANIN, 1992). Por apresentar elevada letalidade, mesmo em pequenas quantidades, passou a ser usado como arma química. Este composto que penetra pela pele e não necessita, necessariamente, de inalação para a contaminação, ficou conhecido como gás dos nervos, por causar sérios danos ao sistema nervoso (COLASSO; AZEVEDO, 2011; ALCANTARA; VANIN, 1992).

Para fins bélicos, o Tabun é quatro vezes mais eficiente do que o gás mostarda como gás de guerra. Por ser muito mais tóxico que o foscênio e somente ligeiramente perceptível aos sentidos humanos, seu potencial militar foi rapidamente reconhecido. Tanto o cloro quanto o foscênio foram abandonados como armas químicas devido à sua baixa toxicidade e odor característico, que alerta as vítimas sobre sua presença (ALCANTARA; VANIN, 1992). O mecanismo de ação dos organofosforados foi desvendado mais tarde, quando haviam sido descobertas outras substâncias com efeitos e estruturas semelhantes, que foram inseridas no grupo dos organofosforados, como o Sarin, em 1938, e o Soman, em 1944 (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009).

## 2.2 Compostos organofosforados empregados como agentes químicos

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 inúmeros compostos (Figura 1). As diferenças estruturais, como o tipo de heteroátomo ou grupo funcional ligado ao átomo de fósforo, são responsáveis pela diversidade destes compostos, e conseqüentemente por suas distintas atividades (SANTOS; DONNICI, 2007).

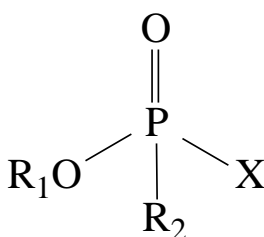
Figura 1 – Estrutura geral de organofosforados.



Fonte: Stoddart (1979).

Em geral, os OPs utilizados como armas químicas e também denominados neurotóxicos, 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. O emprego destes compostos, com este propósito, tem sido foco de atenção entre os pesquisadores, em função dos acontecimentos recentes e diante aos sérios danos que podem causar. Estes compostos são também empregados intensamente na agricultura, como inseticidas, herbicidas e reguladores do crescimento das plantas (LI et al., 2006; JAGA; DHARMANI, 2003). Vale mencionar que também existem importantes pesquisas direcionadas ao uso de OP’s com função terapêutica (LAMB; FAULDS, 1997; MORI et al., 1995), embora elas não sejam foco deste estudo.

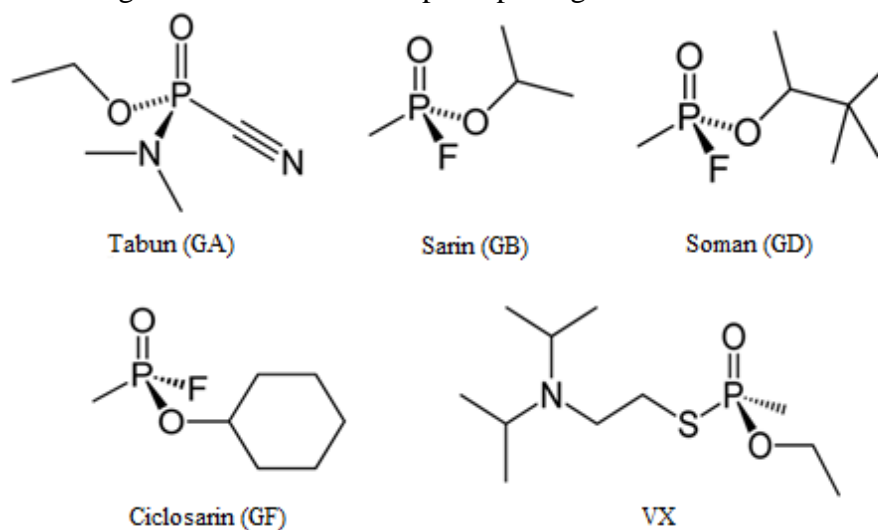
Figura 2 – Estrutura básica de neurotóxicos utilizados como armas químicas.



Fonte: Alvim et al. (2014).

Os primeiros neurotóxicos foram descobertos pelo químico alemão Gerhard Schrader, em uma tentativa de sintetizar inseticidas, com base em uma estrutura organofosforada (COLASSO; AZEVEDO, 2011). Esses compostos, então nomeados Tabun (etil N, N-dimetilfosforamidocianidato) e Sarin [2-(fluoro-metil-fosforil)oxipropano], tiveram seu uso como inseticida descartados, diante da elevada toxicidade que apresentavam (ALCANTARA; VANIN, 1992; SILVA et al., 2012). O Soman, conhecido por [2-(fluoro-metil-fosforil)oxi-3,3-dimetil-butano], foi sintetizado posteriormente, por Richard Kuhn (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009). A OTAN atribuiu os seguintes códigos de identificação a esses agentes químicos: GA, GB e GD, respectivamente (SILVA et al., 2012). Além deles, houve registros de outro agente neurotóxico, designado GF ou Ciclosarin [metil ciclohexafluorofosfonato], muito similar ao precursor Sarin. Na Inglaterra, no início da década de 50, uma nova classe de neurotóxicos descoberta, deu origem ao VX (código OTAN){S-[2-(diisopropilamino) etil]-O-etilmetilfosfonotioato}, identificado como o mais tóxico e persistente deles (SILVA et al., 2012; PETERSON et al., 2011).

Figura 3 – Estruturas dos principais agentes neurotóxicos.



Fonte: Silva et al. (2012).

Os agentes neurotóxicos mencionados acima possuem um átomo de fósforo quiral, que gera um par de isômeros óticos em proporções iguais. O Soman, por possuir também um carbono oticamente ativo no grupamento pinacolil, dá origem a mais um par de enantiômeros. Ainda que este composto disponha de dois estereocentros (BENSCHOP; DE JONG, 1988), é conhecido na literatura que o centro quiral dominante é o átomo de fósforo, visto que ele é quem determina a toxicidade potencial deste composto, sendo, portanto, geralmente utilizado para investigações teóricas e experimentais. (MELZER et al., 2009).

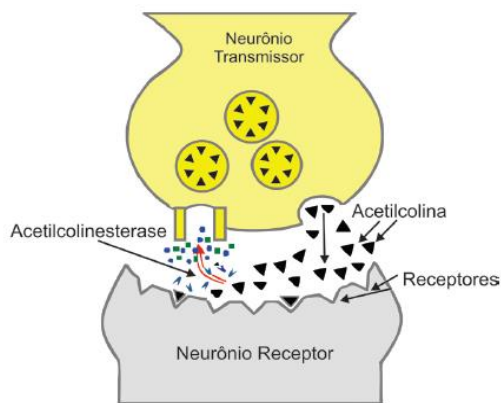
Em geral, estes agentes químicos são líquidos incolores à temperatura ambiente, empregados na forma de aerossol ou nuvens de vapor, dependendo de sua volatilidade (SILVA et al., 2012; ALCANTARA; VANIN, 1992; ALVIM et al., 2014). A série G, diante de sua moderada volatilidade, tem como sua principal rota de absorção a inalação, enquanto o VX, por ser menos volátil, é de caráter persistente e sua absorção ocorre através de permeação da pele como a principal rota (SIDEL; TAKAFUJI; FRANZ 1997).

O processo de intoxicação por neurotóxicos ocorre no sistema nervoso central e periférico (MATOS, 2012), onde eles atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE), enzima fundamental para o controle de transmissão de impulsos nervosos. O mecanismo de ação desses compostos é regido pela fosforilação de alguns grupos funcionais (PETRONILHO; VILLAR, 2014). Processo que ocorre principalmente em proteínas, comumente verificado em reações com serinas, como observado em enzimas colinesterases, como a AChE (KIBONG et al., 2011; PETRONILHO; VILLAR, 2014).

### 2.3 Processo de inibição da acetilcolinesterase

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.

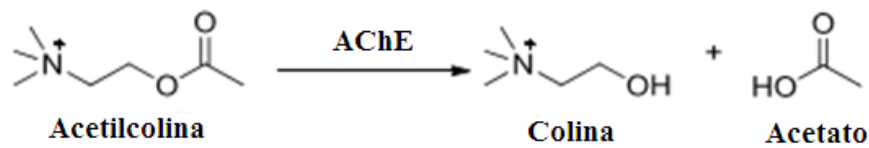
Figura 4 – Esquema do processo de transmissão de impulsos nervosos.



Fonte: Petronilho et al. (2011).

No entanto, o processo de interação da ACh com o receptor é temporariamente interrompido, quando a AChE promove a hidrólise da ACh, transformando-a em colina e acetato (Figura 5), a fim de impedir um excesso de transmissão nervosa. A colina liberada é reabsorvida pelo primeiro neurônio para ser reconvertida em ACh, permitindo assim a sua reutilização na transmissão de impulsos nervosos (PATRICK, 2001).

Figura 5 – Hidrólise da ACh pela AChE.



Fonte: Obregon (2006).

Devido à sua função, a AChE se tornou um dos alvos moleculares mais vulneráveis a agentes neurotóxicos, pesticidas e também a fármacos voltados para o tratamento de doenças como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987). Quando se trata de neurotóxicos, ocorre que, no sistema nervoso eles são capazes de formar conjugados de fósforo, ligados por covalência ao resíduo serina, interferindo no mecanismo catalítico da AChE, inibindo a enzima. A ausência da AChE impede a hidrólise da ACh e promove o acúmulo de sua concentração. Isso causa um excesso de impulso nervoso e uma série de sintomas que caracterizam uma crise colinérgica, podendo também levar à morte em poucos minutos, dependendo do grau de intoxicação (PETRONILHO; VILLAR, 2014; MATOS, 2012).

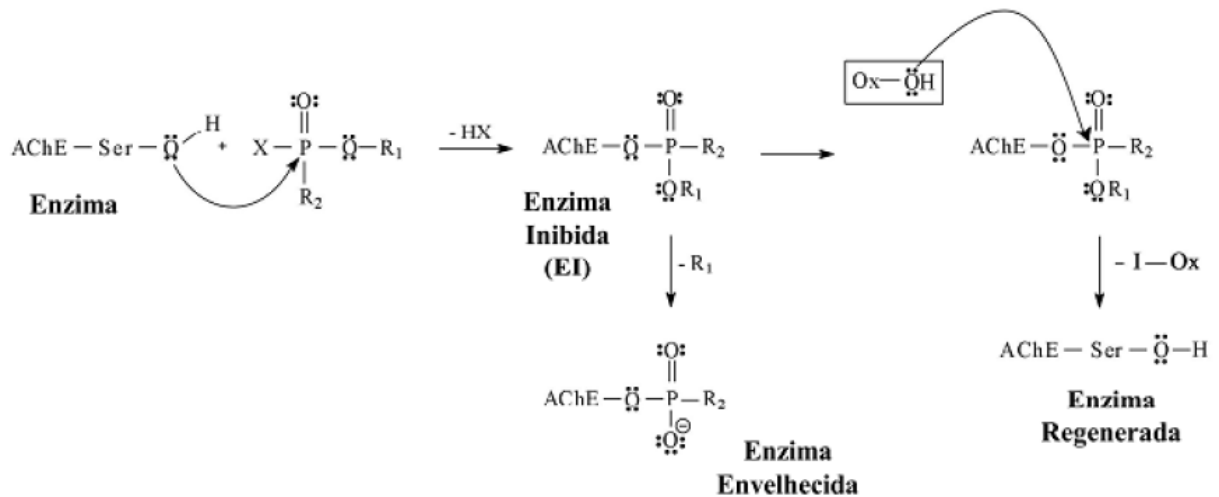
A inibição da AChE ocorre no interior do sítio ativo da enzima, no aminoácido serina, via interação com o OP. Esta ligação que acontece entre o átomo de fósforo do OP e o átomo de oxigênio da serina, com consequente desprendimento do grupo abandonador do OP, é apresentada na Figura 6 (ORDENTLICH et al., 2004). Após um período que varia de acordo com o agente neurotóxico, a enzima pode ser inibida num processo irreversível conhecido como envelhecimento, que é caracterizado pela desalquilação do composto (ALVIM et al., 2014). A reativação espontânea da enzima também pode ocorrer, porém em uma taxa praticamente insignificante (ALVIM et al., 2014).

Em geral, o recurso adotado contra a intoxicação por agentes neurotóxicos propõem o uso de atropina, diazepam e uma oxima. A atropina obstrui um tipo de receptor de acetilcolina, evitando assim sua acumulação, o diazepam controla as convulsões e a oxima consegue “regenerar” a enzima quando o processo de envelhecimento ainda não ocorreu (ZILKER, 2005; DICHTWALD; WEINBROUM, 2008). Nessa perspectiva, as oximas apresentam-se como nucleófilos capazes de retirar os neurotóxicos do sítio ativo da AChE por meio da desfosforilação da serina (MATOS, 2012). Processo que acelera, em várias ordens de grandeza, a reativação da enzima (MATOS, 2012; WOREK et al., 2005). Entretanto, considerando que



uma oxima possa ser eficiente contra um agente e inútil contra outro, esta estratégia ainda é limitada (MATOS, 2012). A figura 6 demonstra todos 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 et al. (2014).

Uma das deficiências das defesas contra armas químicas é a eficiência limitada dos antídotos disponíveis contra os agentes dos nervos e a não existência de um antídoto universal (RAMALHO et al., 2010; KASSA et al., 2007). Um tratamento almejado consiste no uso de substâncias capazes de conter os efeitos do OP absorvido (EDDELSTON et al., 2002). Dessa forma, a hidrólise de compostos organofosforados se tornou alvo de pesquisas recentes (MIRAMS, et al., 2008) e ainda enfrenta alguns desafios, sendo, portanto, o processo de remediação de organofosforados um importante foco de estudo.

## 2.4 Remediação de organofosforados

A estrutura química do OP está diretamente ligada a atividade e aplicação específicas de cada agente. A base para entender o nível de toxicidade de cada composto é estar totalmente familiarizado com sua estrutura. A natureza dos substituintes ligados ao átomo de fósforo e a suscetibilidade à hidrólise é um fator determinante para entender sua ação. Neste caso, a principal ação toxicológica associada aos OP em humanos é sua capacidade de inibir as enzimas esterases (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014).

A toxicidade é inerente ao composto e seu perigo refere-se ao risco de envenenamento quando o produto é usado. Desta forma, o risco associado com o composto depende não apenas de sua toxicidade, mas também da exposição ao produto como: via de absorção, dose e duração da exposição (DELFINO et al., 2009). Levando em conta, as diversas classes de OPs, as intoxicações podem ser: (1) agudas, quando se manifestam imediatamente após a absorção do composto em uma quantidade suficiente para induzir o efeito nocivo dos sintomas; ou (2) crônicas, quando se manifestam após um período prolongado de exposição ao composto. As intoxicações crônicas ocorrem principalmente em profissionais que trabalham no controle de pragas urbanas ou culturas agrícolas. Enquanto que as agudas, podem estar relacionadas ao uso destes compostos como armas químicas, onde a manifestação dos sintomas se apresenta de forma súbita, logo após a exposição ao agente, e geralmente a partir de dose única (PEREZGASGA et al., 2012).

Diante ao exposto, a busca por técnicas de remediação da intoxicação causada por compostos OP, empregados como armas químicas e pesticidas, tem despertado o interesse de pesquisadores. Embora o uso desses compostos seja restrito, eles ainda são considerados as mais poderosas armas em guerras químicas, e os pesticidas OP são responsáveis por centenas de milhares de intoxicações anualmente, resultando em um número de mortos extremamente alto (CASTRO, et al., 2017).

Algumas possibilidades, descritas em estudos anteriores, apontam a utilização de oximas no processo de reativação da AChE. Entretanto, a ineficácia desses sistemas sobre todos os OP existentes, causaram a busca por estratégias alternativas que sejam mais eficientes (DOMINGOS et al., 2003). Assim, o emprego de enzimas degradantes (biorremediação), mostraram-se altamente promissor (CASTRO et al., 2017). Os avanços em biotecnologia estrutural têm permitido o desenvolvimento de novas aplicações para enzimas em vários campos, neste caso, destaca-se a remediação biológica (SCHENK et al., 2016). Em geral, as enzimas podem adotar uma variedade de papéis no meio ambiente, como agentes (isolados, celulares ou imobilizados), catalisando a transformação e/ou a degradação de substâncias tóxicas (CHAGAS, 2018).

A compreensão de como cada antídoto funciona, em organismos, para o processo de reativação da AChE inibida é de suma importância. Uma vez que se conhece o papel de cada antídoto no organismo intoxicado, medidas estratégicas podem ser realizadas mais eficientemente. Para a biorremediação, é extremamente importante um entendimento mais

profundo sobre os meios de ação dessas enzimas, por exemplo, através do mecanismo de reação (CASTRO et al., 2017).

Neste contexto, o emprego de catalisadores capazes de efetuar rápida desintoxicação e biorremediação de agentes dos nervos, foram desenvolvidos, sendo o foco a avaliação da atividade catalítica de enzimas naturais e sintéticas, para clivagem da ligação P-O em OP (SCHENK et al., 2016; SALERNO et al., 2017; IYER et al., 2015). Quando um catalisador é utilizado em uma reação química, não se tem a intenção de modificar a reação global. Contudo, intermediários serão formados durante o processo e a interação catalisador-reagente deve diminuir a barreira cinética da reação. No caso da degradação de compostos OP, o possível catalisador deve ser capaz de ser seletivo e eficiente na quebra da ligação P-O, P-S, P-F e formar produtos não tóxicos (ALVIM, 2013).

Considerando essa alternativa um tanto quanto promissora, estudos e novas tecnologias têm sido desenvolvidos, com foco na utilização de enzimas fosfotriesterases (PTE) para a desintoxicação de OP, afim de aproveitar as excelentes velocidades de hidrólises desses catalisadores enzimáticos (CHAGAS, 2018). No entanto, considerando que suas atividades catalíticas e a determinação de seus mecanismos enzimáticos precisam ainda ser melhor estudados, é necessário, portanto, uma compreensão mais profunda do processo de hidrólise por PTE, que tragam novas ideias para os processos de biorremediação de OP.

## **2.5 Enzimas fosfotriesterases e o processo de biorremediação**

As fosfatases são enzimas importantes numa ampla variedade de processos bioquímicos que envolvem a hidrólise da ligação éster de fosfato. Elas podem ser divididas em três classes diferentes: mono-, di-, ou triesterases, sendo as últimas, denominadas fosfotriesterases, as responsáveis por clivar triésteres de fosfatos. Um grande número de fosfatases, que possuem íons metálicos em seus sítios ativos, são denominadas metalofosfatases ou metalofosfoesterases e podem ser di e trinucleares (GAHAN, et al., 2014, MITIC, et al., 2006, SCHENK, et al., 2012).

As fosfotriesterases são consideradas enzimas promíscuas, pois hidrolisam uma grande variedade de substratos. Esta promiscuidade catalítica é dependente do tipo de íon metálico presente no sítio ativo. O sítio pode ser heterodinuclear, formado por íons diferentes ou homodinuclear formado por íons iguais (ELY, et al., 2010). Todas as fosfotriesterases são hidrolases metal dependentes, isto é, existe a necessidade e requisito para possuírem metais

divalentes nos sítios ativos, que se ligam diretamente ao substrato para favorecer o processo de catálise. Porém, para o mecanismo enzimático, o papel de cada metal no sítio ativo destas enzimas apresenta questões em debate e abertas na literatura (CHAGAS, 2018).

Além disso, há uma busca pela otimização de sistemas enzimáticos, com atividade catalítica melhorada (SHIM, 1998). Neste caso, com as PTEs isto é altamente desejado, tendo em vista que os avanços em biotecnologia estrutural têm permitido o desenvolvimento de novas aplicações para essas enzimas no campo da remediação biológica.

Considerando a biorremediação, uma técnica possível de descontaminação, e o potencial das fosfotriesterases em degradar OP utilizados como armas químicas, as enzimas DFPase e OpdA, aparecem como opções promissoras e serão investigadas nesse trabalho.

### 2.5.1 Enzima Diisopropil fluorofosfatase

A Diisopropil fluorofosfatase (DFPase) de *Loligo vulgaris* é uma fosfotriesterase, dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que possui 314 aminoácidos e adota uma estrutura de dobra de seis lâminas em  $\beta$ -hélice. Cada lâmina consiste em quatro folhas  $\beta$  antiparalelas torcidas, que forma um túnel de água central com dois íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+} - 1$ ) localizado na parte inferior do sítio ativo é necessário para a atividade catalítica. Por sua vez, o  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+} - 2$ ), situado no centro do túnel de água, está relacionado com a integridade estrutural da enzima (Figura 7 – a). Por apresentar estabilidade térmica e elevada tolerância a solventes orgânicos seu uso para desintoxicação enzimática parece ser promissor (WYMORE et al., 2014; CHEN et al., 2010; KATSEMI et al., 2005; ELIAS et al., 2013).

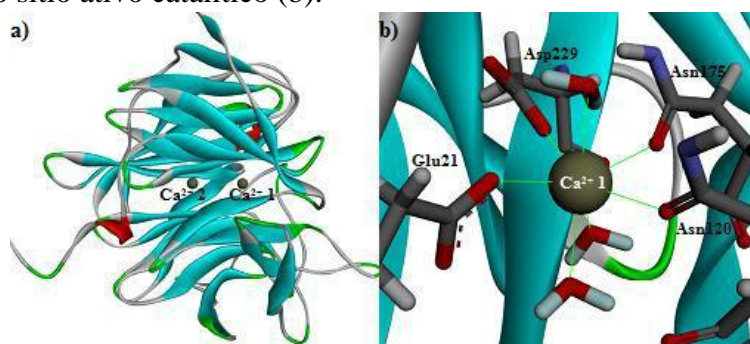
Um dos primeiros trabalhos sobre esta enzima foi publicado em 1966, onde uma inesperada atividade de hidrólise, frente ao fluorofosfato de diisopropilo (DFP), foi encontrada no axoplasma do axônio de lula gigante (HOSKIN et al., 1966). A partir de então, vários estudos sobre a DFPase nativa e atividade de hidrólise foram realizados (HOSKIN; LONG, 1972; GAY; HOSKIN, 1979; HOSKIN et al., 1984; HARTLEIB; RÜTERJANS, 2001A; HARTLEIB et al., 2001; HARTLEIB; RÜTERJANS, 2001B; SCHARFF et al., 2001; BLUM et al., 2006). No entanto, a sua função nativa permanece incerta (WYMORE et al., 2014).

Trabalhos anteriores apontam a enzima como um potente biocatalisador para a hidrólise de uma série de compostos organofosforados altamente tóxicos, incluindo os agentes dos nervos Tabun, Sarin, Soman e Ciclosarin (MELZER et al., 2009). Em contraste com o substrato DFP, esses neurotóxicos possuem um átomo de fósforo assimétrico, que leva a pares de enantiômeros

que exibem toxicidades diferentes (MELZER et al., 2009). Neste caso, foi relatado (MELZER et al., 2009) que a DFPase é estereosseletiva para o estereoisômero menos tóxico dos agentes dos nervos tipo-G, normalmente o enantiômero (R).

Segundo SCHARF et al. (2001), o sítio ativo da enzima contém o  $\text{Ca}^{2+}$  catalítico coordenado a sete ligantes, três moléculas de água e a cadeia lateral de Glu21, Asn120, Asn175, Asp229, como demonstrado na Figura 7 – b. Além disso, alguns trabalhos demonstram que o íon cálcio pode ser substituído por outros íons metálicos divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) sem perdas significativas na atividade catalítica (WYMORE et al., 2014; CHEN et al., 2010; ELIAS et al., 2013; KOEPKE et al., 2003).

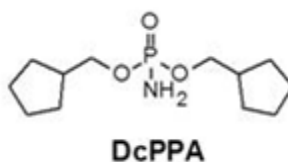
Figura 7 – Diagrama de fita para a estrutura da enzima DFPase de *Loligo vulgaris* (a), com ênfase no sítio ativo catalítico (b).



Fonte: Ramalho et al. (2016).

A fim de investigar o mecanismo de hidrólise para DFPase, BLUM et al. (2006), realizaram estudos teóricos/experimentais. Eles descrevem rotas de síntese de substratos da enzima, sendo a sua estrutura cristalina, juntamente com o substrato de ligação mais forte (DcPPA) relatada (PDB: 2GVV) (Figura 8) em conjunto com a caracterização do seu modo de ligação por meio de uma combinação de RMN, cinética e técnicas computacionais.

Figura 8 – Substrato diciclopropil-phosphoramidate (DcPPA) da DFPase sintetizado.



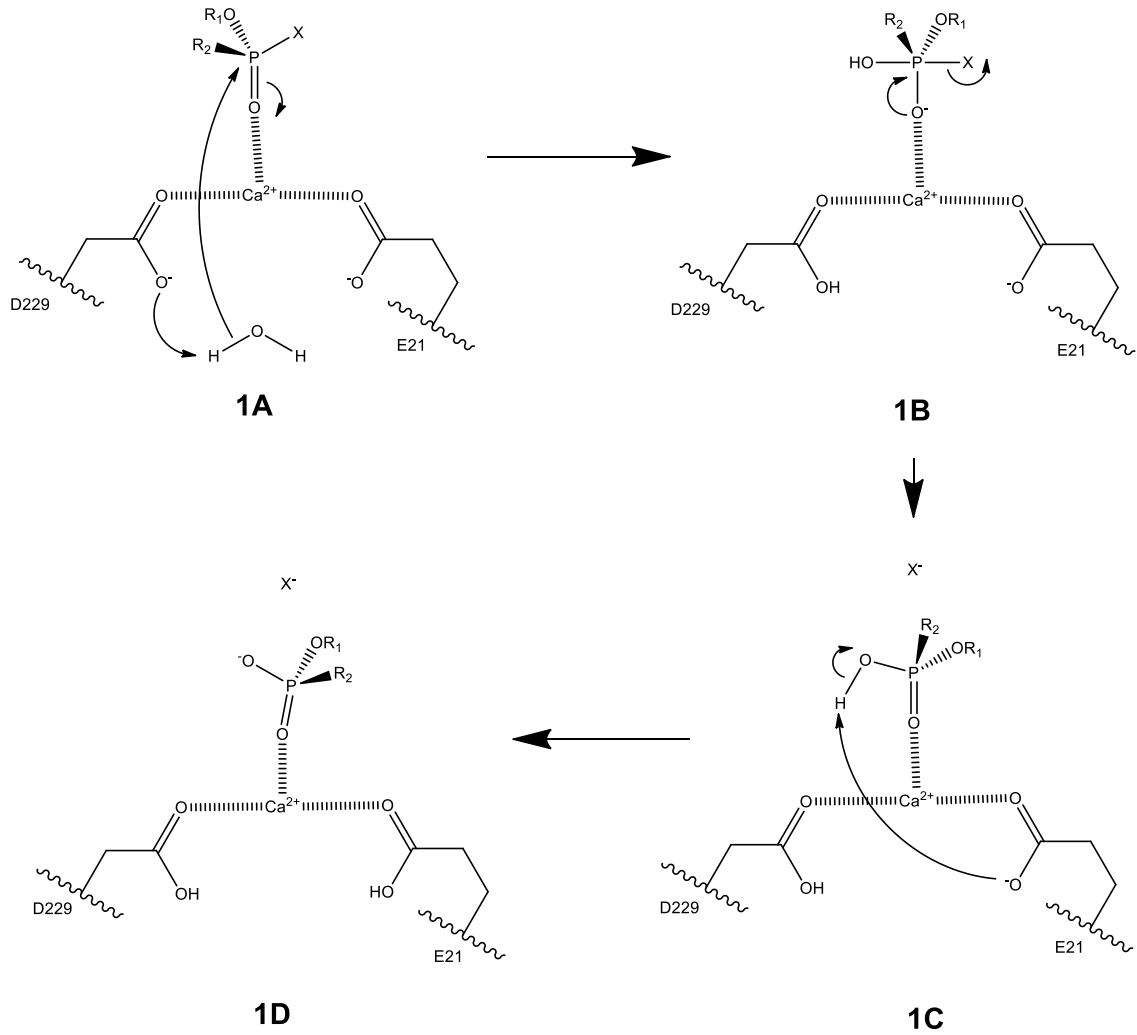
Fonte: Blum et al. (2006).

Este e outros estudos sugerem um papel essencial do resíduo Asp229 na atividade catalítica da DFPase, uma vez que tem a orientação correta para realizar um ataque nucleofílico no mecanismo de hidrólise por meio da substituição nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), e também é

coordenado com o íon de  $\text{Ca}^{2+}$ , juntamente com outros resíduos e moléculas de água (BLUM et al., 2006; MELZER et al., 2009; XU et al., 2016; WYMORE et al., 2014). Um possível caminho para a catálise é que o Asp229 atue como um nucleófilo, atacando o OP coordenado ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Em outra via de reação para DFPase, na qual o substrato OP é novamente coordenado ao íon catalítico  $\text{Ca}^{2+}$  via oxigênio fosforilado, uma molécula de água é ativada através de Asp229 (por abstração de prótons) e então o íon hidroxila age como um nucleófilo no centro fosfórico. O Glu21 participa dessas transferências de prótons. O grupo de saída é liberado e o substrato hidrolisado é removido do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na forma ionizada como produto de reação (BLUM et al., 2006; MELZER et al., 2009; XU et al., 2016; WYMORE et al., 2014). Versões simplificadas de ambos os mecanismos propostos estão representadas nas Figuras 9 e 10.

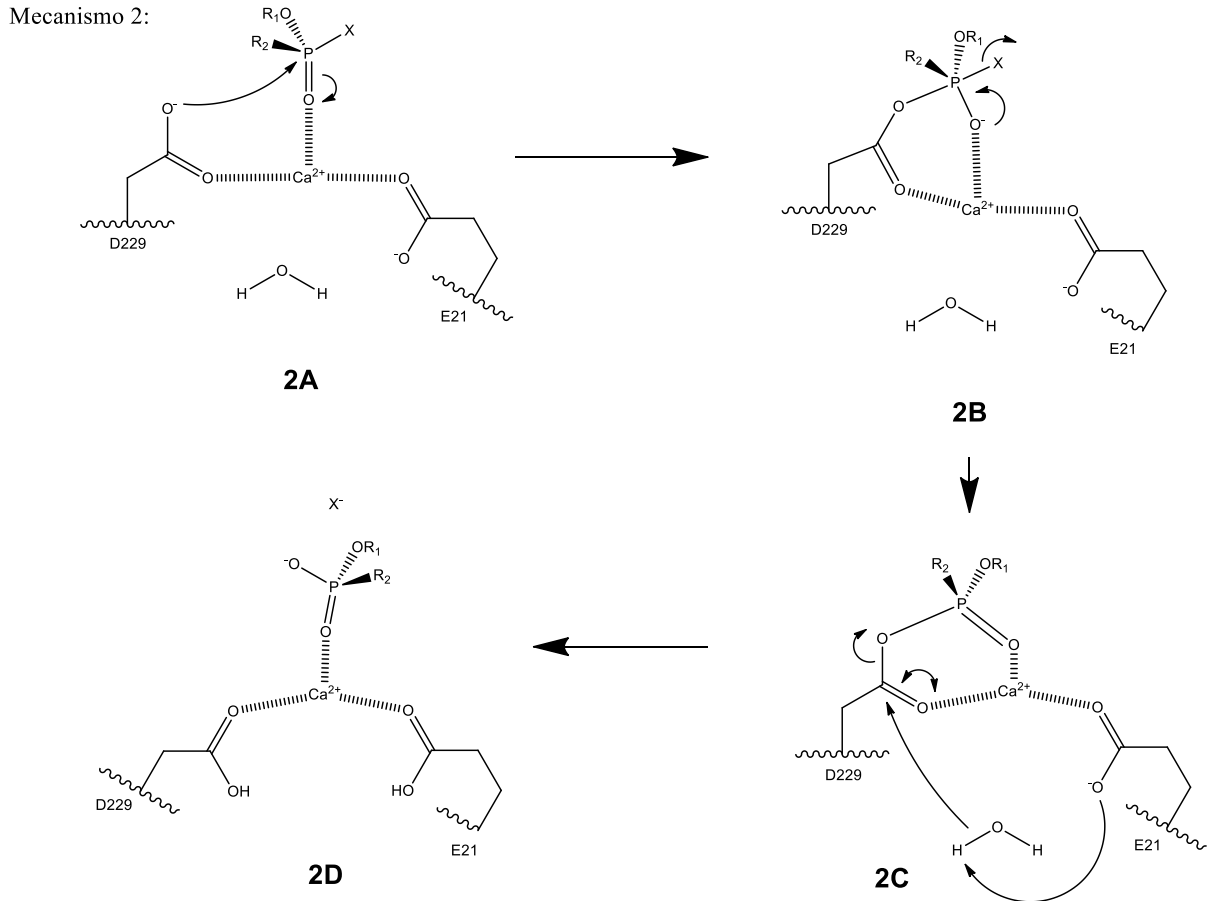
Figura 9 – Mecanismo proposto para degradação de OP's pela DFPase através de uma molécula de água ativada pelo Asp229 (BLUM, et al., 2006; MELZER, et al., 2009; XU, et al., 2016).

Mecanismo 1:



Fonte: Do autor.

Figura 10 – Mecanismo proposto para degradação de OP's pela DFPase por ataque nucleofílico direto do Asp229 (BLUM, et al., 2006; MELZER, et al., 2009; XU, et al., 2016).



Fonte: Do autor.

Uma vez que a toxicidade da maioria dos agentes dos nervos OP é dependente da estereoquímica no centro fosfórico, a compreensão aprofundada das propriedades catalíticas da enzima é de grande interesse (BENSCHOP; JONG, 1988).

### 2.5.2 Enzima degradante *Agrobacterium radiobacter*

A fosfotriesterase de *Agrobacterium radiobacter* (OpdA), (ELY, et al., 2010), apresenta grande especificidade de substrato, sendo capaz de quebrar ligações características de agentes organofosforados, como P-O, P-CN e P-F. Possui uma atividade catalítica elevada ( $k_{cat}$  de  $\sim 3000s^{-1}$ ) (GAO et al., 2014), sendo, portanto, uma boa alternativa para aplicações de biorremediação em OP (GHANEM; RAUSHEL, 2005).

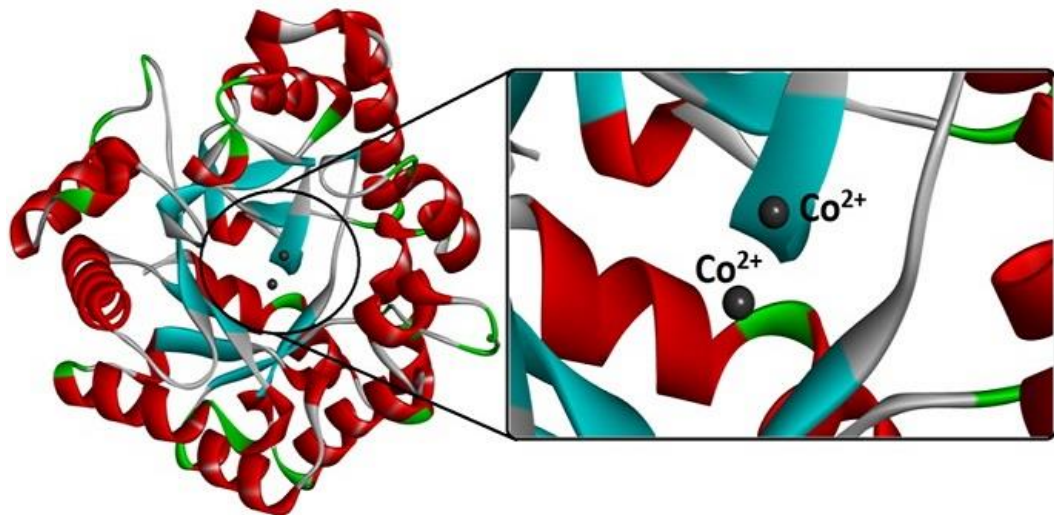


A OpdA faz parte de uma classificação de enzimas com um centro de metal binuclear. Ela requer dois íons metálicos em sítios  $\alpha$  e  $\beta$  para o processo de reação hidrolítica (JACQUET et al., 2016; SCHENK et al., 2012). Diversas técnicas estruturais foram empregadas a fim de compreender os mecanismos químicos da hidrólise de OP catalisada por OpdA. Depois de muitas pesquisas, os cientistas descobriram que a eficiência da hidrólise depende, principalmente, do íon metálico presente na enzima, o pH do ambiente e o substrato (ELY et al., 2011). O que corrobora com os estudos encontrados na literatura que apontam que o íon  $\text{Co}^{2+}$  (SCHENK et al., 2012), representa uma característica iônica crucial para sua eficiência.

Além disso, estudos estruturais demonstram que os dois íons metálicos coordenados à enzima, interagem com um resíduo de lisina carboxilada (Lys169) e um íon hidróxido ou molécula de água (ELY et al., 2010; JACKSON et al., 2005).

O sítio ativo da OpdA (demonstrado na Figura 11), é composto por um sítio  $\alpha$ , pentacoordenado, ligado a duas histidinas e um aspartato. Enquanto o  $\beta$ , hexacoordenado, completa suas ligações com duas moléculas de água e duas histidinas. Os dois sítios se conectam através de uma ponte hidroxilo e outra carboxilato da lisina (GAHAN, et al., 2014).

Figura 11 – a) Estrutura cristalina de OpdA de *Agrobacterium radiobacter* b) Representação do seu sítio ativo. (PDB 2D2G)  $\alpha=\beta= \text{Co}^{2+}$ . (GAHAN, et al., 2014).



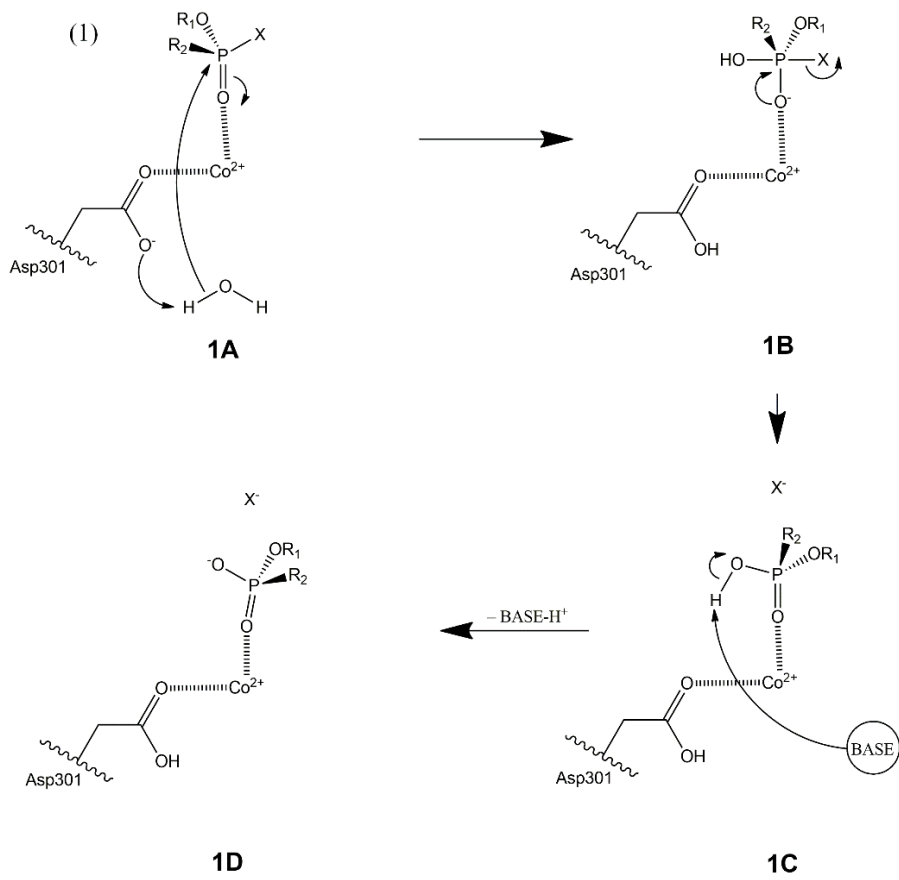
Fonte: Do autor.

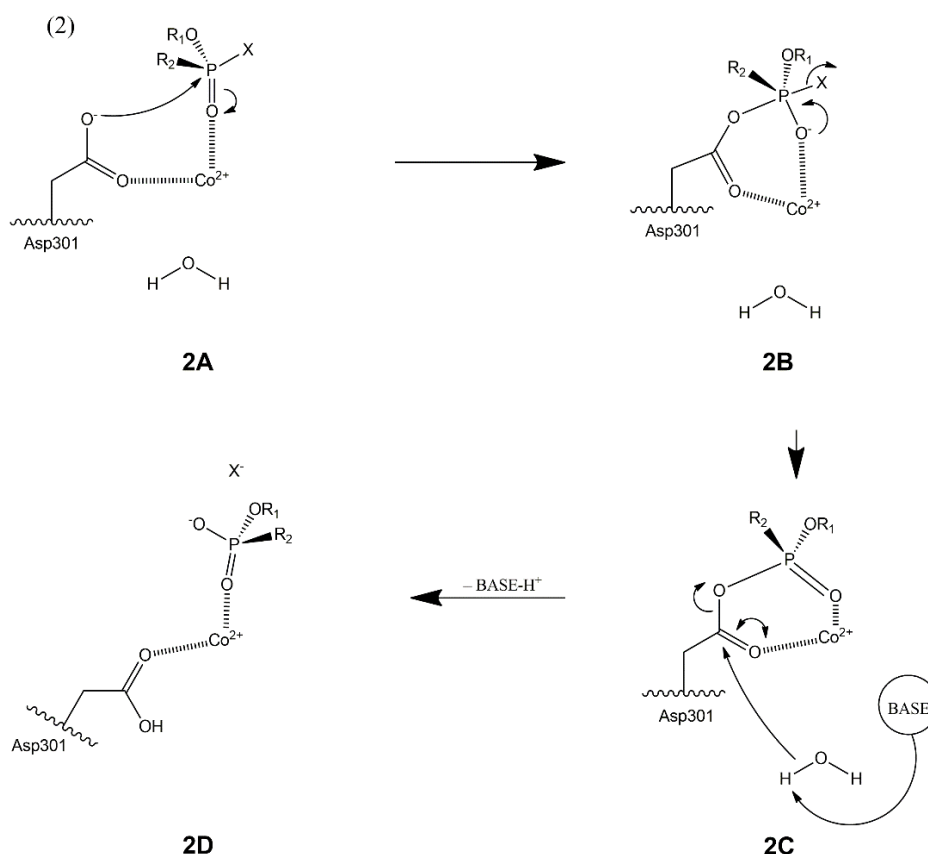
Estudos de homologia mostram que a enzima OpdA compartilha 90% da identidade da enzima degradante de *Pseudomonas diminuta* (OPH). Dentre as distinções existentes entre elas, talvez a mais importante, seja a diferença entre os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo, onde observa-se: Arg254 / His254, Tyr257 / His257 e Phe272 / Leu272, respectivamente

em OpdA /OPH (PEDROSO et al., 2014). Neste contexto, dois (Arg254 e Tyr257), desses três resíduos, que são encontrados nas proximidades do sítio ativo da OpdA, têm um papel importante na modulação da reação catalisada devido a uma rede complexa de ligações de hidrogênio (CASTRO, 2017).

São conhecidas duas rotas possíveis para a hidrólise de compostos OP pela enzima OpdA, como demonstrado na Figura 12 (JACKSON et al., 2005; ELY et al., 2011). O primeiro mecanismo consiste na ativação de uma molécula de água pelo resíduo de aminoácido Asp301, onde um átomo de hidrogênio é abstraído formando um íon hidróxido, coordenado ao íon metálico, que posteriormente ataca o centro fosfórico do agente dos nervos (Mecanismo 1). Na segunda rota possível, o Asp301 ataca diretamente o átomo de fósforo central, promovendo a expulsão do grupo de saída, clivando assim o composto (Mecanismo 2). Ambos os mecanismos procedem via substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) (RAMALHO et al., 2016).

Figura 12 – Esquemas dos Mecanismos 1 e 2 na degradação de agentes neurotóxicos (JACKSON et al., 2005; ELY et al., 2011).





O conhecimento sobre o número de interação dos resíduos em torno do substrato é essencial para explorar como ocorre o mecanismo de hidrólise (CASTRO et al., 2017). Os métodos teóricos fornecem possibilidades eficientes para investigar a atividade enzimática, com informações detalhadas sobre os processos centrais de catálise (VAN DER KAMP, MULHOLLAND, 2013).

Neste contexto, 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's (NEMUKHIN et al., 2012). Além disso, a aplicação desses métodos 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). Várias abordagens teóricas podem ser empregues para investigar as interações moleculares entre pequenas moléculas e enzimas (RAMALHO et al., 2016).

## 2.6 Química computacional

A aplicação integrada de conhecimentos multidisciplinares, no estudo de problemas de interesse biológico, fornece estratégias modernas capazes de viabilizar a descoberta de ferramentas cada vez mais eficientes, seletivas e de uso seguro (BARREIRO; RODRIGUES, 1997). 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 teóricos 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 custos, torna a química computacional uma das áreas mais promissoras deste século (RAUPP; SERRANO; MARTINS, 2008). Essa área, que se baseia nos princípios da ciência da computação para resolver problemas químicos, utiliza os resultados da química teórica, incorporados em programas de computador, para calcular estruturas e propriedades das moléculas. Ao mesmo tempo que seus resultados normalmente complementam a informação obtida a partir de experimentos químicos, eles podem, em alguns casos, prever fenômenos químicos não observados inicialmente (SMITH; SUTCLIFFE, 1997). Nessa perspectiva, é possível reconhecer o quão importante é a evolução da química teórica para análises investigativas.

Basicamente compreendida em quântica (métodos *ab initio*, semi-empírico, funcional de densidade, ...) e clássica (mecânica dinâmica - determinístico e monte carlo - estocástico; ...) a química teórica tem se tornado bastante popular, o que pode ser comprovado pelo aumento significativo de trabalhos nesta área. Além disso, pode atuar como ferramenta de apoio na análise e interpretação de dados experimentais, resultando em publicações que são fruto da colaboração entre pesquisadores teóricos e experimentais (MORGON, 2001).

Em nenhuma outra área, o conhecimento da estrutura molecular é tão essencial quanto na química, o que a nível experimental, não é tarefa simples. Visto que não são muitos os métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação (BARREIRO; RODRIGUES, 1997). Assim, a modelagem molecular - conjunto de ferramentas direcionadas à sistemas moleculares complexos (COHEN et al., 1990; COHEN et al., 1988) - por intermédio de métodos computacionais surgiu como uma alternativa, especialmente após o desenvolvimento de

programas capazes de calcular a estrutura com um compromisso adequado entre velocidade e precisão, somados aos recursos da computação gráfica e à diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho, capazes de operar estes programas e recursos (LIPKOWITZ; BOYD, 1990).

### **2.6.1 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). Isso é possível através da geração, manipulação e/ou representação realista dessas estruturas (SILVA et al., 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).

### **2.6.2 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,

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

$E_{inter}$  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  $\text{kcal mol}^{-1}$  (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

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

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

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, em que  $\theta$  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.

### 2.6.3 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).

### **2.6.3.1 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 pode 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).

### 2.6.4 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; KOHN, 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  $\rho$  ou a partir de  $\psi$ . 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  $\Psi_i(\mathbf{1})$ ,  $i=1, 2, \dots, n$  são os orbitais Kohn-Sham, e  $E_{xc}[\rho]$  é a energia de troca e correlação. Kohn e Sham também mostraram que “ $\rho$ ” exato para o estado fundamental pode ser determinado pelos orbitais  $\Psi_i$  (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  $\rho$  é a densidade exata e  $\rho'$  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):

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

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

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

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  $\int \rho' dr = N$ , 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).

### 2.6.5 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;

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:

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

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 de QM/MM sequencial (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).



### 2.6.6 Orbital Molecular de Fronteira Efetivo para a reação

É sabido que os métodos computacionais fornecem possibilidades para investigar a atividade enzimática, com informações detalhadas sobre os processos centrais de catálise. Neste contexto, entender o porquê das reações seguirem um caminho ou outro possibilita um maior planejamento e controle dos fenômenos em um nível mais fundamental. Levando em conta que as reações químicas são governadas por elétrons, os orbitais moleculares são importantes descritores para a reatividade dos compostos (PEREIRA et al., 2016).

Entretanto, o estudo dos orbitais moleculares ainda representa um grande desafio para os químicos. Neste sentido, os pesquisadores voltam suas atenções para eles, na tentativa de entender melhor as reações químicas (FUKUI et al., 1952; FUKUI et al., 1954; FUKUI, 1982). O conceito de orbital de fronteira introduzido por Fukui, refere-se ao uso da densidade eletrônica dos orbitais de fronteira, HOMO (Orbital Molecular Ocupado de maior energia) e LUMO (Orbital Molecular desocupado de menor energia), para prever a posição mais reativa sobre espécies químicas. No entanto, essa abordagem tem algumas limitações. Na tentativa de determinar corretamente o orbital molecular de fronteira que regula reações químicas, DA SILVA e RAMALHO, propõem o estudo do Orbital Molecular de Fronteira Efetivo para a reação (FERMO) como uma metodologia complementar ao argumento HOMO-LUMO.

Sabe-se que a compreensão sobre os processos que envolvem a quebra e formação de novas ligações químicas é fundamental para a racionalizar mecanismos de reação. Neste contexto, essa nova metodologia pode fornecer possibilidades para melhor compreender os aspectos mecanicistas que governam a reatividade química de moléculas (PEREIRA et al., 2016).

Segundo DA SILVA et al., a energia do FERMO é um importante descritor a ser levado em consideração em estudos quantitativos da relação estrutura-atividade, uma vez que utiliza cálculos baseados na Teoria dos Orbitais Moleculares (TOM), porém interpreta esses dados com a Teoria da Ligação de Valência (TLV) (DA SILVA et al., 2006; DA SILVA, RAMALHO, SANTOS, 2006; DA SILVA, 2006) que é bastante útil para analisar a reatividade de enzimática (NAKAMURA, TRUHLAR, 2001; TRUHLAR, 2007).

FERMO é intuitivo e se baseia em cálculos simples, surgindo como uma poderosa ferramenta que procura descrever a quebra ou a formação de ligações químicas. Apresenta um conceito inovador, recentemente identificado como bastante promissor no estudo da

importância dos orbitais moleculares para a reatividade química, e vem sendo aplicado com grande sucesso no estudo de sistemas biológicos (PEREIRA et al., 2016).

### 2.6.7 Teoria de átomos em moléculas de Bader

Na mecânica quântica, o átomo de hidrogênio é descrito matematicamente a partir de sua função de onda  $\psi$  (SZABO E OSTLUND, 1996). Contudo, sistemas moleculares multieletrônicos não têm solução exata. As várias teorias *ab initio* e do funcional da densidade existentes resolvem o sistema multieletrônico de forma diferenciada. Cada método tem um nível de precisão específico, que depende das considerações matemáticas utilizadas. Porém, para todos estes métodos, a solução da função de onda, para o sistema molecular, compreende uma matriz de densidade eletrônica e uma configuração nuclear otimizada. Nenhum destes métodos descreve as propriedades de uma função de onda molecular a partir de subsistemas atômicos (BADER, R. F. W., 1994)

Bader (BADER, R. F. W., 1994), a partir do princípio da ação (SCHWINGER, 1951), propôs uma teoria em que um sistema molecular poderia ser estudado a partir das derivadas da sua densidade eletrônica ( $\nabla\rho$  e  $\nabla^2\rho$ ). Ela é chamada de teoria de átomos em moléculas (AIM). No AIM, uma determinada propriedade molecular é igual ao somatório das propriedades atômicas de seus átomos constituintes. A teoria de átomos em moléculas de Bader (BADER, R. F. W., 1994) define subsistemas atômicos dentro de um sistema molecular a partir de sua matriz de densidade. Essa matriz é calculada por um dos métodos mencionados acima.

O AIM utiliza a matriz de densidade calculada por um método *ab initio* ou de densidade funcional, ou mesmo experimental, como ponto de partida. Essa matriz de densidade é recalculada pelo método AIM dividindo o sistema molecular em subsistemas atômicos dos átomos constituintes da molécula em questão (SREBRENİK et al., 1975; BADER, SREBRENİK et al., 1978). A matriz de densidade eletrônica de um determinado sistema molecular, utilizada como ponto de partida para o cálculo AIM, deve ter um considerável nível de precisão. Portanto, pressupõe-se que a função de base seja a mais completa possível e que o método utilizado tenha o menor erro de correlação eletrônica possível. A teoria de átomos em moléculas de Bader é baseada no subsistema quântico em termos de uma propriedade do vetor gradiente da densidade de carga ( $\nabla\rho$ ). Na teoria de átomos em molécula é possível definir todas as propriedades médias de um átomo. A definição destas propriedades moleculares é reduzida às definições quanto-mecânicas das propriedades correspondentes para um átomo isolado. Os

valores atômicos de uma dada propriedade, quando somados sobre todos os átomos da molécula, dão a propriedade média para a molécula (WIBERG, BADER et al., 1987a).

A teoria de átomos em moléculas representa um novo modo de visualizar os sistemas moleculares e suas características intrínsecas (FIRME, 2007). Além disso, se baseia em uma grandeza observável experimentalmente: a densidade eletrônica, a qual inúmeras propriedades físicas e químicas de um sistema molecular, estão relacionadas direta ou indiretamente. De fato, essa teoria mostra que é possível representar as propriedades de um sistema molecular a partir do somatório das propriedades atômicas. E por fim, apresenta um rico conjunto de informações relativas à densidade eletrônica, que contribuem sobremaneira para o melhor entendimento da natureza eletrônica dos sistemas moleculares e suas propriedades físicas e químicas (FIRME, 2007).

### **3 Objetivos**

A tese tem como objetivo principal utilizar metodologias teóricas para investigar o potencial de duas enzimas fosfotriesterases (PTEs) em degradar compostos organofosforados (OPs) empregados como armas químicas. E, por meio desse estudo, obter uma compreensão mais profunda sobre o mecanismo de hidrólise enzimática por PTEs, a fim de otimizar o processo de biorremediação de OPs.

Objetivos específicos:

1) Realizar estudos de docking molecular, apoiados por análises quimiométricas, juntamente com cálculos quanto mecânicos/mecânica molecular (QM/MM) para investigar a degradação dos OP Tabun, Soman e Ciclosarin pro meio da enzima DFPase.

2) Investigar os aspectos estruturais e eletrônicos que governam os modos de interação dos OP Tabun, Soman e Sarin no sítio ativo da enzima OpdA, a partir da análise de ligações químicas (AIM) e orbitais (FERMO) e, posterior previsão da reação de hidrólise, por meio de técnicas de docking e QM/MM.

## REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, M. R.; VANIN, J. A. Armas Químicas. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 62, 1992.
- ALVIM, R. S. Hidrólise de um composto organofosforado tipo-VX pela quimiossorção dissociativa na superfície de MgO(001), por cálculos *ab initio*. **Tese** (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013.
- 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**, v. 6, n. 3, p. 687-723, 2014.
- BADER, R. F. W., P. L. A. Popelier, et al. Theoretical Definition of a Functional-Group and the Molecular-Orbital Paradigm. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 33, n. 6, p. 620-631, Mar 1994.
- BADER, R. F. W., S. SREBRENİK, et al. Subspace quantum dynamics and the quantum action principle. **The Journal of Chemical Physics**, v. 68, n. 8, p. 3680-3691, 1978.
- BAKOWIES, D.; THIEL, W. Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 25, p. 10580-10594, 1996.
- BALALI-MOOD, M.; ABDOLLAHI, M. Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds. **London: Springer International Publishing**, p. 257. cap 3, 2014.
- 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.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 300-310, Jun 1997.
- BARROS 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.
- BENSCHOP, H. P.; DE JONG, L. P. A.; **Acc. Chem. Res.**, v. 21, n. 10, p. 368, 1988.
- BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1834, n. 1, p. 443-453, Jan. 2013.
- BLACK, R. M.; HARRISON, J. M. Em *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*; Hartley, F. R., ed.; John Wiley & Sons: **Chichester**, 1996.

- BLUM, M. M.; LÖHR, F.; RICHARDT, A.; RUTERJANS, H.; CHEN, J. C. H. Binding of a Designed Substrate Analogue to Diisopropyl Fluorophosphatase: Implications for the Phosphotriesterase Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 39, p. 12750–12757, 2006.
- BORMAN, S.A. Much to do about enzyme mechanism. **Chem. Eng. News**, v. 82, n. 8, p. 35-39, Aug. 2004.
- BRAUN-SAND, S.; OLSSON, M. H. M.; WARSHEL, A. Computer Modeling of Enzyme Catalysis and Its Relationship to Concepts in Physical Organic Chemistry. In advances in physical organic chemistry. 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., p. 187, 2003.
- 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, n. 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.
- CASTRO, A. A.; PRANDI, I. G.; KUKA, K. RAMALHO, T. C. Organophosphorus degrading enzymes: Molecular basis and perspectives for enzymatic bioremediation of agrochemicals. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 5, p. 471-482, 2017.
- CHAMBERS, J. E.; LEVI, P. E. Organophosphates chemistry, fate, and effects, New York: **Academic Press**, p. 440, 1992.
- CHEN, J. C. H.; MUSTYAKIMOV, M.; SCHOENBORN, B. P.; LANGAN, P.; BLUM, M. M. Neutron Structure and Mechanistic Studies of Diisopropyl Fluorophosphatase (DFPase). **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, v. 66, n. 11, p. 1131–1138, 2010.
- 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** v. 22, n. 3, 1999.
- COHEN, N. C. et al. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 33, n. 3, p. 883–894, Mar 1990.

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

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

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

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

DA SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M. Reply to "Comment on the paper 'On the Limits of Highest-Occupied Molecular Orbital driven reactions: The Frontier Effective-for-Reaction Molecular Orbital concept'" **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n.36, p. 10653, 2006.

DA SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. On the limits of HighestOccupied Molecular Orbital driven reactions: The Frontier Effective-for-Reaction Molecular Orbital concept. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n.3, p. 1031, 2006.

DA SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Concerning the FERMO concept and Pearson's hard and soft acid-base principle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 223-226, 2006.

DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D.; Compostos organofosforados como agentes químicos de guerra: uma revisão. **Revista da sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, v. 20. n. 3, p. 1-32, 2009.

DICHTWALD, S.; WEINBROUM, A. A. Bioterrorism and the anaesthesiologist's perspective. **Clinical Anaesthesiology**, v. 22, n. 3, p. 477, 2008.

DOMINGOS, J. B; LONGHINOTTI, E; MACHADO, V. G; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745, Out. 2003.

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

ELIAS, M.; LIEBSCHNER, D.; KOEPKE, J.; LECOMTE, C.; GUILLOT, B.; JELSCH, C.; CHABRIERE, E. Hydrogen Atoms in Protein Structures: High-Resolution X-Ray Diffraction Structure of the DFPase. **BMC Res. Notes**, v. 6, n. 308, p. 1–7, 2013.

ELY, F.; HADLER, K. S.; GAHAN, L. R.; GUDDAT, L. W.; OLLIS, D. L.; SCHENK, G. Ely, F., Hadler, K. S., Gahan, L. R., Guddat, L. W., Ollis, D. L., & Schenk, G. (2010). The

organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* displays mechanistic flexibility for catalysis. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 3, p. 565–573, 2010.

ELY, F.; HADLER, K. S.; MITIĆ, N.; GAHAN, L. R.; OLLIS, D. L.; PLUGIS, N. M.; RUSSO, M. T.; LARRABEE, J. A.; SCHENK, G. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 16, n. 5, p. 777–787, 2011.

ELY, F.; HADLER, K.S.; MITIĆ, N.; GAHAN, L.R.; OLLIS, D.L.; PLUGIS, N.M.; RUSSO, M.T.; LARRABEE, J.A.; SCHENK, G. Electronic and geometric structures of the organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA), **J. Biol. Inorg. Chem.** v. 16, n. 5, p. 777–787, 2011.

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.**, v. 118, n. 4, p. 976–988, 2015.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 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, n. 6, p. 700–733, 1990.

FIRME, C. L. Aplicações Da Teoria De Átomos Em Moléculas E Da Teoria do funcional da densidade Em Sistemas Moleculares Orgânicos. Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2007.

FUKUI, K. The role of frontier orbitals in chemical-reactions (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 21, n. 11, p 801, 1982.

FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; NAGATA, C.; SHINGU, H. Molecular orbital theory of orientation in aromatic, heteroaromatic, and other conjugated molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 22, n. 8, p. 1433, 1954.

FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; SHINGU, H. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. **The Journal of Chemical Physics**, v. 20, n. 4, p. 722, 1952.

GAHAN, L. R., DAUMANN, L. J., SCHENK, G., OLLIS, D. L. Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 910 – 928, 2014.

GAO, Y. et al. Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 54, n. 1, p. 38–44, 2014.

GAY, D. D.; HOSKIN, F. C. G. Stereospecificity and Active Site Requirements in a Diisopropylphosphorofluoridate-Hydrolyzing Enzyme. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, n. 7, p. 1259–1261, 1979.

CHAGAS, M. A. Dinâmica e mecanismo de ação de metaloenzimas envolvidas na hidrólise de compostos organofosforados. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química, 2018.

GHANEM, E.; RAUSHEL, F. M. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 459-470, 2005.

GOLISZEK, A. Cobaias Humanas: a história secreta do sofrimento provocado em nome da ciência. Rio de Janeiro: Ediouro, 2004.

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, n. 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**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2013.

HARTLEIB, J.; GESCHWINDNER, S.; SCHARFF, E. I.; RÜTERJANS, H. Role of Calcium Ions in the Structure and Function of the Di-Isopropylfluorophosphatase from *Loligo Vulgaris*. **Biochem. J.**, v. 353, n. 3, p. 579–589, 2001.

HARTLEIB, J.; RÜTERJANS, H. High-Yield Expression, Purification, and Characterization of the Recombinant Diisopropylfluorophosphatase from *Loligo Vulgaris*. **Protein Expr. Purif.**, v. 21, n. 1, p. 210–219, 2001B.

HARTLEIB, J.; RÜTERJANS, H. Insights into the Reaction Mechanism of the Diisopropyl Fluorophosphatase from *Loligo Vulgaris* by Means of Kinetic Studies, Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1546, n. 2, p. 312–324, 2001A.

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, n. 9, p. 2231-2241, 2007.

HILMAS, C.J.; SMART, J.K.; HILL, B. History of Chemical Warfare. In. TUORINSKY, S.D. **Medical Aspects of Chemical Warfare**, Washington, DC, Borden Institute, 2008. Chapter 2.



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

HOHENBERG, P.; KOHN, W.; Inhomogeneous Electron Gas. **Phys. Rev.**, v. 136, n. 3, B864, 1964.

HOSKIN, F. C. G.; KIRKISH, M. A.; STEINMANN, K. E. Two Enzymes for the Detoxication of Organophosphorus Compounds - Sources, Similarities, and Significance. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 4, n. 2, p. 165–172, 1984.

HOSKIN, F. C. G.; LONG, R. J. Purification of a DFP-Hydrolyzing Enzyme from Squid Head Ganglion. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 150, n. 2, p. 548–555, 1972.

HOSKIN, F. C. G.; ROSENBERG, P.; BRZIN, M. Re-Examination of the Effect of DFP on Electrical and Cholinesterase Activity of Squid Giant Axon. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 55, n. 5, p. 1231–1235, 1966.

HOUGHTON, T. P.; KALIVAS, J. H.; **J. Chem. Educ.**, v. 77, n. 10, p. 1314, 2000.

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

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

JACKSON, C.J.; LIU, J.-W.; COOTE, M.L.; OLLIS, D.L. The effects of substrate orientation on the mechanism of a phosphotriesterase, **Org. Biomol. Chem.** v. 3, p. 4343–4350, 2005.

JACQUET, P. et al. Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: Special focus on hyperstable enzymes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8200-8218, 2016.

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

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

KASSA, J.; KUČA, K.; BARTOSOVA, L.; KUNESOVA, G. The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes. **Cur. Org. Chem.** v. 11, p. 267-283, 2007.

KATSEMI, V.; LÜCKE, C.; KOEPKE, J.; LÖHR, F.; MAURER, S.; FRITZSCH, G.; RÜTERJANS, H. Mutational and Structural Studies of the Diisopropylfluorophosphatase from *Loligo Vulgaris* Shed New Light on the Catalytic Mechanism of the Enzyme. **Biochemistry**, v. 44, n. 25, p. 9022–9033, 2005.

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

KOEPKE, J.; SCHARFF, E. I.; LÜCKE, C.; RÜTERJANS, H.; FRITZSCH, G. Statistical Analysis of Crystallographic Data Obtained from Squid Ganglion DFPase at 0.85 Å Resolution. **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, v. 59, p. 1744–1754, 2003.

KOHN, W.; SHAM, L. J.; **Phys. Rev.**, v. 140, n. 4A, p. 1133, 1965.

LAMB, H. M. FAUDS, D. Metrifonate. **Drugs & Aging**, v. 11, n. 6, p. 490-496, 1997.

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., Bioinformatics-from genomes to drugs. **Weinheim**, Wiley-VCH, 2002.

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

LIMA, K. M. G.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J.; de ANDRADE J. C.; **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 700, 2008.

LIPKOWITZ, K. B. & BOYD, D. B. (eds) Reviews in computational chemistry. **VCH Pub**, New York, 1990.

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.; GÄB, J.; KOLLER, M.; KEHE, K.; BLUM, M.M. Reversed Enantioselectivity of Diisopropyl Fluorophosphatase against Organophosphorus Nerve Agents by Rational Design. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 47, p. 17226–17232, 2009.

MIRAMS, R. E., SMITH, S. J., HADLER, K. S., OLLIS, D. L., SCHENK, G., GAHAN, L. R. Cadmium(II) complexes of the glycerophosphodiester-degrading enzyme GpdQ and a biomimetic N,O ligand. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p.1065-1072, 2008.

- MITIC, N., SMITH, S. J., NEVES, A., GUDDAT, L. W., GAHAN, L. R., SCHENK, G. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 3338-3363, 2006.
- 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**, v. 21, n. 4, p. 467, 1998.
- MORGON, N. H. Paralelização em química. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 481-489, fev. 1995.
- MORGON, N. H.; RIVEROS, J. M.; **J. Chem. Phys. A**, v. 102, p. 10399, 1999.
- MORGON, N. H.; XAVIER, L. A.; RIVEROS, J. M.; **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 196, p. 363, 2000.
- MORI, F. et al. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. **Neuroreport**, v. 6, n. 4, p. 633-636, 1995.
- MULHOLLAND, A. J. Chemical Accuracy in QM/MM Calculations on Enzyme-Catalysed Reactions. **Chemistry Central Journal**, v. 1, n. 19, p. 1-5, 2007.
- NAKAMURA, H.; TRUHLAR, D. G. The direct calculation of diabatic states based on configurational uniformity. **The Journal Chemical Physics**, v. 115, p. 10353, 2001.
- 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.**, v. 81, n. 11, p. 1011-1025, 2012.
- 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. **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**, v. 43, p. 11255, 2004.
- 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**, 2001.

PEDROSO, M. M.; ELY, F.; MITIĆ, N.; CARPENTER, M. C.; GAHAN, L. R.; WILCOX, D. E.; LARRABEE, J. L.; OLLIS, D. L.; SCHENK, G. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 19, p. 1263-1275, 2014.

PEREIRA, D. H.; LA PORTA, F. A.; SANTIAGO, R. T.; GARCIA, D. R.; RAMALHO, T. C. Novas Perspectivas sobre o Papel dos Orbitais Moleculares de Fronteira no Estudo Da Reatividade Química: Uma Revisão. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n. 2, 2016.

PEREZGASGA, L.; SANCHEZ-SANCHEZ, L.; AGUILA, S.; et. al. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, p.1236-1247, 2012.

PETERSON, M. W. et al. VX hydrolysis by human serum paraoxonase 1: a comparison of experimental and computational results. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. 20335, 2011.

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

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

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

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

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

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.; ROCHA, M.V.J.; DA CUNHA, E.F.F.; OLIVEIRA, L.C.A.; CARVALHO, K.T.G. Understanding the Molecular Behavior of Organotin Compounds to Design their Effective Use as Agrochemicals: Exploration via Quantum Chemistry and Experiments. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 28, n. 2, p. 227-238, 2010.

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

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

RAUSHEL, F. M., & HOLDEN, H. M. Phosphotriesterase: An enzyme in search of its natural substrate. In **Advances in enzymology**, v. 74, p. 51, 2000.

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

SALERNO, A.; DEVERS, T.; BOLZINGER, M. A.; PELLETIER, J.; JOSSE, D.; BRIANÇON, S. **Chem. Biol. Inter.**, v. 267, p. 57-66, 2017.

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

SCHARFF, E. I.; KOEPKE, J.; FRITZSCH, G.; LÜCKE, C.; RÜTERJANS, H. Crystal Structure of Diisopropylfluorophosphatase from *Loligo Vulgaris*. **Structure**, v. 9, n. 6, p. 493-502, 2001.

SCHENK, G. et al. Binuclear metallohydrolases: Complex. **American Chemical Society**, v. 45, n. 9, p.1593-1603, 2012.

SCHENK, G.; MATTEEN, I.; NG, T. K.; PEDROSO, M. M.; MITIC, N.; JR, M. J.; MARQUES, R. F. C.; GAHAN, L. R.; OLLIS, D. L. *Coord. Chem. Rev.*, v. 317, p. 122-131, 2016.

SCHENK, G., MITIC, N., GAHAN, L. R., OLLIS, D. L., MCGEARY, R. P., GUDDAT, L. W. Binuclear Metallohydrolases: Complex mechanistic strategies for a simple chemical reaction. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 9, p. 1593-1603, 2012.

SCHWINGER, J. The Theory of Quantized Fields .1. **Physical Review**, v. 82, n. 6, p. 914-927, 1951.

SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 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.

SHIM, H.; HONG, S. B.; RAUSHEL, F. M.; **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17445-17450, 1998.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R.; *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine*; Office of Surgeon General: Washington, 1997.

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**, v. 35, p. 2083, 2012.

SILVA, G. R.; BORGES Jr., I.; FIGUEROA-VILLAR. DFT conformational studies of the HI-6 molecule. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 105, p. 260, 2005.

SILVA, J. B. P.; MALVESTITI, I.; HALLWASS, F.; RAMOS, M. N.; LEITE, L. F. C. da C.; BARREIRO, E. J.; **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 492, 2005.

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.

SMART, J.M.A History of Chemical and Biological Warfare: An American Perspective. In. SIDELL, F.R.; TAKAFUJI, E.T.; FRANZ, D.R. **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare**, Washington, DC, Borden Institute, 1997.

SMITH, S.J.; SUTCLIFFE, B. T. The Development of Computational Chemistry in the United Kingdom. **Reviews in Computational Chemistry**. V. 10, p. 271–316, 1997.

SOUSA, R. A.; BORGES NETO, W.; POPPI, R. J.; BACCAN, N.; CADORE, S.; **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654, 2006A.

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.

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. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

STODDART, J. F.; **Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reaction of organic compounds**. 6th ed., **Oxford**, 1979.

SREBRENİK, S. E R. F. W. BADER. Towards Development of Quantum-Mechanics of a Subspace. **Journal of Chemical Physics**, v. 63, n. 9, p. 3945-3961, 1975.

SZABO, A. e N. S. OSTLUND. **Modern Quantum Chemistry Introduction to Advanced Structure Theory**. **New York: Dover**, 1996.

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.

TRUHLAR, D. G. Valence bond theory for chemical dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 73, 2007.

TSUBOUCHI, A., BRUICE, T. C. Phosphonate ester hydrolysis catalyzed by two lanthanum ions. Intramolecular nucleophilic attack of coordinated hydroxide and Lewis acid activation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 7399 – 7411, 1995.

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

XU, C.; YANG, L.; YU, J.-G.; LIAO, R.-Z. What roles do the residue Asp229 and the coordination variation of calcium play of the reaction mechanism of the diisopropyl-fluorophosphatase? A DFT investigation. **Theor. Chem. Acc.**, v. 135, n. 5, p. 138, 2016.

WANG, L. Q.; MIZAIKOFF, B.; KRANZ, C.; **J. Chem. Educ.**, v. 86, n. 11, p. 1322, 2009.

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

WIBERG, K. B., R. F. W. BADER, et al. Theoretical-Analysis of Hydrocarbon Properties. Bonds, Structures, Charge Concentrations, and Charge Relaxations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 4, p. 985-1001, Feb. 1987.

WOREK, F.; KOLLER, M.; THIERMANN, H.; SZINICZ, I. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, v. 214, n. 3, p. 182, 2005.

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.**, v. 118, n. 17, p. 4479–4489, 2014.

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.

ZILKER, T. Medical management of incidents with chemical warfare agents. **Toxicology**, v. 214, n. 3, p. 221, 2005.

## **CAPÍTULO 2**

### **ARTIGO 1**

Theoretical studies applied to the evaluation of the DFPase bioremediation potential against chemical warfare agents intoxication

*Published in **International Journal of Molecular Science** 2018, 19, 1257*

DOI:10.3390/ijms19041257



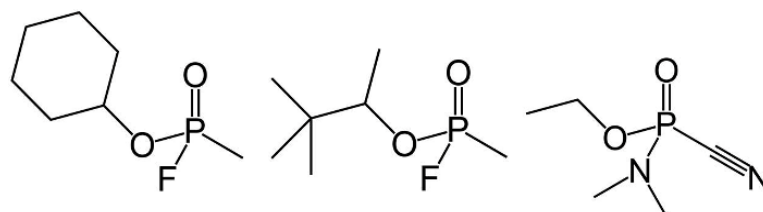
**Abstract:** Organophosphorus compounds (OP) are part of a group of compounds that may be hazardous to health. They are called neurotoxic agents because of their action on the nervous system, inhibiting the acetylcholinesterase (AChE) enzyme and resulting in a cholinergic crisis. Their high toxicity and rapid action lead to irreversible damage to the nervous system, drawing attention to developing new treatment methods. The diisopropyl fluorophosphatase (DFPase) enzyme has been considered as a potent biocatalyst for the hydrolysis of toxic OP and has potential for bioremediation of this kind of intoxication. In order to investigate the degradation process of the nerve agents Tabun, Cyclosarin and Soman through the wild-type DFPase, and taking into account their stereochemistry, theoretical studies were carried out. The intermolecular interaction energy and other parameters obtained from the molecular docking calculations were used to construct a data matrix, which were posteriorly treated by statistical analyzes of chemometrics, using the PCA (Principal Components Analysis) multivariate analysis. The analyzed parameters seem to be quite important for the reaction mechanisms simulation (QM/MM). Our findings showed that the wild-type DFPase enzyme is stereoselective in hydrolysis, showing promising results for the catalytic degradation of the neurotoxic agents under study, with the degradation mechanism performed through two proposed pathways.

**Keywords:** organophosphorus compounds; DFPase; tabun; cyclosarin; soman; molecular docking; PCA; QM/MM

## 1. Introduction

The use of chemical substances in wars was boosted in the 1930s with the discovery of the toxic properties of organophosphorus compounds (OP). Since then, the interest in the synthesis of substances that present toxicity intensified, and more potent compounds were developed, such as the neurotoxic agents, which later came to be used as chemical weapons [1].

These OP agents present structural characteristics which cause them have different activities, being employed as insecticides, herbicides, plant growth regulators, therapeutic agents and chemical weapons [2–4]. The members of this family, called nerve agents or neurotoxic agents, are the most lethal [5], due to their high toxicity. Given these characteristics, they have potential for use as chemical warfare agents, being considered as mass destruction weapons [2]. They are classified as G- or V-type agents, being Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD), Cyclosarin (GF) and VX the main representatives of this class [1]. Some of these chemical weapons are represented in Figure 1.



**Figure 1.** Structures of the neurotoxic agents Cyclosarin (**left**), Soman (**center**) and Tabun (**right**), respectively.

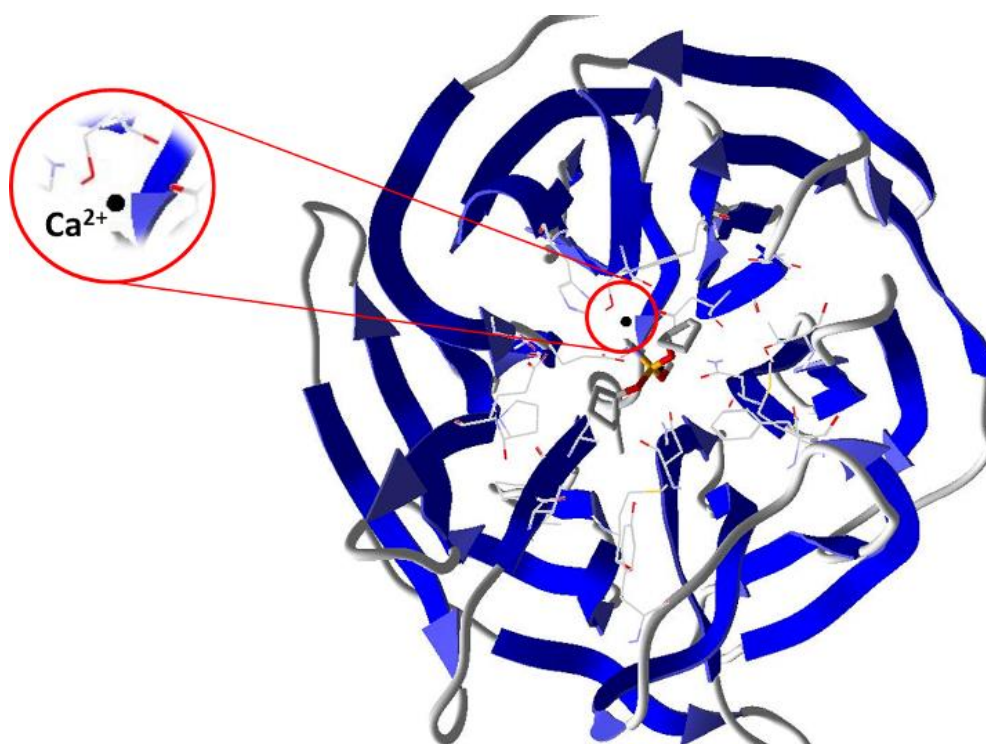
The G-type neurotoxic compounds have one chiral center, but Soman presents two stereocenters. It is noteworthy that one stereoisomer ( $S_P$ ) is commonly more toxic than the other ( $R_P$ ) [6]. Concerning Soman, biological essays related to acetylcholinesterase (AChE) inhibition processes are only capable of discriminating the stereoisomers pair taking into account the phosphorus atom, which is the dominant chiral center that dictates the potential toxicity, being this stereocenter generally employed to theoretical investigations [7].

The intoxication process through neurotoxic agents takes place in the central and peripheral nervous system [8], where these compounds inhibit the AChE enzyme. As a consequence of this inhibition, there may be the collapse of the nervous system, and finally death [9,10].

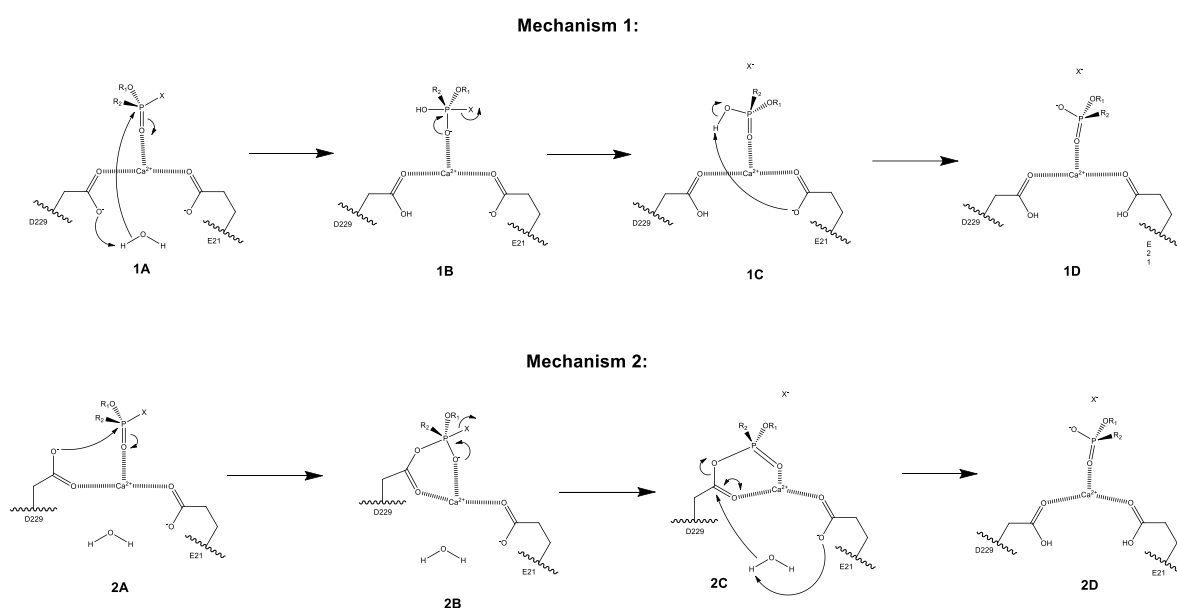
In this context, the employment of enzymes capable of degrading OP shows up as an alternative treatment [11]. Among the enzymes investigated with this applicability, the Diisopropyl fluorophosphatase (DFPase), from the squid *Loligo vulgaris*, has emerged recently,

showing a good potential for this purpose [12]. DFPase is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphotriesterase, which has been investigated as a potent biocatalyst for the hydrolysis of a series of highly toxic OP [7]. The DFPase crystallographic structure with its original bonded ligand (dicyclopentylphosphoramidate–DcPPA) is shown in Figure 2.

Previous studies have suggest an essential role of the Asp229 residue in the DFPase catalytic activity, since it has the correct orientation to perform a nucleophilic attack in the hydrolysis mechanism through bimolecular nucleophilic substitution ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), and it is also coordinated to the  $\text{Ca}^{2+}$  ion together with other residues and water molecules [7,11–13]. One possible pathway for the catalysis is that the Asp229 acts as a nucleophile, attacking the OP coordinated to the  $\text{Ca}^{2+}$  ion. In another reaction pathway for DFPase, in which the OP substrate is again coordinated to the  $\text{Ca}^{2+}$  catalytic ion via phosphoryl oxygen, a water molecule is activated through Asp229 (by proton abstraction) and then the hydroxyl ion formed acts as a nucleophile on the phosphoric center. The Glu21 participates in these proton transfers. The leaving group is released and the hydrolyzed substrate is removed from the  $\text{Ca}^{2+}$  ion at the ionized form as the reaction product [7,11–13]. Simplified versions of both these proposed mechanisms are represented in Figure 3.



**Figure 2.** Representation of DFPase crystallographic structure (PDB code 2GVV) [13]. The DFPase structure is shown as solid ribbons. The original ligand (DcPPA) is shown as tubular bonds.



**Figure 3.** OP hydrolysis reaction pathways proposed for DFPase action. Mechanism 1: it is shown the participation of a molecule of water as nucleophile with assistance of both Asp229 (D229) and Glu21 (E21) residues. In 1A, the hydroxide ion formed with the assistance of Asp229 attacks the OP leading to the pentavalent intermediate. In 1B, this intermediate collapses, hence, producing the leaving group  $X^-$ . In 1C, the Glu21 residue removes a proton of the OP, leading to 1D. Mechanism 2: only the Asp229 residue participates as nucleophile on the reaction. In 2A, Asp229 attacks the OP. In 2B, the pentavalent intermediate collapses. In 2C, a molecule of water hydrolyses the intermediate with the assistance of Glu21, leading to 2D, which is the same structure as 1D. In Mechanism 2, the tetrahedral intermediate was not shown for clarity reasons. In both mechanisms, the  $X^-$  leaving group is stabilized by other residues (not shown). Adapted from references [7,11–13].

Although there are previous studies [7,11–13] that assess the potential degradation of OP through DFPase, there is yet no consensus in the literature describing the exact reaction pathway. This feature indicates the need for a better understanding of the hydrolysis mechanisms and reactivity for the presented bioremediation process. Based on the existing proposals, the present work suggests a more complete evaluation, which evaluates the stereochemistry of these compounds, considering the stereoselectivity of the enzyme in the hydrolysis.

Given that the story of use of OP as chemical weapons is old, recent reports have made the scenario worrying and indicate that the development, production, and use of OP are a major reason to give due attention to the issue, dealing with it as a real threat present to the whole world. Although there are certain resources available for treatment, there is not a universal antidote efficient against all existing OP agents. In this context, considering that the bioremediation is an expanding field, and that the knowledge about the wild-type DFPase enzyme has brought significant contributions for the medicinal chemistry, more studies become

necessary [10,14,15]. Thus, this work uses theoretical molecular docking studies, supported by chemometric analyzes, along with computations such as quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) to investigate the OP degradation through DFPase enzyme.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Multivariate Exploratory Analysis

Once the molecular docking is performed, the MVD<sup>®</sup> software reports provided poses or conformers in the enzyme active site, with their respective interaction energy values. Usually, the selection of the conformation (pose) for the reaction mechanism studies is based on the lower energy criterion. However, considering the complexity of the system in which the mechanism takes place, it is believed that there are other relevant parameters, which may also assist in the choice of this conformation [16]. From this, a data matrix, composed of 30 conformations and 8 variables, was constructed and the multivariate exploratory analysis was used to try to detect association patterns of this data set.

The fundamental basis of most methods for the treatment of multivariate data is the Principal Component Analysis (PCA), which was employed in this study. In this kind of analysis, the original data set, correlated or not, are decomposed into a set of uncorrelated orthogonal variables, called principal components (PC). Then, the new set is described in a coordinate system which is expressed in terms of the linear combination of the initial variables, and it is possible to identify the individual contribution of each variable [17].

The new variables are obtained in decreasing order of the statistical information amount that they describe, i.e., the first principal component (PC1) points the direction of the largest variation of the data; the second one (PC2), which is orthogonal to the first one, points another direction that describes the largest remaining variation of the data, and so on.

The technique allows the reduction of the dimensionality of the representative points of the samples, even if the statistical information present in the  $n$  original variables is the same as in the  $n$  principal components, being common to obtain in only 2 or 3 of the first principal components about 70% to 80% of this information. Based on this, it can be seen in Table 1 that more than 70% of the data variation was explained in the first three principal components, for all compounds. In other hands, the presented data indicate that this new set of values,

represented by PC1, PC2 and PC3, is more informative, since it can stand for the same system in a smaller number of dimensions.

**Table 1.** Percentage of variance of the data explained by PCA for the OP and their enantiomers.

Principal Components	% of Variance	% of Cumulative VARIANCE	Principal Components	% of Variance	% of Cumulative VARIANCE
<i>(R<sub>p</sub>)-Cyclosarin</i>			<i>(S<sub>p</sub>)-Cyclosarin</i>		
PC1	50.05	50.05	PC1	47.55	47.55
PC2	16.24	66.29	PC2	21.32	68.87
PC3	14.82	81.11	PC3	12.88	81.75
PC4	10.23	91.34	PC4	8.98	90.73
PC5	5.75	97.09	PC5	5.98	96.71
PC6	2.81	99.90	PC6	3.21	99.92
PC7	0.09	99.99	PC7	0.07	99.99
PC8	0.01	100.00	PC8	0.01	100.00
<i>(R<sub>p</sub>)-Soman</i>			<i>(S<sub>p</sub>)-Soman</i>		
PC1	44.64	44.64	PC1	49.92	49.92
PC2	14.68	59.32	PC2	19.94	69.87
PC3	13.48	72.80	PC3	12.13	82.00
PC4	11.63	84.43	PC4	10.64	92.64
PC5	6.83	91.26	PC5	6.07	98.71
PC6	5.25	96.51	PC6	1.25	99.96
PC7	3.43	99.94	PC7	0.03	99.99
PC8	0.06	100.00	PC8	0.01	100.00
<i>(R<sub>p</sub>)-Tabun</i>			<i>(S<sub>p</sub>)-Tabun</i>		
PC1	38.25	38.25	PC1	36.08	36.08
PC2	23.89	62.14	PC2	22.48	58.56
PC3	16.22	78.36	PC3	15.66	74.22
PC4	12.95	91.30	PC4	11.39	85.61
PC5	5.90	97.20	PC5	8.83	94.44
PC6	2.60	99.80	PC6	5.34	99.78
PC7	0.19	99.99	PC7	0.13	99.91
PC8	0.01	100.00	PC8	0.09	100.00

The most common way to graphically represent the results of the PCA decomposition is to plot, on a graph, the samples and weights of the principal components chosen, most often creating a two-dimensional graph that allows a clearer view of the arrangement of these samples (graphs PC1 versus PC2 projection) and the contribution of the initial variables (loadings graph of the variables investigated). In this context, the analysis of principal components in the loadings graphs can also be used to judge the importance of the original variables selected.

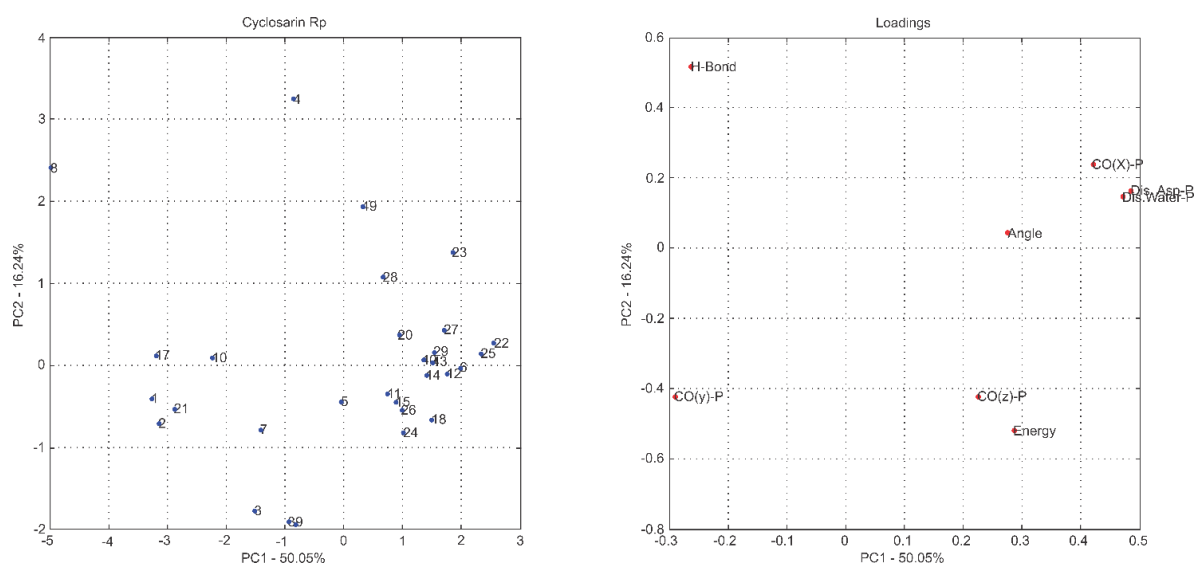
Considering that the interpretation of the loading graphs indicates the most important original variables for the linear combination of PC, from the statistical point of view, Figures 4–9 reveal which parameters or variables may be considered. In all cases, the common variables for both enantiomers were judged. Considering Cyclosarin, the variables obtained in the

positive region of the graph are angle, Co(X)P and Dist H<sub>2</sub>O-P. For Tabun, only Dist Asp-P was observed in the region established for this analysis. On the other hand, for Soman, along with H-bonds and Co(Z)P, the energy also includes the variables of larger weight. Thus, in addition to energy, other parameters, such as the spatial position of the phosphorus atom, deserve to be taken into account for the selection of the pose that stands for the OP in the hydrolysis reaction mechanism.

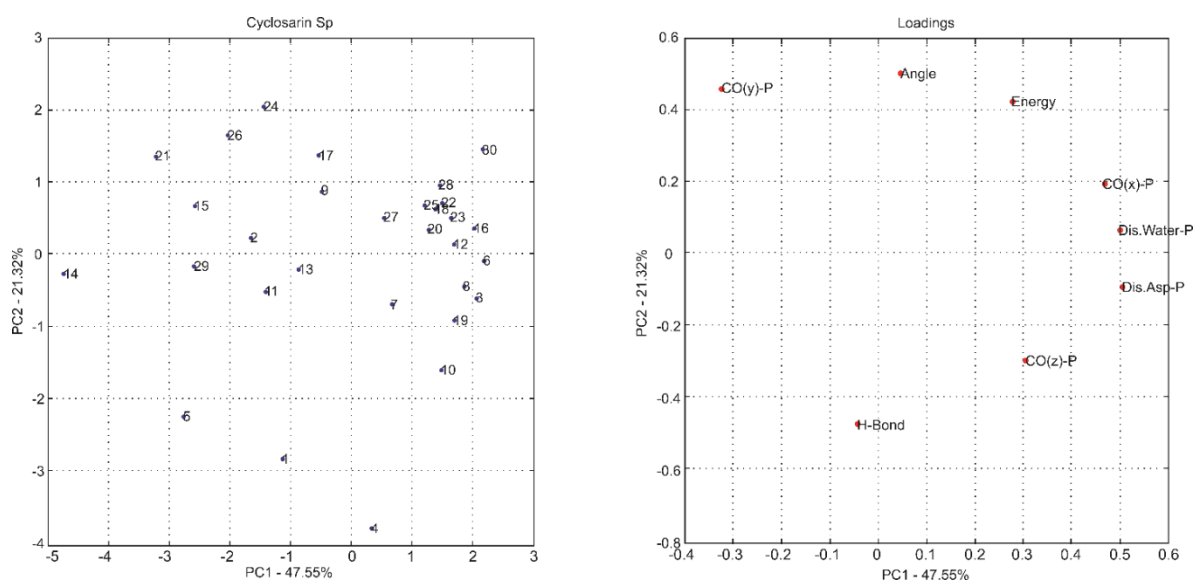
Considering that the energy itself cannot be the only parameter used to choose the conformation that best represents the OP in the reaction mechanism, the PCA method was employed as an alternative for this selection [18]. The selection method used is based on the idea of occupancy rate and has the objective of choosing the pose that contributes less to the standard deviation of the median structure. For this, bidimensional representations were built to maximize the interpretation of the data and to allow the indication of a set of poses suitable for the mechanism simulation.

It is known in PCA that the explanation percentage of PC1 will always be higher than that of PC2, and so on. Thus, the projections that may represent the data sets are: PC1 vs. PC2 or PC1 vs. PC3, since  $PC_N > PC_{N+1}$ . The PC1 vs. PC2 plan has a greater explanation of the original data set, so the proposal here was to use it [18]. Thus, the projections from Figures 4–9 report the dispersion of the poses as a function of the first and second PCs.

The selection is performed based on the pose that is closest to the origin point (0, 0) of the PC1 versus PC2 projection. Arbitrarily, a boundary was delimited (-1, +1) to facilitate the indication of the structure. The poses 5, 13, 21, 7, 19 and 26, generated on docking calculations, were indicated by PCA to stand for the neurotoxic agents (*R<sub>P</sub>*)-Cyclosarin, (*S<sub>P</sub>*)-Cyclosarin, (*R<sub>P</sub>*)-Soman, (*S<sub>P</sub>*)-Soman, (*R<sub>P</sub>*)-Tabun and (*S<sub>P</sub>*)-Tabun, respectively, in the reaction mechanism simulation. Theoretically, they are the most representative of the original data set, presenting a higher similarity to the median structure.

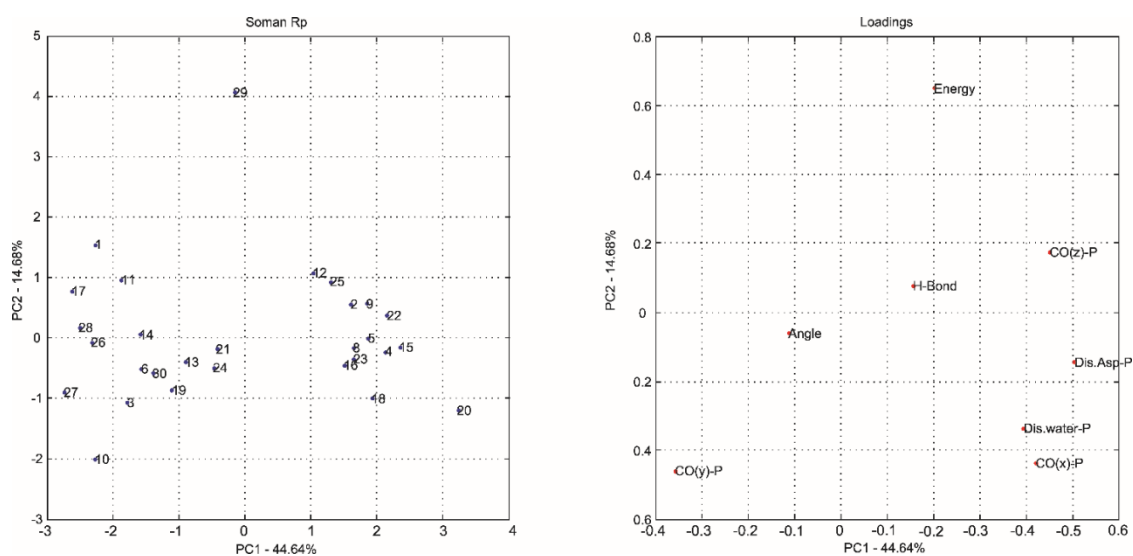


**Figure 4.** PC1 versus PC2 projection for Cyclosarin ( $R_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).

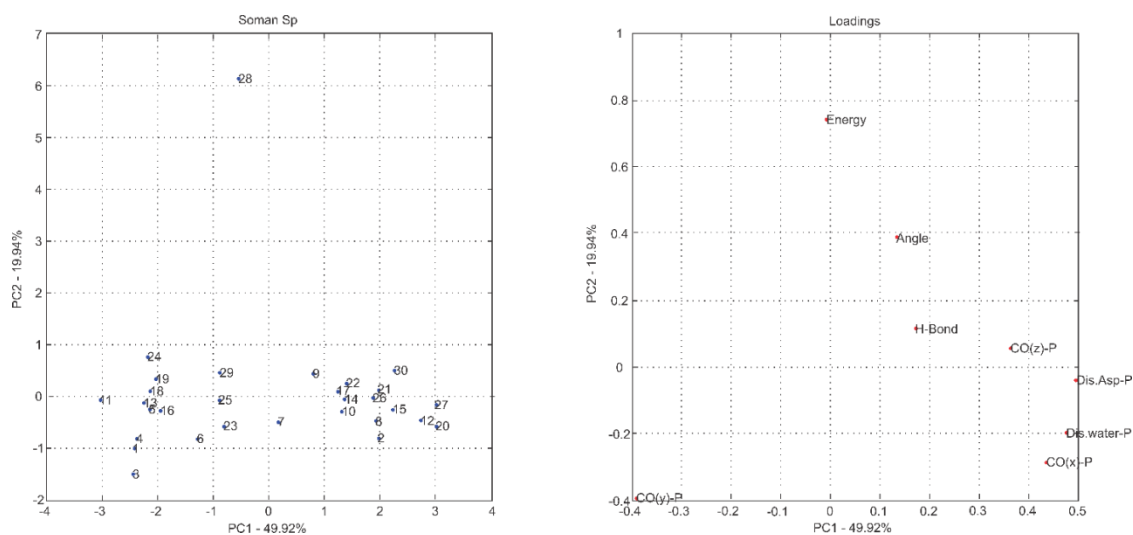


**Figure 5.** PC1 versus PC2 projection for Cyclosarin ( $S_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).

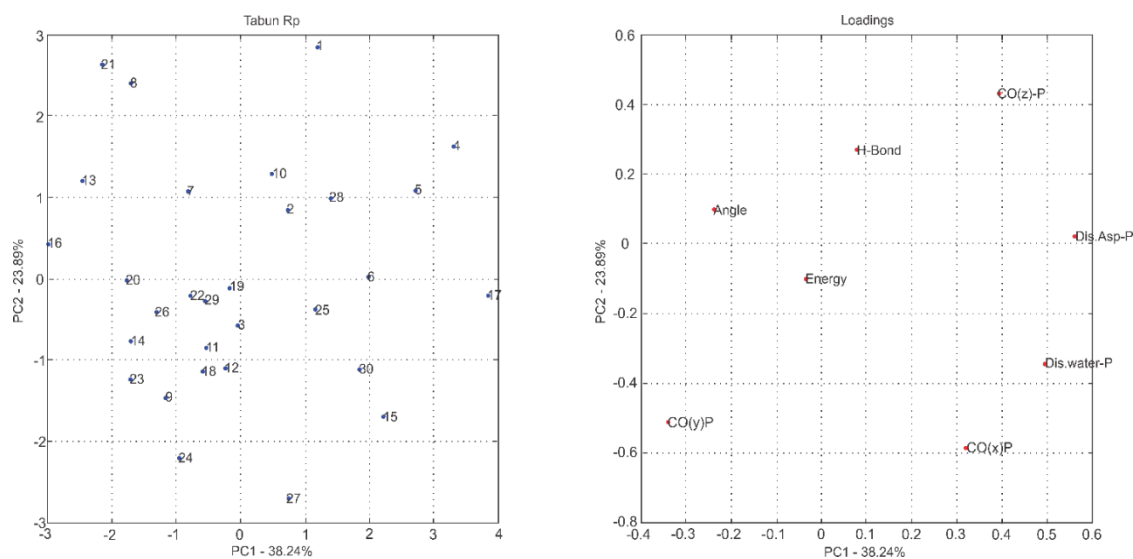




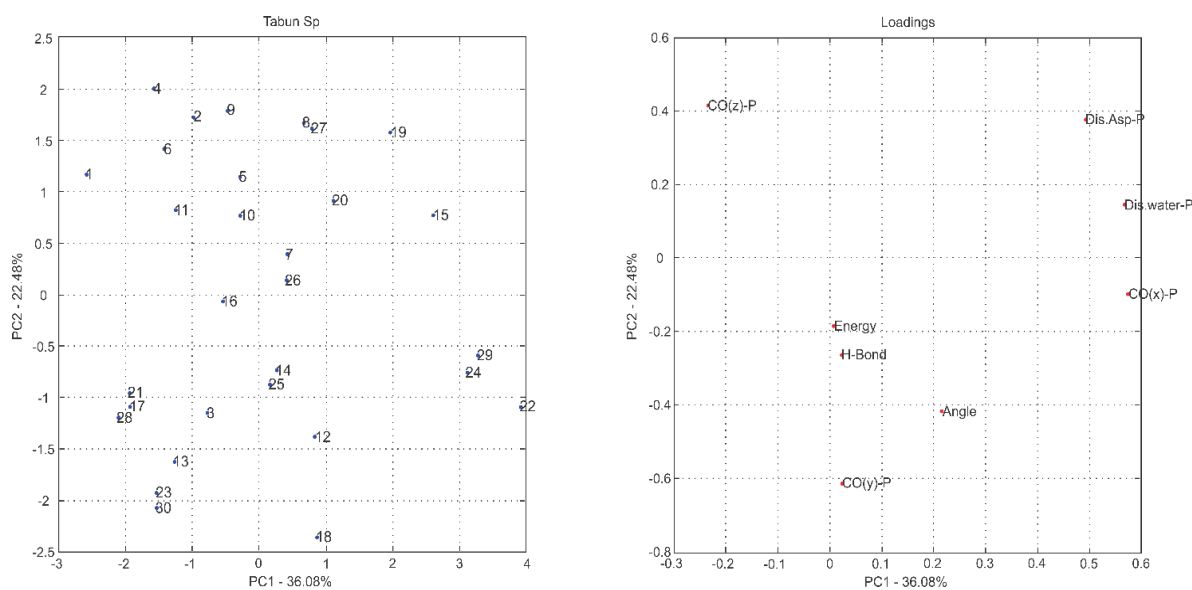
**Figure 6.** PC1 versus PC2 projection for Soman ( $R_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).



**Figure 7.** PC1 versus PC2 projection for Soman ( $S_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).



**Figure 8.** PC1 versus PC2 projection for Tabun ( $R_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).



**Figure 9.** PC1 versus PC2 projection for Tabun ( $S_P$  enantiomer) and loadings graph of the variables investigated (**left** and **right**, respectively).

## 2.2. Affinity: Molecular Docking

Molecular docking calculations were performed to adjust the ligands (OP) in the enzyme active cavity, evaluating the affinity among them. For this study, a cavity prediction algorithm based on a 3D box was employed in order to generate the DFPase enzyme binding sites. The volume of the calculated active cavity was  $164.864 \text{ \AA}^3$ .

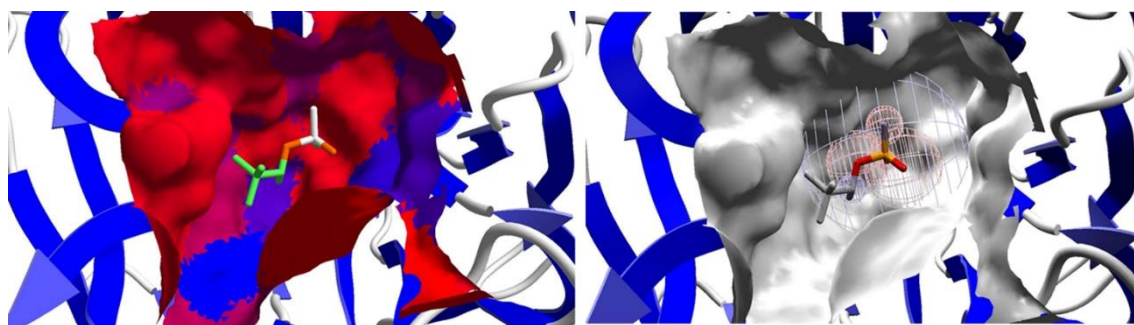
Some parameters were collected and investigated in order to understand the interaction modes of the OP in the study within the wild-type DFPase active site and to investigate the

factors which contribute to the degradation of these compounds. Table 2 shows the intermolecular interaction energy values and the hydrogen bonds performed by the nerve agents, with amino acid residues and water molecules present in the active site.

**Table 2.** Values of the parameters obtained by molecular docking calculations for the OP in the DFPase active site, by employing the conformations selected in the PCA analysis (energies in  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; lengths in angstroms; units correspond to those used by default in the MVD<sup>®</sup> software).

Neurotoxic Agent	Intermolecular Interaction Energy	H-Bond Strength	H-Bond Length	Residues and H <sub>2</sub> O	Neurotoxic Agent	Intermolecular Interaction Energy	H-Bond Strength	H-Bond Length	Residues and H <sub>2</sub> O
( <i>R<sub>P</sub></i> )-Cyclosarin	-39.23	-1.58	2.99	Asn120	( <i>S<sub>P</sub></i> )-Cyclosarin	-32.34	-2.50	2.97	H <sub>2</sub> O
		-2.24	2.88	Asn175					
( <i>R<sub>P</sub></i> )-Soman	-40.88	-	-	-	( <i>S<sub>P</sub></i> )-Soman	-28.33	-2.49	3.10	H <sub>2</sub> O
( <i>R<sub>P</sub></i> )-Tabun	-32.80	-2.50	3.09	H <sub>2</sub> O	( <i>S<sub>P</sub></i> )-Tabun	-28.87	-2.50	3.10	H <sub>2</sub> O
		-0.14	3.49	His287					

It is possible to notice, according to Table 2, that the nerve agent (*R<sub>P</sub>*)-Soman owns the lowest intermolecular interaction energy value ( $-40.88 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). However, no hydrogen bond was detected for this compound, which indicates that there are other factors that contribute to its stabilization in the enzyme active site. Probably, the conformation adopted by this compound is favored by hydrophobic and electrostatic interactions, as observed in Figure 10.

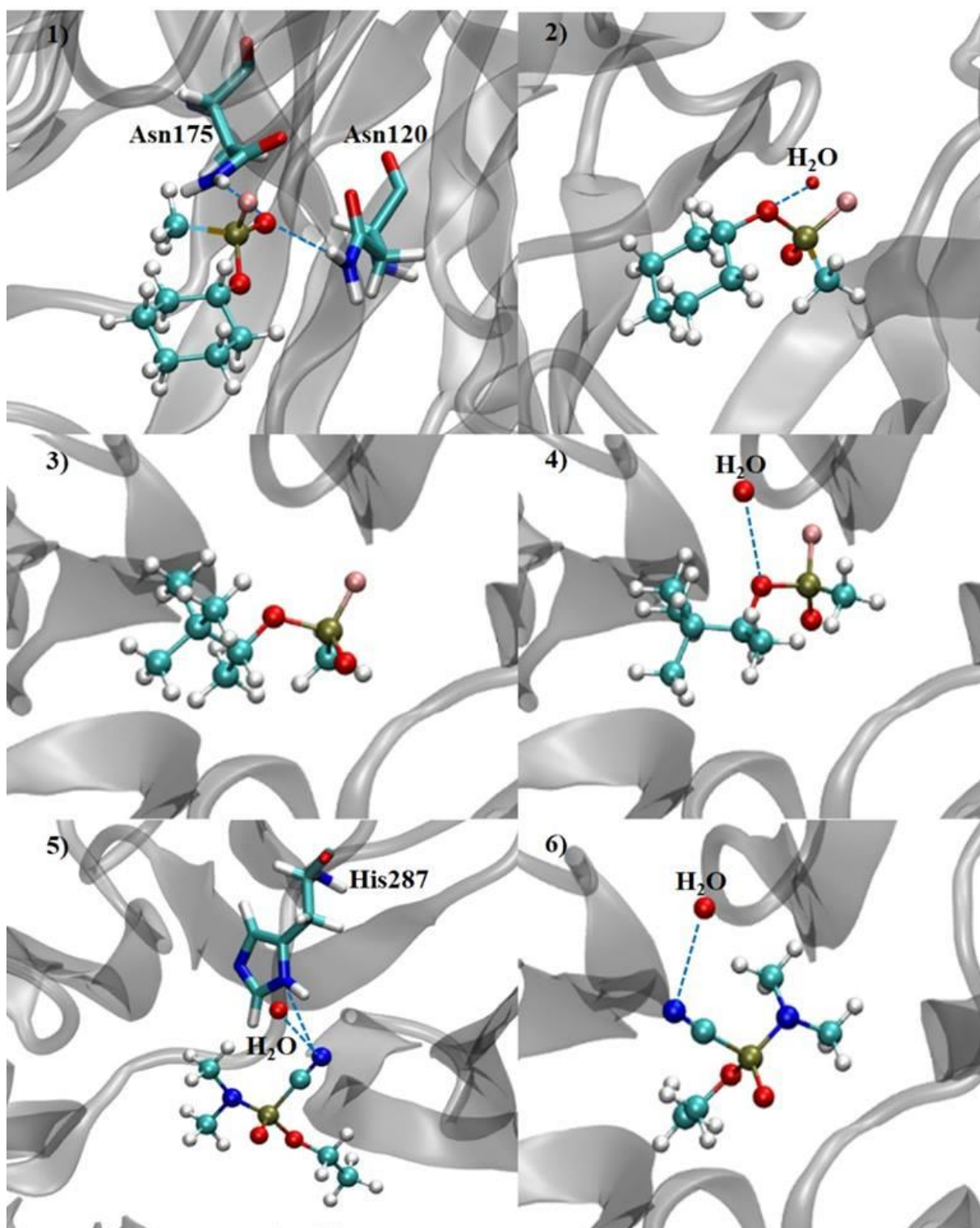


**Figure 10.** Representation of the hydrophobic (on the left) and electrostatic (on the right) interactions of Soman (*R<sub>P</sub>* enantiomer) in the DFPase active cavity, where in red surface means hydrophobic regions and blue surface means hydrophilic regions.

On the other hand, (*R<sub>P</sub>*)-Cyclosarin, which presented the second lowest interaction energy value ( $-39.23 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), carried out hydrogen bonds with the Asn120 and Asn175 amino acid residues, which brought about contributions for the stabilization of the compound in the active site (Figure 11). Similar to the above-mentioned compound, (*R<sub>P</sub>*)-Tabun has a good interaction potential with DFPase, since interactions with the His287 amino acid residue was observed, in addition to a water molecule (Figure 11). It is important to keep in mind that the *R<sub>P</sub>* enantiomers of Cyclosarin and Tabun allowed a better interaction and stabilization in the active site, and this

conformation led to the formation of hydrogen bonds with amino acid residues, unlike the  $S_P$  enantiomer.

The  $S_P$  enantiomers of all OP agents performed only one hydrogen bond with one water molecule (Figure 11), and presented the highest interaction energy values, which were  $-32.34 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $-28.87 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $-28.33 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  for Cyclosarin, Tabun and Soman, respectively. These results point out that, as observed for other degrading enzymes, the DFPase active site demonstrates a stereochemical preference for one enantiomer in relation to the other. However, this fact can be evaluated by means of the theoretical reaction mechanism simulation.



**Figure 11.** Hydrogen bonds performed by the nerve agents in the DFPase active site (Cyclosarin:  $R_P$  (1) and  $S_P$  (2) enantiomers; Soman:  $R_P$  (3) and  $S_P$  (4) enantiomers; Tabun:  $R_P$  (5) and  $S_P$  (6) enantiomers).

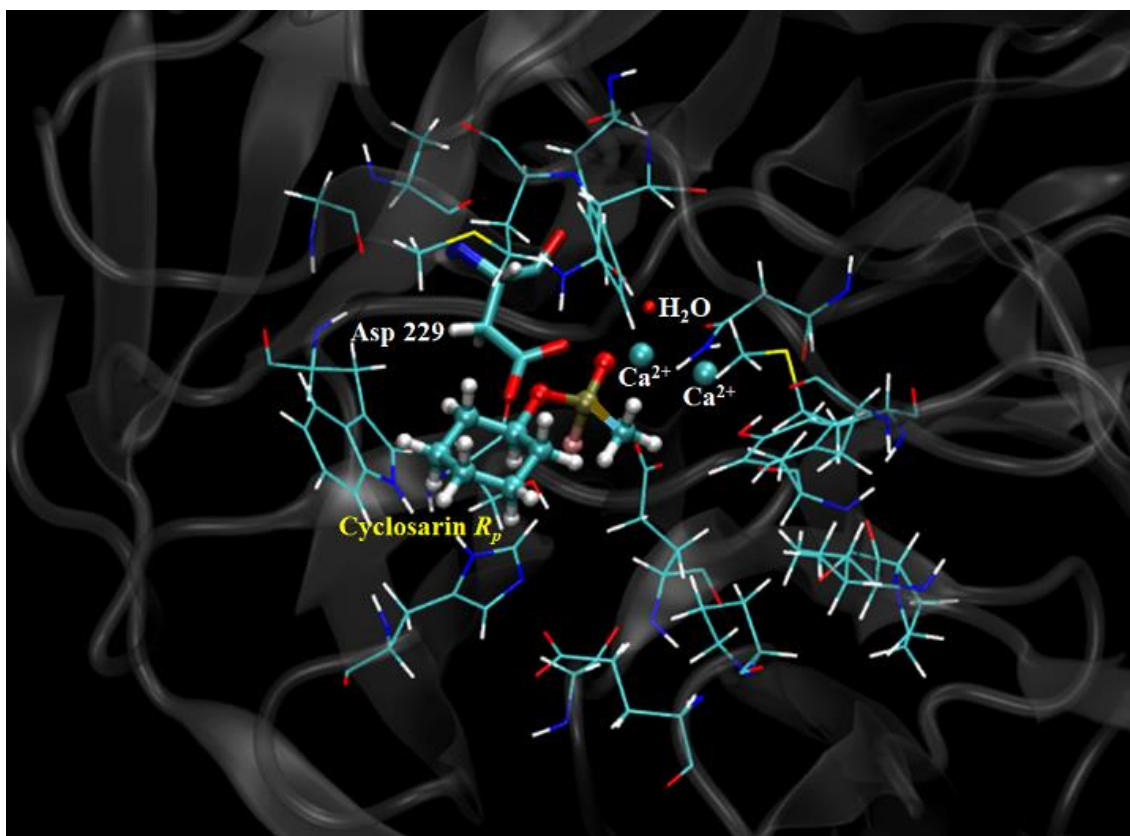
### 2.3. Mechanistic Studies in the Wild-Type DFPase Active Site

The development of new strategies, aiming to design new and selective organophosphorus degrading agents is important. For this purpose, the understanding of the acting means of these compounds becomes necessary [16]. In this context, the QM/MM approach can be used in order to have a good understanding of the interaction and reactional modes between OP and DFPase [14]. For this purpose, we also performed a theoretical investigation of the wild-type DFPase performance, considering the reaction mechanism of hydrolysis. The results obtained for the activation energy, based on the proposed mechanisms (Figure 3) can be observed in Table 3.

**Table 3.** Relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) in the hydrolysis mechanism of different nerve agents by the wild-type DFPase (units were kept in kcal.mol<sup>-1</sup> for ease of comparison with docking results).

Nerve Agent	Enantiomers	Mechanism 1; $\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Mechanism 2; $\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
<i>Soman</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	9.98	5.53
	<i>S<sub>P</sub></i>	0.00	1.81
<i>Tabun</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	2.05	0.10
	<i>S<sub>P</sub></i>	2.21	2.52
<i>Cyclosarin</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	2.11	1.68
	<i>S<sub>P</sub></i>	11.90	32.02

In order to perform this theoretical procedure, the hydrolysis reaction mechanism was looked into by employing two distinct routes, as shown in Figure 3. According to the QM system displayed in Figure 12, the metal ion is responsible for the catalytic activity of the enzyme, and it has a key role in this reaction, given that these cofactors are crucial for the water molecule activation step, giving rise to a hydroxyl ion which directly attacks the phosphoric center of the neurotoxic agent. It is important to keep in mind that the stereochemistry dictates the neurotoxicity level of these chemical weapons, influencing a lot in the degradation process, because it is found that one enantiomer could be preferentially hydrolyzed in relation to the other. These data can be observed in Table 3.



**Figure 12.** QM reactional system (highlighted in coloured atoms) for the Cyclosarin ( $R_P$  enantiomer) degradation by DFPase, considering a radius of  $5\text{\AA}$ . All coloured residues were taken into account for the QM reactional system.

The experimental studies performed by Chen et al. [6] exhibit the importance and potential of DFPase for application in the bioremediation of the poisoning caused by neurotoxic OP agents. Their experimental results suggest how the DFPase behaves in the hydrolysis of Cyclosarin, taking into account the  $R_P$  and  $S_P$  enantiomers. The experimental values of catalytic efficiency ( $K_{cat}/K_m$ ) were presented, and according to these results, the  $R_P$  enantiomer of Cyclosarin is more efficiently degraded, with a catalytic efficiency value equal to  $7.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . On the other hand, DFPase showed a lower efficiency in the hydrolysis of the  $S_P$  enantiomer ( $K_{cat}/K_m = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [6]. This tendency is, according to our theoretical results, obtained from the reaction mechanism simulation. A deeper study was performed theoretically, and significant aspects that govern the DFPase action on these agents have been figured out by means of diverse computational methodologies, allowing us to have a better comprehension of this enzyme in the bioremediation process.

By observing Table 3, it is possible to notice that the enzyme has shown a big selectivity regarding the Cyclosarin degradation. In this case, the  $R_P$  enantiomer revealed a lower activation energy value in relation to the  $S_P$  enantiomer, with an energy difference of 9.79

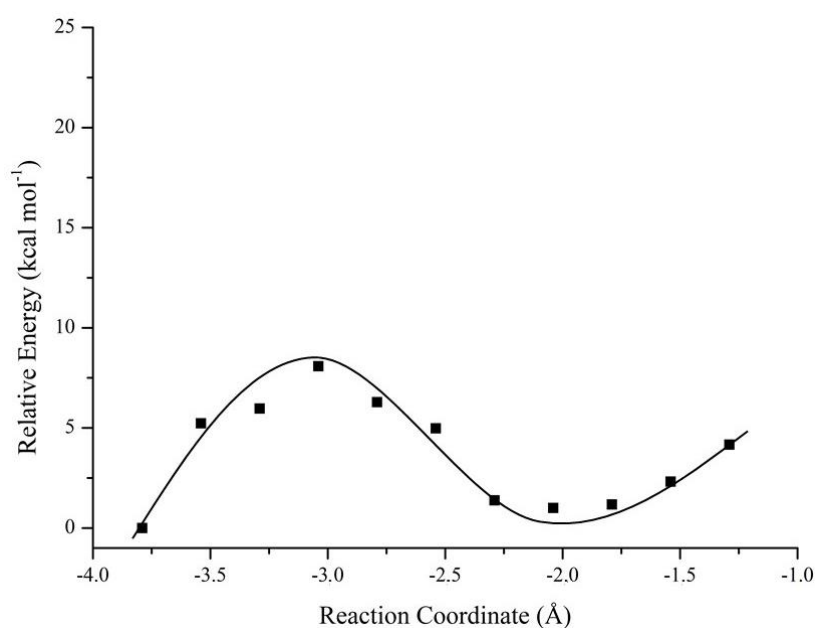
kcal·mol<sup>-1</sup> (via Mechanism 1), thus being more efficiently degraded. The same tendency can be noticed via Mechanism 2, wherein the energy difference was about 30.34 kcal·mol<sup>-1</sup>, corroborating very well with the experimental values of catalytic efficiency. The highest selectivity is found from the Mechanism 2 pathway; this must be strongly related to the fact that the hydrolysis process begins with the attack of a bulkier species, which is the carboxylate portion of Asp229 in this case. Therefore, this species acts as the nucleophile by this route, undergoing a higher steric hindrance in the degradation of Cyclosarin (*S<sub>P</sub>* enantiomer). Furthermore, the selectivity was not so remarkable compared to Mechanism 1, because in this case, the hydroxyl ion formed in the water activation step, which acts as a nucleophile in the S<sub>N</sub>2 mechanism, is less bulky, not suffering significant steric hindrance. As can be seen in Figure 1, the nerve agent Cyclosarin presents one cyclohexane ring in its structure, further enhancing the steric hindrance on the nucleophile.

Now evaluating the DFPase performance in the Tabun degradation, we can notice that the same tendency continues. The *R<sub>P</sub>* enantiomer is more efficiently degraded in relation to *S<sub>P</sub>* enantiomer, via both mechanism routes. Another important fact to be mentioned here is that the selectivity was not so apparent, no matter the pathway. The energy differences were very small, being 0.16 kcal·mol<sup>-1</sup> (via Mechanism 1) and 2.42 kcal·mol<sup>-1</sup> (via Mechanism 2). The selectivity from Mechanism 2 is slightly higher, maybe due to the steric hindrance effects shown right behind, but for Tabun, the presence of very bulky substituents in its structure is not observed, unlike Cyclosarin. Finally, we evaluated the degradation process of the neurotoxic agent Soman, and things have changed in relation to the preferential stereochemistry in the hydrolysis. For both mechanism routes, the *S<sub>P</sub>* enantiomer of Soman was preferentially degraded, with an energy difference of 9.98 kcal·mol<sup>-1</sup> (via Mechanism 1) and 3.72 kcal·mol<sup>-1</sup> (via Mechanism 2). The graph of potential energy versus reaction coordinate is highlighted in Figure 13, for Soman (*S<sub>P</sub>* enantiomer), which presented a relative energy barrier equal to zero. It is quite interesting that Soman, even presenting a bulky group, did not interfere most in the process, and the transition state via Mechanism 2 is found to be more stable, i.e., the reaction intermediates are better stabilized by following this hydrolysis pathway. However, both mechanisms investigated here are likely to take place and, sometimes, this choice will depend on the compound structure (substituents attached to the central phosphorus), its stereochemistry and leaving group in the S<sub>N</sub>2 mechanism.

Further experimental studies were developed by Dawson et al. [16], and they investigated the factors involved in the Soman degradation, and some experimental value was displayed.



For the Soman degradation ( $R_P$  enantiomer), we found a value of catalytic efficiency of  $1.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . According to this experimental data [16], along with the experimental results from Chen et al. [6], it is noteworthy the good correlation between theoretical and experimental results. According to them, the nerve agent Cyclosarin owns the highest catalytic efficiency involving hydrolysis, in relation to Soman, and this tendency is also seen by means of the theoretical calculations performed, wherein Cyclosarin presents the lowest activation energy for the process, with an energy difference of about  $3.85 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . These experimental and theoretical studies are a good starting point to have a better comprehension of the acting modes of degrading enzymes (wild-type DFPase for example), thus, allowing the development of new technologies which are cheap and efficient in the remediation of the intoxication caused by these neurotoxic agents [19].



**Figure 13.** Graph of relative potential energy versus reaction coordinate for Soman ( $S_P$  enantiomer).

Concerning Soman, it is worth noting that, although the research was carried out considering the phosphorus atom as the predominant stereocenter, the extension of the theoretical studies directed to the two stereoisomers ( $S,R_P$ ) and ( $R,S_P$ ), regarding the carbon chiral, must be considered. This aspect deserves further investigations in order to support the validation of the model. In fact, with this promising lead in hand, we next sought to improve

the understanding of this reaction. Further and still more accurate theoretical calculations in order to verify this hypothesis are now in progress.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Computational Details

##### 3.1.1. Docking Procedure

For the docking study, the nerve agents Tabun, Soman and Cyclosarin were used to perform the calculations. Chemical structures of both  $R_P$  and  $S_P$  stereoisomers of these compounds (with the subscript index corresponding to the phosphorus atom as the stereocenter) were constructed and individually optimized by using the Gaussian 09 package [20], at DFT level, with B3LYP density functional and 6-31G (d,p) basis set, wherein the partial charges of the atoms were elucidated. Just in the case of Soman, which has four stereoisomers, it was used only the variations ( $R,R_P$ ) and ( $S,S_P$ ), given that the different configurations on the phosphorus atom are responsible for the OP toxicity. For this work, considering that the chiral carbon is irrelevant to determine the toxicity of this neurotoxic agent, an equal pair of stereoisomers considering both chiral centers ( $R,R_P$ ) and ( $S,S_P$ ) was thus chosen [7]. The  $R_P$  and  $S_P$  stereoisomers of these compounds were individually docked inside the crystallographic structure of DFPase (PDB code 2GVV; resolution = 1.73 Å) [13], using the Molegro Virtual Docker program (MVD<sup>®</sup>) [21], taking into account the same procedures employed in other studies and the previous removal of the original ligand DcPPA [22–24]. For the development of the docking calculations, it was considered a radius of 5 Å centered at the active site, with the residues being kept as flexible. Due to the nature of docking methods, the calculations were executed generating 100 poses (conformation and orientation) for each stereoisomer of the ligands.

The MolDock scoring function employed in the MVD<sup>®</sup> 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 [25]. The docking scoring function values,  $E_{\text{score}}$ , are defined by Equation (1):

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

where:

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

$E_{\text{PLP}}$  represents “piecewise linear potential”, which consists in the use of two different parameter sets, as described forward: one for approximation of the steric term (Van der Waals) among atoms, and the other potential for the hydrogen bonding. 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 [21].

$E_{\text{intra}}$  is the internal energy of the ligand:

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

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, where  $\theta$  is the torsional angle of the bond. If several torsions could be determined, each torsional energy is considered and there is the use of an average among them. The last term,  $E_{\text{clash}}$ , assigns a penalty of 1000 if the distance between two heavy atoms (more than two bonds apart) is smaller than 2.0 Å, not taking into account infeasible ligand conformations [21]. The docking search algorithm that is applied in MVD<sup>®</sup> 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, allowing that way a fast and accurate identification of potential binding modes (poses) [21,26,27].

### 3.1.2. Multivariate Analysis of Principal Components

Taking into account the complexity of the analyzed system, and the large amount of data obtained, the multivariate analysis was carried out by employing relevant information from the molecular docking, in order to look into the proposed reaction mechanism.

Initially, starting from the 100 conformations generated by the docking calculations, 30 low energy poses were selected. The data matrix was constructed as pre-processing, extracting from the docking an amount of 8 variables considered important for the mechanism simulation. This generated matrix is composed of lines, which represent the samples (OP compounds), and

columns representing the original variables to be investigated. These are: (x, y, z) space coordinates for the phosphorus atom of the nerve agents ((CO(x)-P), (CO(y)-P), (CO(z)-P)), intermolecular interaction energy (ENERGY), hydrogen bonds (H-BOND), attack angle to the OP (ANGLE), distance between the oxygen of the Asp229 amino acid residue and phosphorus in the OP (DIS.ASP-P) and distance between the water molecule and P in the OP (DIS.WATER-P).

The method is based on the transformation of original variables (present in the data matrix) into new uncorrelated variables, called principal components (PC). The main components are obtained by means of linear transformations according to the equation:

$$X \times P = T \quad (4)$$

where in X is the original matrix of the data, T is the scores matrix containing the coordinates of the samples in the new axis system and P is the loadings matrix, where the elements of each column correspond to the coefficients of the linear combinations of the original variables.

For this statistical treatment, the MATLAB program, version R2012b, was used [17]. We have considered the closest water molecule and the Asp229 amino acid residue, which presented a favorable spatial location for the reaction mechanism. The data matrix underwent a pretreatment process by employing self-escalation.

### 3.1.3. QM/MM Methodology

Combined QM/MM techniques allow the modeling of larger systems, like reactions within enzymes, by combining the electronic degrees of a quantum chemical approach with the MM methods, increasing the performance and decreasing computational demand [10]. Thus, in this work, mixed quantum and molecular mechanics (QM/MM) combined with docking techniques were performed to determine the most likely reaction pathway for the OP degradation catalyzed by the wild-type DFPase. Actually, this theoretical strategy has been previously employed in other occasions [25,28–30], being intensively used in our current researches, and so, computational methods are necessary for allowing us to analyze them [10]. 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 [20]. DFT methods have been widespread, showing good performance for large systems, such as biomolecules [31,32]. The calculations were based on the generalized gradient approximation functional proposed by

Gustin et al. [33]. This relationship of functional and basis sets has been tested for similar systems [26].

All transition states, intermediates and precursors involved were calculated and characterized by calculations identifying imaginary frequencies [5,34,35]. Each conformer was fully optimized at 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) [36], using 6-31G (d,p) basis set. The QM system consisted in neighboring peptide bonds, link atoms, crystallographic water molecules, Asp229, GA/GD/GF ( $R_P$  and  $S_P$  stereoisomers), inside a sphere within a radius of 5 Å. Within this boundary, it was possible to include the electrostatic and hydrophobic effects from diverse residues, which assist in the stabilization and reaction modes over the reaction pathway.

Given the significant importance of electrostatic interactions for the ligands stabilization in the enzyme active site, all residues important electrostatically were part of the QM reactional system, concerning to the reaction mechanism simulation, being these residues found within a radius of 5 Å, as mentioned before. By employing quantum calculations, it was possible to include these electronic effects in the simulation, which are essential for a better stabilization of the transition state.

Some important features regarding the QM/MM approach are as follows: a small part of the system is selected for QM treatment, for instance, by carrying out the calculations at ab initio or semi-empirical level, or DFT, as in the present work [37,38]. The quantum mechanics (QM) approach is a method which potentially allows the electronic rearrangements referred to the breaking and formation of chemical bonds. In this theoretical study, the QM region consisted of the enzyme active site, as described previously. The big portion of the system, not directly related to the reaction pathway, is treated by empirical molecular mechanics (MM) techniques [38]. In the performance of this kind of calculations, the QM/MM energy of the whole system,  $E_{TOTAL}^{QM/MM}$ , is calculated as shown in Equation (5):

$$E_{TOTAL}^{QM/MM} = E_{TOTAL}^{MM} + E_{QM\ region}^{QM} - E_{QM\ region}^{MM} \quad (5)$$

where  $E_{TOTAL}^{MM}$  is the MM energy of the whole system,  $E_{QM\ region}^{QM}$  is the QM energy of the QM region and  $E_{QM\ region}^{MM}$  is the MM energy of the isolated QM region. Many QM/MM techniques still

include the polarization effect on the QM region by the MM environment [39]. In this line, the QM/MM has shown itself as being a nice tool to perform these calculations.

#### 4. Conclusions

Considering that currently the use of chemical warfare agents is one of the biggest threats to the world population, the advent of effective detoxification techniques of these compounds becomes essential. In this perspective, the theoretical methodology proposed in this work is highlighted, since it was able to evaluate the affinity and reactivity of these compounds in the wild-type DFPase active site, obtaining detailed data and perspectives on the central processes of the enzymatic catalysis process. Our results suggest that the enzyme owns stereochemical preference in the degradation of these compounds.

The results point to DFPase as a considerable biological tool, considering that the two pathways suggested for the degradation mechanism seem to be promising, depending on the OP structure and its stereochemistry. The agreement between the experimental results found in the literature and the theoretical ones obtained in this work characterizes the adequacy of the applied methodologies. Thus, the enzymatic catalysis predicted by the computational chemistry methods for the OP degradation serves as a starting point in order to contribute to important advances in medicinal chemistry.

**Acknowledgments:** 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. Also supported by excellence project FIM UHK.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Abbreviations**

ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate
B3LYP	DFT hybrid functional by Becke, Lee, Yang and Paar
DcPPA	Dicyclopentylphosphoroamidate
DFPase	Diisopropyl fluorophosphatase enzyme
DFT	Density Functional Theory
GA	NATO designation code for tabun
GB	NATO designation code for sarin
GD	NATO designation code for soman
GF	NATO designation code for cyclosarin
His	Histidine
$K_{\text{cat}}$	Turnover number
$K_{\text{m}}$	Michaelis constant
M	Mols per liter
MM	Molecular Mechanics
MVD	Molegro Virtual Docker <sup>®</sup> software
OP	Organophosphorus
PC	Principal Component
PCA	Principal Components Analysis
PLP	Piecewise Linear Potential
QM	Quantum Mechanics
$R_P$	<i>R</i> -stereochemistry designation for the OP phosphorus atom
$S_P$	<i>S</i> -stereochemistry designation for the OP phosphorus atom

## References

1. Chauhan, S.; Chauhan, S.; D'Cruz, R.; Faruqi, S.; Singh, K.K.; Varma, S.; Singh, M.; Karthik, V. Chemical warfare agents. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *26*, 113–122, doi:10.1016/j.etap.2008.03.003.
2. Chambers, J.E.; Carr, R.L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* **1995**, *105*, 291–304, doi:10.1016/0300-483X(95)03225-5.
3. Li, J.N.; Liu, L.; Fu, Y.; Guo, Q.X. What are the pK<sub>a</sub> values of organophosphorus compounds? *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4453–4462, doi:10.1016/j.tet.2006.02.049.
4. Jaga, K.; Dharmani, C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev. Panam. Salud Pública* **2003**, *14*, 171–185.
5. Giacoppo, J.O.S.; França, T.C.C.; Kuča, K.; Cunha, E.F.F.; Abagyan, R.; Mancini, D.T.; Ramalho, T.C. Molecular modeling and *in vitro* reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2015**, *33*, 2048–2058, doi:10.1080/07391102.2014.989408.
6. Chen, J.C.H.; Mustyakimov, M.; Schoenborn, B.P.; Langan, P.; Blum, M.M. Neutron structure and mechanistic studies of diisopropyl fluorophosphatase (DFPase). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 1131–1138, doi:10.1107/S0907444910034013.
7. Melzer, M.; Chen, J.C.H.; Heidenreich, A.; Gäb, J.; Koller, M.; Kehe, K.; Blum, M.M. Reversed Enantioselectivity of Diisopropyl Fluorophosphatase against Organophosphorus Nerve Agents by Rational Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17226–17232, doi:10.1021/ja905444g.
8. Romero, A.M. Commercializing chemical warfare: Citrus, cyanide, and an endless war. *Agric. Hum. Values* **2016**, *33*, 3–26, doi:10.1007/s10460-015-9591-1.
9. Ordentlich, A.; Barak, D.; Sod-Moriah, G.; Kaplan, D.; Mizrahi, D.; Segall, Y.; Kronman, C.; Karton, Y.; Lazar, A.; Marcus, D.; et al. 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*, 11255–11265, doi:10.1021/bi0490946.
10. Ramalho, T.C.; Castro, A.A.; Silva, D.R.; Silva, M.C.; França, T.C.C.; Bennion, B.J.; Kuca, K. Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches Toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1041–1061, doi:10.2174/0929867323666160222113504.
11. Xu, C.; Yang, L.; Yu, J.-G.; Liao, R.-Z. What roles do the residue Asp229 and the coordination variation of calcium play of the reaction mechanism of the diisopropyl-fluorophosphatase? A DFT investigation. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135*, 138, doi:10.1007/s00214-016-1896-7.
12. Wymore, T.; Field, M.J.; Langan, P.; Smith, J.C.; 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, doi:10.1021/jp410422c.
13. Blum, M.M.; Löhr, F.; Richardt, A.; Ruterjans, H.; Chen, J.C.H. Binding of a Designed Substrate Analogue to Diisopropyl Fluorophosphatase: Implications for the Phosphotriesterase Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12750–12757, doi:10.1021/ja061887n.
14. Castro, A.A.; Caetano, M.S.; Silva, T.C.; Mancini, D.T.; Rocha, E.P.; Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C. Molecular Docking, Metal Substitution and Hydrolysis Reaction of Chiral



- Substrates of Phosphotriesterase. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2016**, *19*, 334–344, doi:10.2174/1386207319666160325113844.
15. Sartorelli, J.; Castro, A.A.; Ramalho, T.C.; Giacoppo, J.O.S.; Mancini, D.T.; Caetano, M.S.; Cunha, E.F.F. Asymmetric biocatalysis of the nerve agent VX by human serum paraoxonase 1: Molecular docking and reaction mechanism calculations. *Med. Chem. Res.* **2016**, *25*, 2521–2533, doi:10.1007/s00044-016-1704-x.
  16. Dawson, R.M.; Pantelidis, S.; Rose, H.R.; Kotsonis, S.E. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA). *J. Hazard. Mater.* **2008**, *157*, 308–314, doi:10.1016/j.jhazmat.2007.12.099.
  17. Hanselman, D.; Littlefield, B. *Mastering MATLAB 5: A Comprehensive Tutorial and Reference*; Prentice-Hall: Bergen, NJ, USA, 1998; ISBN-13 978-0138583668.
  18. Lima, W.E.A.; Pereira, A.F.; Castro, A.A.; Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C. Flexibility in the Molecular Design of Acetylcholinesterase Reactivators: Probing Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Lett. Drug Des. Discov.* **2016**, *13*, 360–371, doi:10.2174/1570180812666150918191550.
  19. Castro, A.A.; Assis, L.C.; Silva, D.R.; Corrêa, S.; Assis, T.M.; Gajo, G.C.; Soares, F.V.; Ramalho, T.C. Computational enzymology for degradation of chemical warfare agents: Promising technologies for remediation processes. *AIMS Microbiol.* **2017**, *3*, 108–135, doi:10.3934/microbiol.2017.1.108.
  20. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 09, Revision A.02*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
  21. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321, doi:10.1021/jm051197e.
  22. Silva, T.C.; Pires, M.S.; Castro, A.A.; Cunha, E.F.F.; Caetano, M.S.; Ramalho, T.C. Molecular insight into the inhibition mechanism of plant and rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by molecular docking and DFT calculations. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24*, 3958–3971, doi:10.1007/s00044-015-1436-3.
  23. Guimarães, A.P.; Oliveira, A.A.; Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; França, T.C.C. Analysis of *Bacillus anthracis* nucleoside hydrolase via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 2939–2951, doi:10.1007/s00894-011-0968-9.
  24. Matos, K.S.; Mancini, D.T.; Cunha, E.F.F.; Kuca, K.; França, T.C.C.; Ramalho, T.C. Molecular aspects of the reactivation process of acetylcholinesterase inhibited by cyclosarin. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1999–2004, doi:10.1590/S0103-50532011001000023.
  25. Ramalho, T.C.; Caetano, M.S.; Cunha, E.F.F.; Souza, T.C.S.; Rocha, M.V.J. Construction and Assessment of Reaction Models of Class I EPSP Synthase: Molecular Docking and Density Functional Theoretical Calculations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *27*, 195–207, doi:10.1080/07391102.2009.10507309.
  26. Cunha, E.F.F.; Barbosa, E.F.; Oliveira, A.A.; Ramalho, T.C. Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2010**, *27*, 619–625, doi:10.1080/07391102.2010.10508576.
  27. Souza, T.C.S.; Josa, D.; Ramalho, T.C.; Caetano, M.S.; Cunha, E.F.F. Molecular modelling of *Mycobacterium tuberculosis* acetolactate synthase catalytic subunit and its molecular docking study with inhibitors. *Mol. Simul.* **2008**, *34*, 707–713, doi:10.1080/08927020802129974.

28. Goncalves, A.S.; França, T.C.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. *J. Biomol. Struct. Dyn.***2014**, *32*, 301–307, doi:10.1080/07391102.2013.765361.
29. Matos, K.S.; Cunha, E.F.F.; Abagyan, R.; Ramalho, T.C. Computational Evidence for the Reactivation Process of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Carbamates. *Comb. Chem. High Throughput Screen.***2014**, *17*, 554–564, doi:10.2174/1386207316666131217100416.
30. Ramalho, T.C.; Alencastro, R.B.; La-Scalea, M.A.; Figueroa-Villar, J.D. Theoretical evaluation of adiabatic and vertical electron affinity of some radiosensitizers in solution using FEP, ab initio and DFT methods. *Biophys. Chem.***2004**, *110*, 267–279, doi:10.1016/j.bpc.2004.03.002.
31. Besler, B.H.; Merz, K.M.; Kollman, P.A. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.***1990**, *11*, 431–439, doi:10.1002/jcc.540110404.
32. Singh, U.C.; Kollman, P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.***1984**, *5*, 129–145, doi:10.1002/jcc.540050204.
33. Gustin, D.J.; Mattei, P.; Kast, P.; Wiest, O.; Lee, L.; Cleland, W.W.; Hilvert, D. Heavy Atom Isotope Effects Reveal a Highly Polarized Transition State for Chorismate Mutase. *J. Am. Chem. Soc.***1999**, *121*, 1756–1757, doi:10.1021/ja9841759.
34. Giacoppo, J.O.S.; Mancini, D.T.; Guimarães, A.P.; Gonçalves, A.S.; Cunha, E.F.F.; França, T.C.C.; Ramalho, T.C. Molecular modeling toward selective inhibitors of dihydrofolate reductase from the biological warfare agent *Bacillus anthracis*. *Eur. J. Med. Chem.***2015**, *91*, 63–71, doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.025.
35. Li, R.; Liu, Y.; Zhang, J.; Chen, K.; Li, S.; Jiang, J. An isofenphos-methyl hydrolase (Imh) capable of hydrolyzing the P–O–Z moiety of organophosphorus pesticides containing an aryl or heterocyclic group. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***2012**, *94*, 1553–1564, doi:10.1007/s00253-011-3709-1.
36. Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; Reynolds, R.C. Binding Mode Analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted Pteridines with *Mycobacterium tuberculosis* and Human Dihydrofolate Reductases. *J. Biomol. Struct. Dyn.***2008**, *25*, 377–385, doi:10.1080/07391102.2008.10507186.
37. Van der Kamp, M.W.; Mulholland, A.J. Combined Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. *Biochemistry***2013**, *52*, 2708–2728, doi:10.1021/bi400215w.
38. Lonsdale, R.; Ranaghan, K.E.; Mulholland, A.J. Computational enzymology. *Chem. Commun.***2010**, *46*, 2354–2372, doi:10.1007/978-1-62703-017-5-4.
39. 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. *J. R. Soc. Interface***2008**, *5*, S207–S216, doi:10.1098/rsif.2008.0243.focus.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## CAPÍTULO 3

### ARTIGO 2

Development of technologies applied to the biodegradation of warfare nerve agents:  
theoretical evidence for asymmetric homogeneous catalysis

*Published in **Chemico-Biological Interactions** 308 (2019) 323–331*

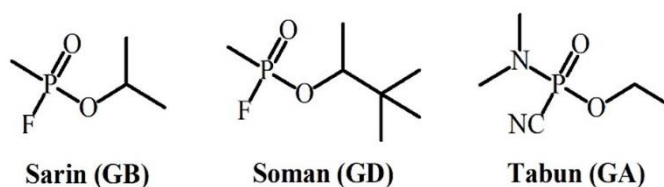
DOI: 10.1016/j.cbi.2019.06.007

**Abstract:** Organophosphorus compounds have been widely employed to the development of warfare nerve agents and pesticides, resulting in a huge number of people intoxicated annually, being a serious problem of public health. Efforts worldwide have been done in order to design new technologies that are capable of combating or even reversing the poisoning caused by these OP nerve agents. In this line, the bioremediation arises as a promising and efficient alternative for this purpose. As an example of degrading enzymes, there is the organophosphate-degrading (OpdA) enzyme from *Agrobacterium radiobacter*, which has been quite investigated experimentally due to its high performance in the degradation of neurotoxic nerve agents. This work aims to look into the structural and electronic details that govern the interaction modes of these compounds in the OpdA active site, with the posterior hydrolysis reaction prediction. Our findings have brought about data about the OpdA performance towards different nerve agents, and among them, we may realize that the degradation efficiency strongly depends on the nerve agent structure and its stereochemistry, being in this case the compound Tabun the one more effectively hydrolyzed. By means of the chemical bonds (AIM) and orbitals (FERMO) analysis, it is suggested that the initial reactivity of the OP nerve agents in the OpdA active site does not necessarily dictate the reactivity and interaction modes over the reaction coordinate.

**Keywords.** OpdA enzyme, warfare nerve agents, docking, QM/MM, AIM, FERMO

## 1 Introduction

High exposures to organophosphorus (OP) pesticides have been a worldwide problem, resulting in the deaths of thousands of people. According to the World Health Organization (WHO), about 3.000.000 people are poisoned by pesticides annually in underdeveloped countries, most of them by OP pesticides, resulting in more than 250.000 deaths [1,2]. Another OP compounds class capable of mass destruction in a quick and efficient manner, is defined as chemical warfare weapons, such as Sarin (GB), Soman (GD) and Tabun (GA) (Figure 1) [3]. Not so far, Sarin has been used in terrorist attacks in Syria, with more than 3.600 victims [4].



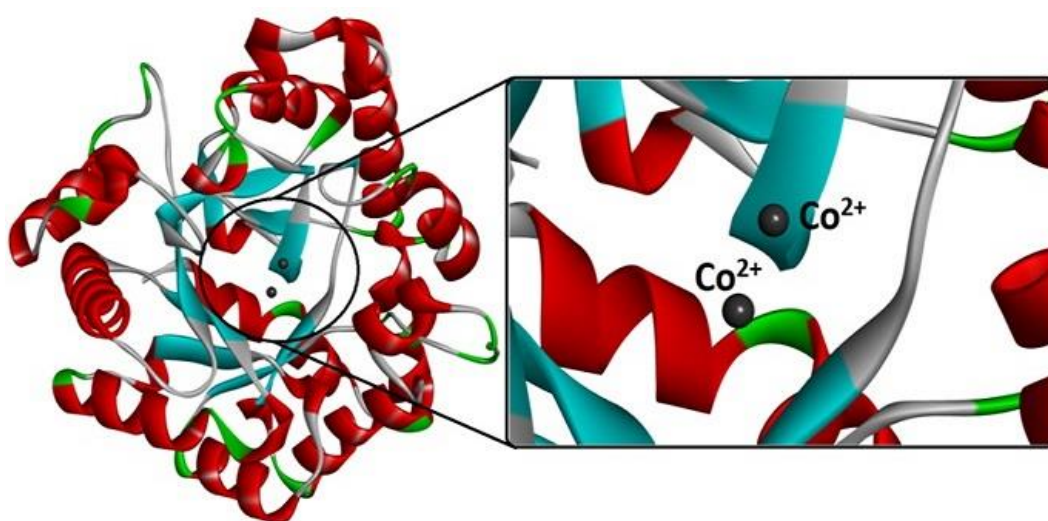
**Figure 1.** Structures of organophosphorus neurotoxic agents.

OP compounds are capable of irreversibly inhibiting the Acetylcholinesterase (AChE) enzyme by binding to Ser203 amino acid residue present at its active site [5,6]. The human AChE is an enzyme belonging to the cholinesterase family, being responsible for the finalization of the transmission of nerve impulses in the cholinergic synapses by the hydrolysis of the acetylcholine (ACh) neurotransmitter; its active site contains the catalytic triad Ser203-His447-Glu334 [7]. The reaction between OP neurotoxic agents and AChE interrupts the hydrolysis of the ACh, resulting in a cholinergic syndrome as a consequence of the accumulation of ACh in its receptors [8]. It is known that the spontaneous reactivation process of the enzyme is inefficient due to the strong covalent bond formed between the atoms of phosphorus (from the OP) and oxygen (from the Ser203 residue); however, this process can be sped up by the administration of a strong nucleophile, such as pyridine aldoximes, which are capable of removing the phosphate group bonded to Ser203 and reactivating the inhibited enzyme [9]. However, the efficacy of these antidotes is limited because an oxime can be extremely effective in reactivating the AChE inhibited by one neurotoxic agent, but at the same time, completely ineffective against another [10].

The decontamination process of OP with the usage of degrading enzymes can be very effective as long as the enzyme-OP complex has not yet been formed [11,12]. Specifically, the

two known bacterial OP hydrolases, OPH from *Pseudomonas aeruginosa* and OpdA from *Agrobacterium radiobacter*, have been shown to be highly promising in previous studies [2,13]. In addition to being highly effective, OPH and OpdA enzymes hydrolyze OP leading to the formation of low toxicity products [14].

OpdA has an amino acid sequence very similar to OPH, sharing 91% of sequence homology, with 20 additional amino acid residues [15,16]. Both enzymes possess catalytic activity with a variety of metals as cofactors ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) [16,17]. In this study, the OpdA enzyme has two cobalt ions located into the active site. The three-dimensional structure of OpdA from *A. radiobacter* (PDB ID: 2D2G; [2,18,19]) is shown in Figure 2.



**Figure 2.** Three-dimensional structure of the *A. radiobacter* OpdA degrading enzyme (PDB ID: 2D2G), highlighting the position of cobalt ions.

Two possible routes for the hydrolysis of OP compounds by the OpdA enzyme are known [19,20]. The first possible mechanism consists in the activation of a water molecule by the Asp301 amino acid residue, where a hydrogen atom is abstracted forming a hydroxide ion, coordinated to the metal ion, which later attacks the phosphoric center of the nerve agent (Mechanism 1). In the second possible route, Asp301 directly attacks the central phosphorus atom, promoting the expulsion of the leaving group, thus cleaving the compound (Mechanism 2). Both mechanisms proceed *via* bimolecular nucleophilic substitution ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) [12].

In the present work, theoretical calculations were performed in order to evaluate the interaction modes among the compounds Sarin, Soman and Tabun, considering their  $R_P$  and  $S_P$  enantiomers, within the OpdA enzyme active site. To this end, molecular docking techniques and hybrid quantum and molecular mechanics (QM/MM) approach were employed for reaction

mechanism simulations. It is quite important to keep in mind that, to design new and selective organophosphorus degrading agents, it becomes necessary the understanding of the hydrolysis reaction mechanism, as well as taking into account the steric and electronic effects that govern the reaction process. Thus, the search for more efficient remediation techniques, for example, through the reengineering of enzymes (structural enzymatic modifications), can potentially benefit from these computational strategies, allowing for the organophosphorus degradation process to be more efficient.

## 2 Material and methods

### 2.1 Docking Procedure

For the docking simulation, the nerve agents Tabun, Soman and Sarin were used to perform the calculations. The OP structures were constructed and optimized by using the Gaussian 09 software [21], at the density functional theory (DFT) level, with B3LYP density functional and 6-31g(d,p) basis set. The partial charges of the atoms were evaluated at the same level. The agents were docked inside the crystallographic structure of OpdA (PDB ID 2D2G; resolution = 1.85 Å), with mutation S92A [18], using the Molegro Virtual Docker<sup>®</sup> program (MVD) [22], considering the same procedures already employed in other works [23-26]. For the development of the docking method, it was considered a radius of 5 Å, where the residues were kept as flexible. Due to the nature of the docking methods, the calculations were carried out generating 50 poses (conformation and orientation) for each ligand. It is quite important to notice that the mutation S92A is found far away from the active site, not interfering in the results.

The MolDock scoring function employed in the MVD software 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 [27]. The docking scoring function values,  $E_{score}$ , are defined by Eq. 1:

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

Wherein:

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

$E_{inter}$  is the ligand-protein interaction energy.  $E_{PLP}$  (Eq. 2) represents “piecewise linear potential”, which consists in the use of two different parameter sets, as described forward: 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 ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) [22].

$E_{intra}$  (Eq. 3) 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, where  $\theta$  is the torsional angle of the bond. 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 smaller than 2.0 Å, not taking into account infeasible ligand conformations [22]. 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, allowing that way a fast and accurate identification of potential binding modes (poses) [22,28,29].

## 2.2 QM/MM method

For a small system, QM calculations can provide significant and reasonably accurate results for important properties, such as molecular structure, interaction energies and spectroscopic properties [30]. Combined QM/MM techniques allow the modeling of larger



systems, like reactions within enzymes, by combining the electronic degrees of a quantum chemical approach with the MM methods, increasing performance and decreasing computational demand [12]. Thus, in this contribution, QM/MM calculations combined with docking techniques were performed to determine the most likely reaction pathway for the OP degradation catalyzed by the OpdA enzyme, as tested previously for other systems [27,31-33]. In an attempt to get more accurate results and electronic effects, the QM part was carried out at the DFT level with the Gaussian 09 package [21]. DFT methods have been widespread, showing good performance for systems with thousands of atoms, such as biomolecules [33,34]. The calculations were based on the generalized gradient approximation functional proposed by Gustin and coworkers (B3LYP/6-31g(d, p)) [35]. A sequential QM/MM method was employed to perform this mechanism simulation. At first, MM calculations were performed for the whole system, by using the GROMOS force field (Molegro Virtual Docker® software) [22]. After this stage, the active site was cut off the enzyme in order to perform the QM calculations. By applying this technique, it is worth mentioning that there are no coupling-related problems between the QM and MM regions.

All transition states, intermediates and precursors involved were calculated and characterized by calculations identifying imaginary frequencies [36]. The QM system was composed by GA/GD/GB ( $R_P$  and  $S_P$ ), one water molecule, cofactors ( $\text{Co}^{2+}$ ), and the amino acid residues His55, His57, Gly60, Ser61, Val101, Ser102, Thr103, Ile106, Trp131, Phe132, His201, His230, Arg254, Tyr257, Leu 271, Asp301, Phe306, Tyr309, Ser308 and Leu303, which are found inside a sphere of  $5\text{\AA}$  centralized in the ligand. It is important to notice that inside this radius, all electronically important species were considered, such as the residues that carried out hydrogen bonds with the OP agents. A scheme containing the QM region can be seen in Figure 5.

The reaction mechanism calculations were carried out by constructing a potential energy curve based on the distance between the hydroxyl ion ( $\text{OH}^-$ ) and the OPs (central phosphorus) (Mechanism 1), and distance between the Asp301 and the OPs (central phosphorus) (Mechanism 2). From the potential energy curves, we selected the maximum point that stands for the transition state (TS), which presented a characteristic distance of the oxygen–phosphorus (O–P) bond. Frequency calculations were performed in order to characterize the TS for each reaction mechanism.

### 2.3 AIM calculations

AIM calculations (acronym for Bader's Theory of Atoms in Molecules [37]) are very important as an attempt to understand the nature of chemical bonds (for instance, if the bond is covalent, partially covalent or non-covalent). From these calculations, it is possible to characterize hydrogen bonds among the atoms involved and to investigate orbitals that are participating in this interaction with their respective energy values [38]. In the present work, AIM calculations were carried out for the neurotoxic agents Tabun, Sarin and Soman, taking into account their  $R_P$  enantiomers, which have a lower toxicity than the  $S_P$  enantiomers [12]. The most stable conformation of each agent in the OpdA active site was used to perform the calculations. Some important data to be mentioned is that the AIM simulation was accomplished prior to the reaction mechanism to take place. These calculations were carried out at the DFT level, with B3LYP density functional and 6-31g(d,p) basis set. This calculation level was also employed to perform the FERMO studies.

### 2.4 FERMO Analysis

The concept of Frontier Effective-for-Reaction Molecular Orbital (FERMO) has been introduced long ago [39]. This concept emerges as a powerful and innovative implement that allows the investigation of the role of molecular orbitals (MOs) applied to the description of breakage and formation of chemical bonds. The new standpoint to reaction mechanisms comes from MOs that govern the chemical reaction under study, i.e., the FERMO orbital of the respective reaction [39]. The contribution of an atom to an MO is calculated as the sum of the square of the expansion coefficients of the atomic orbitals centered on this atom [38]. This method has been employed in order to better evaluate the influence of MOs of each nerve agent, mainly in relation to the central phosphorus atom (LUMO orbitals), and predict the interaction with the enzyme in the degradation process. These calculations were performed for the same compounds employed in the AIM analysis, prior the reaction mechanism to take place.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Affinity: Molecular Docking

In order to investigate the affinity of each OP under study in the OpdA enzyme active

site, molecular docking calculations were performed by using the Molegro Virtual Docker<sup>®</sup> program [22]. The poses resulting from these calculations were selected considering the structural similarity with the active ligand (dimethylthiophosphate), as well as the interaction energy within the active site. The crystallized active ligand was used as a reference for these docking calculations, indicating the most probable region (active site) in which the compounds under study should be accommodated. It is known that the intermolecular interactions have an important role assisting the accommodation of the substrate into the enzyme active site, decreasing energy and increasing stability. By employing this methodology, it was possible to observe the formation of these interactions, among which it is possible to cite hydrogen bonds (H-bonds), electrostatic and hydrophobic interactions. Table 1 shows the molecular docking results.

**Table 1.** Molecular docking results of each nerve agent in the OpdA enzyme active site.

Ligand	Intermolecular interaction energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	Residues	H-bonds lengths (Å)	H-bonds energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
Sarin ( <i>R<sub>p</sub></i> )	-33.76	H <sub>2</sub> O	3.10	-2.50
		H <sub>2</sub> O	2.79	-2.50
		Tyr257	3.43	-0.87
		Arg254	2.62	-0.20
		Arg254	3.50	-0.07
Sarin ( <i>S<sub>p</sub></i> )	-35.34	H <sub>2</sub> O	3.09	-2.50
		Trp131	3.49	-0.06
Soman ( <i>R<sub>p</sub></i> )	-53.94	H <sub>2</sub> O	2.87	-2.50
		H <sub>2</sub> O	3.52	-0.42
		Arg254	2.50	-0.23
Soman ( <i>S<sub>p</sub></i> )	-30.02	H <sub>2</sub> O	2.96	-2.50
		H <sub>2</sub> O	3.10	-2.50
		Tyr257	3.08	-2.50
		Arg254	2.75	-0.29
Tabun ( <i>R<sub>p</sub></i> )	-27.57	H <sub>2</sub> O	3.09	-2.50
		H <sub>2</sub> O	3.10	-2.50
		H <sub>2</sub> O*	3.10	-2.50
Tabun ( <i>S<sub>p</sub></i> )	-35.52	H <sub>2</sub> O	2.60	-2.50

H <sub>2</sub> O	2.69	-2.50
Arg254	3.51	-0.32
Trp131	3.48	-0.16

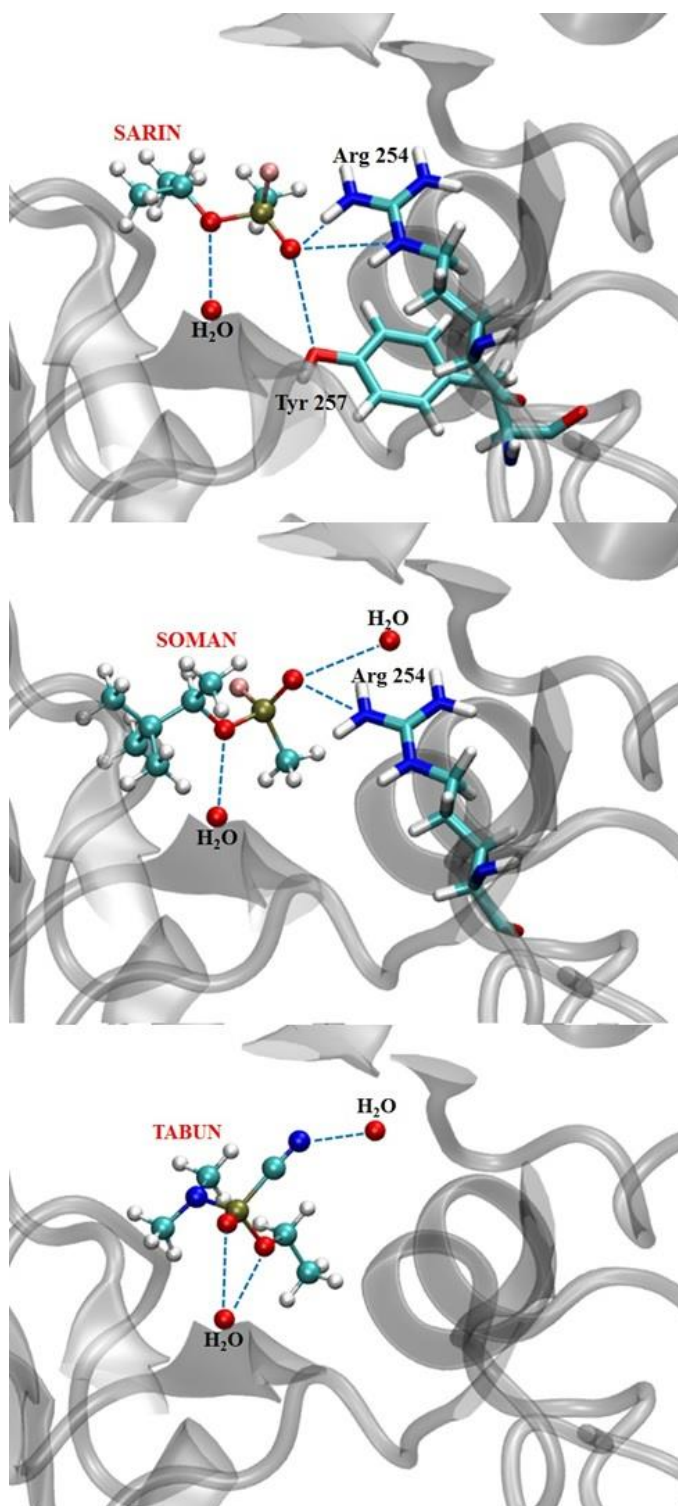
---

\* This refers to a second water molecule

For a better understanding of the accommodation of each ligand in the OpdA active site, intermolecular interactions performed by the OP nerve agents were analyzed. According to the results obtained (Table 1), it is easy to see that Soman (*R<sub>P</sub>* enantiomer) interacted more strongly with OpdA when compared to the other AChE inhibitors. With the energy value of -53.94 kcal mol<sup>-1</sup>, its stability is also favored by performing H-bonds with water molecules and Arg254.

The second compound with the best interaction energy value was Tabun, in the *S<sub>P</sub>* configuration, with energy equals to -35.52 kcal mol<sup>-1</sup>. In addition, various interactions with water molecules and amino acid residues (Arg254 and Trp131) also favored its stabilization in the OpdA active site. Interestingly, Sarin (*S<sub>P</sub>* enantiomer) presented an energy value very similar to Tabun, considering the same configuration, but with only one interaction with the Trp131 amino acid residue and one water molecule. It is believed that other structural and electronic properties are contributing to the stabilization of this compound in the active site. Such properties will be discussed ahead by employing other methodologies. The *R<sub>P</sub>* enantiomer of Sarin presented the fourth best energy value (-33.76 kcal mol<sup>-1</sup>). In this case, the stabilization of the compound is favored with two hydrogen bonds with one water molecule and three interactions with the Tyr257 and Arg254 amino acid residues present in the OpdA active site.

Posteriorly, it is given that Soman (*S<sub>P</sub>* enantiomer) and Tabun (*R<sub>P</sub>* enantiomer) presented higher energy values, being -30.02 kcal mol<sup>-1</sup> and -27.57 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. However, even with a higher interaction energy value, many interactions with water molecules and the Arg254 and Tyr257 residues were observed between Soman (*S<sub>P</sub>* enantiomer) and OpdA. Tabun (*R<sub>P</sub>* enantiomer), on the other hand, interacted with only water molecules, what could justify the least favorable interaction energy. In Figure 3, it is possible to observe all OP nerve agents considered here, in the *R<sub>P</sub>* conformations, and their intermolecular interactions performed in the OpdA active site.

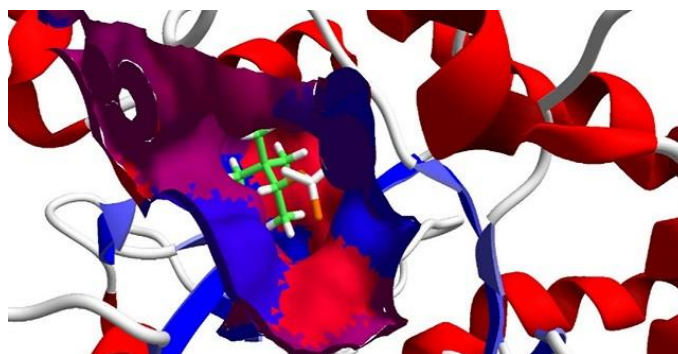


**Figure 3.** Intermolecular interactions performed by Sarin, Soman and Tabun (both in the  $R_p$  conformation), respectively, in the OpdA active site.

By analyzing the results described in Figure 3, it is given that the interactions between the OP compounds and OpdA basically consist of the amino acid residues Arg254, Tyr257, Trp131 and water molecules. Therefore, it is believed that these amino acids play an important

role in the degradation of OP compounds. Previous studies have stated that arginine at position 254 is essential for the enzyme to play its biological role [13]. In turn, Tyr257 residue provides a better interaction of the substrate within the active site, resulting in improved catalytic activity [40].

In Figure 4, it is demonstrated the docking of Soman ( $R_P$  enantiomer), which revealed the best interaction in the OpdA active site. As can also be seen, the active cavity presents hydrophobic and hydrophilic regions, allowing the performing of hydrogen bonds with amino acid residues and water molecules, as already presented, and hydrophobic interactions are likely to occur, dictating the conformation adopted by the compound after the docking process. In this case, it is possible to observe that this agent has large hydrophobic groups (represented in green). The best interaction energy does not mean necessarily a higher efficiency in the reaction mechanism. This is shown now in the next section.



**Figure 4.** Representation of hydrophobic interactions of Soman ( $R_P$  enantiomer) in the OpdA active site (the red surface shows strong hydrophobic zone and blue one the low hydrophobic zone, being the purple surface an intermediate hydrophobicity region).

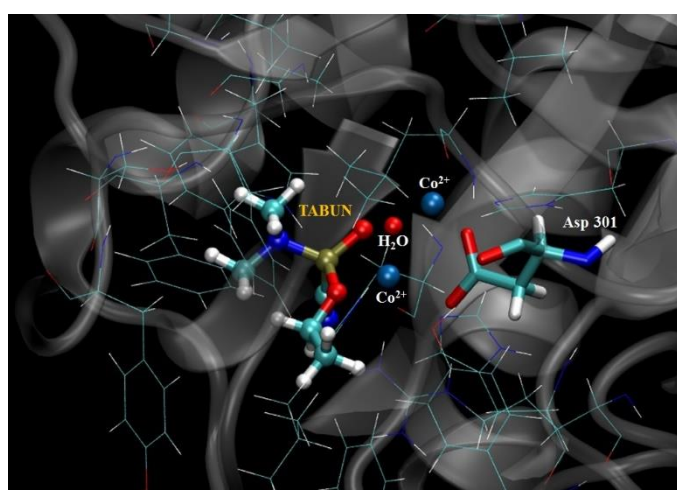
### 3.2 Mechanistic studies in the human OpdA active site

In order to design more promising organophosphorus degrading agents, it is essential a good comprehension of the reaction mechanism by which the hydrolysis process takes place. In this line, QM/MM techniques can be employed to have a better comprehension of the interaction and reactional modes between OP and OpdA [23]. This work brings about important data with respect to the OpdA reaction mechanism in the hydrolysis. The theoretical results of this simulation are in Table 2.

**Table 2.** Relative activation energy in the degradation process of different nerve agents by OpdA.

Nerve agent	Enantiomers	Mechanism 1	Mechanism 2
		$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<i>Sarin</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	9.28	10.74
	<i>S<sub>P</sub></i>	0.00	3.73
<i>Soman</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	32.69	27.49
	<i>S<sub>P</sub></i>	17.75	28.33
<i>Tabun</i>	<i>R<sub>P</sub></i>	8.20	26.46
	<i>S<sub>P</sub></i>	13.24	20.75

To carry out these calculations, the reaction mechanism was simulated by employing two different pathways, as discussed previously (see Figure 6). According to Figure 5, the metal has a key role in this process, being directly involved in the water molecule activation step, allowing the formation of a hydroxyl ion that could attack the central P atom in the OP nerve agent. One important aspect evaluated in this work was the stereochemistry of the compounds, because one enantiomer could be favorably degraded in relation to other, as can be observed in the performance of other degrading enzymes [23].



**Figure 5.** QM reactional system for the Tabun degradation with all residues in a radius of 5 Å.

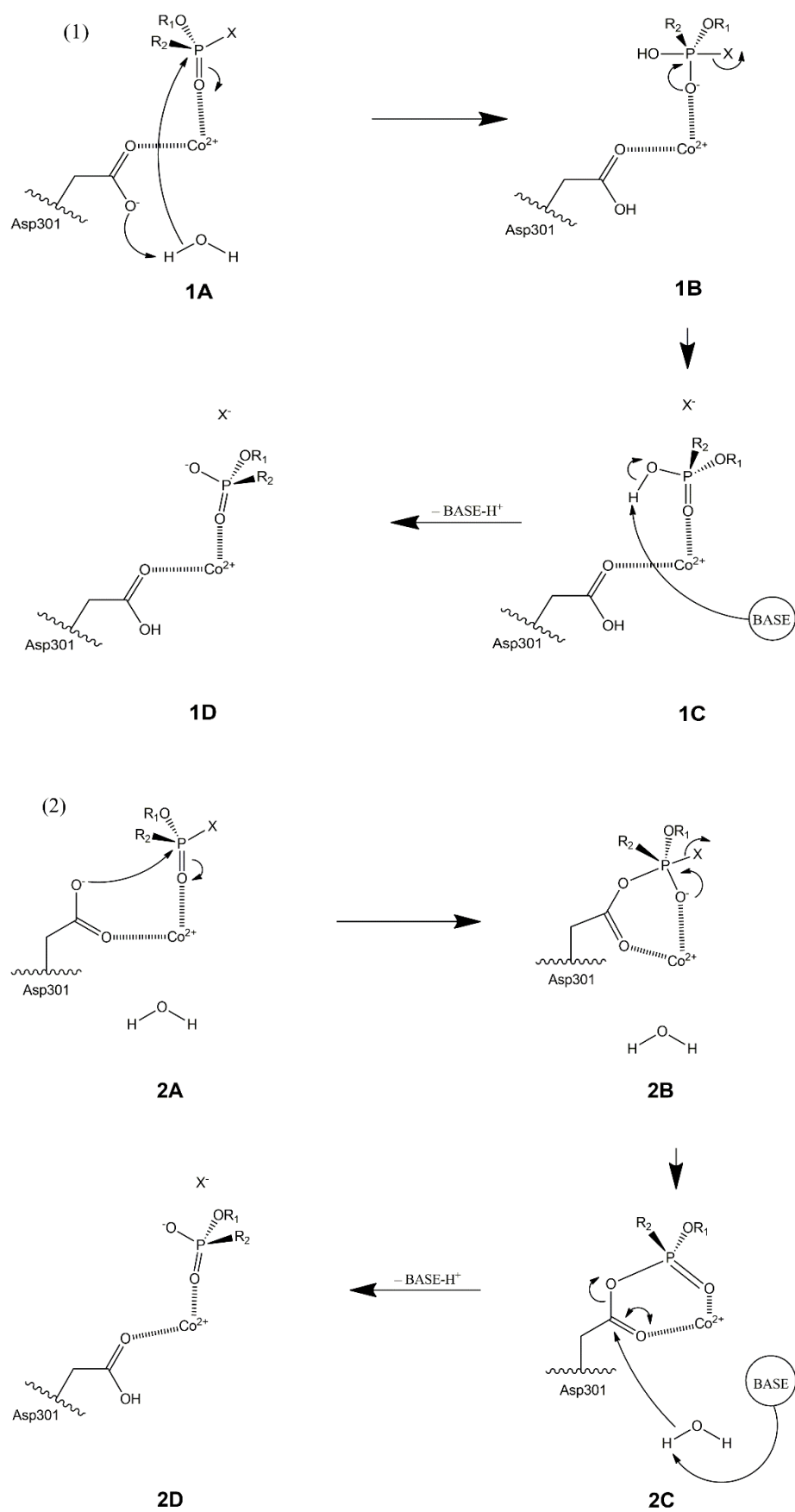
Table 2 shows the relative activation energy values,  $\Delta\Delta E^\ddagger$ , found for the *R<sub>P</sub>* and *S<sub>P</sub>* enantiomers of the OP nerve agents. These energy values were calculated at the DFT level from the QM region. Experimental works are found in the literature, and they have been performed

in order to find novel technologies able to remedy the intoxication caused by these quite toxic compounds, including other warfare nerve agents and OP pesticides. This field is expanding, and these works show its importance, mostly due to recent cases of use of these neurotoxic compounds [4].

The experimental investigation performed by Dawson and co-workers [41] highlighted significant data about the performance of OpdA enzyme in the degradation of nerve agents. According to their results, the agent Tabun is more efficiently degraded in relation to Sarin and Soman, with a catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) equals to  $1.03 \pm 0.07 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Posteriorly, OpdA presents the higher  $k_{\text{cat}}/K_m$  for Sarin degradation ( $4.16 \pm 0.20 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). At last, this enzyme was relatively inefficient in degrading Soman, with a  $k_{\text{cat}}/K_m$  value of  $4.62 \pm 0.76 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  [41]. Our deeper theoretical study allowed us to figure out important aspects that govern the OpdA performance on these agents by means of diverse computational methodologies, also allowing us to have a better comprehension of this enzyme in the bioremediation process.

According to the reaction mechanism data given in Table 2, it is clear that the theoretical results of activation energy for the degradation pathway are quite in a good agreement with the experimental results, taking into account the  $R_P$  enantiomers, which are usually less toxic (*via* Mechanism 1) [42]. As can be observed, two possible mechanism pathways were looked into, and the results suggest that both mechanisms are possible to occur; however, it is suggested that the degradation mechanism should take place preferentially by Mechanism 1 (Figure 6), which presented the lowest activation energy in most cases. The scheme for both mechanisms is represented next.

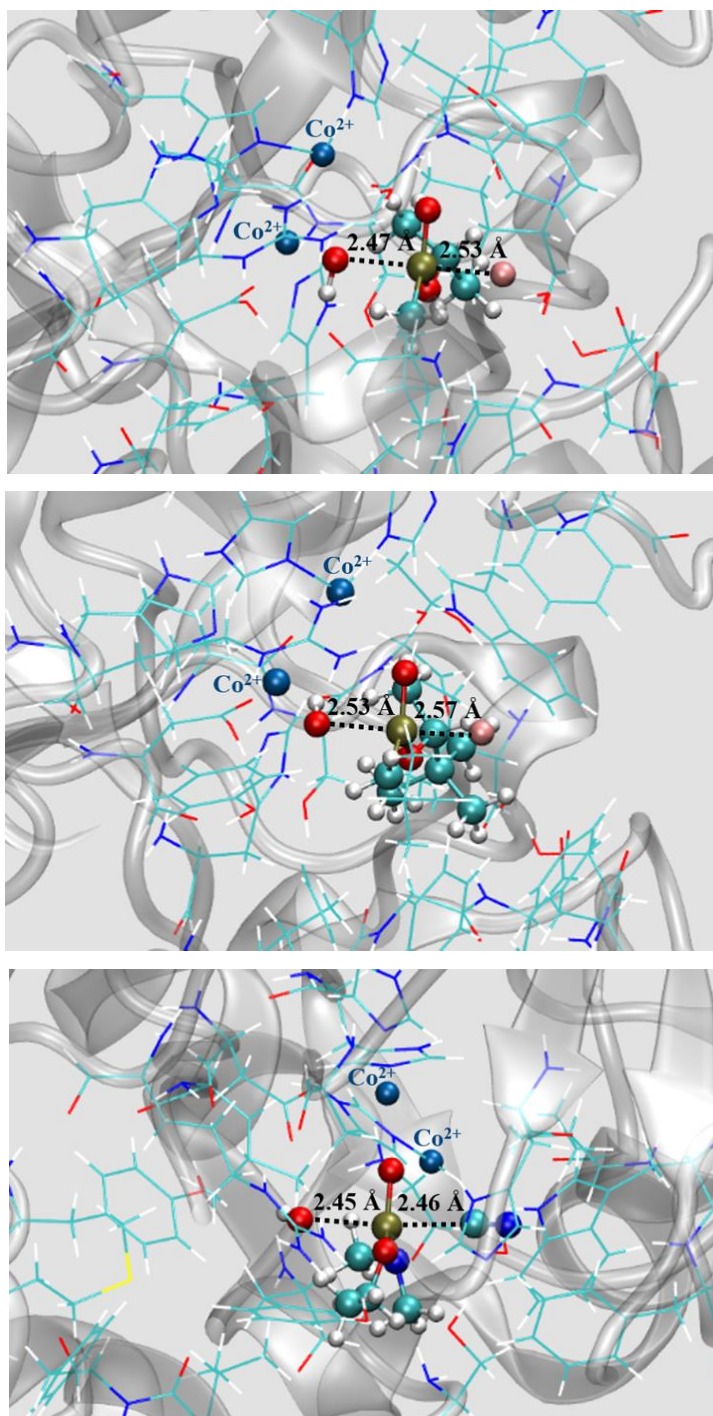




**Figure 6.** Schemes of Mechanisms 1 and 2 in the degradation of neurotoxic agents;

This trend could be possibly explained by structural aspects, i.e., in Mechanism 1, a hydroxyl ion formed acts as the nucleophile, which could attack more easily the central phosphorus atom in the OP nerve agent, with less steric hindrance. On the other hand, Mechanism 2 has the aspartate ion as a nucleophile, which could significantly increase the steric hindrances due to its larger group. For Soman ( $R_P$  enantiomer), Mechanism 2 was slightly favored, with an energy difference of about  $5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , not so expressive.

It is important to notice that Tabun, the best substrate for OpdA in this study (considering only the  $R_P$  enantiomers), has the cyanide portion as leaving group in the reaction mechanism (*via* bimolecular nucleophilic substitution –  $S_N2$ ), differently from Sarin and Soman, which have as leaving group the fluorine atom. The neurotoxic agents Sarin and Soman have very similar structures, as can be seen in Figure 1, being the only difference in the alkyl group. Soman has a bulkier alkyl group, and this fact helps us to understand the lower performance of the enzyme in the hydrolysis of this compound, mostly due to the increased steric congestion around phosphorus, which causes the energy barrier height to grow up. In turn, Sarin has a smaller alkyl group, allowing for an easier arrival of the nucleophile at the central phosphorus. Some key TS geometries are shown next (Figure 7).



**Figure 7.** TS geometries for  $S_N2$  reaction mechanisms in the OpdA active site, for Sarin, Soman and Tabun, respectively.

In Figure 7, the TS geometry is highlighted for all substrates ( $R_P$  enantiomers), considering Mechanism 1. It is possible to notice that these TS geometries present specific characteristics depending on the structural composition of the OP nerve agent. For Tabun, the TS geometry showed shorter nucleophile-phosphorus distance, suggesting a more stabilizing

interaction. Regarding Sarin and Soman, these agents have the same leaving group, fluorine. In this line, the steric bulk should account for the differences in reactivity between them. Soman showed the largest nucleophile-phosphorus distance, due to the more significant steric congestion around phosphorus, caused by the presence of bulkier groups. These bulkier groups lead to a higher reactional barrier and more destabilizing TS. All OP agents adopted a pentacoordinate TS geometry, but for Soman, for instance, there is a larger and more destabilizing strain energy, in comparison to the other compounds. It is worth mentioning that the strain energy is the energy required to cause the reactants to distort.

Regarding Mechanism 1, the  $S_P$  enantiomer of Sarin revealed the lowest activation energy for the process, and Soman ( $R_P$  enantiomer) presented the highest energy, with a difference of 32.69 kcal mol<sup>-1</sup>. Our findings suggest that Sarin is preferentially degraded as  $S_P$  enantiomer, and this configuration allowed for an easier approximation of the nucleophile. It is noteworthy that the experimental studies were performed in a racemic mixture of each neurotoxic agent, not bringing about data about their stereochemistry. According to the reaction mechanism simulation, it is clear that the stereochemistry influences a lot in the degradation modes, and in this case, the hydrolysis of the  $R_P$  enantiomers of these compounds were fitted to the experimental results of catalytic efficiency. Another important fact that can be taken from this study, it is that this trend does not change in relation to Mechanism 2, maintaining the stereochemical preference for Sarin ( $S_P$  enantiomer). Finally, this simulation revealed that this stereochemical preference changes significantly for the other nerve agents, fact that is plausible to happen due to certain factors already discussed previously.

### 3.3 AIM and FERMO analysis

AIM calculations, as well as FERMO, were carried out with the substrate's conformation obtained after docking and prior to the reaction to take place, in order to raise insights about the initial reactivity of these agents. Our findings demonstrate that their initial reactivity does not necessarily dictate the interaction mode and reactivity over the reaction coordinate, due to electronic and structural changes that could be caused, for example, by the strain energy from steric bulk around phosphorus, along with the accomplishment of diverse intermolecular interactions, as discussed previously. The computed results by using the AIM methodology are described in Table 3. It is important to notice that for ionic character:  $\nabla^2\rho(r) > 0$ ;  $-G/V > 1$ ;  $G+V > 0$  and for covalent character:  $\nabla^2\rho(r) < 0$ ;  $-G/V < 1$ ;  $G+V < 0$  (Silva et al.,

2017). The AIM results are shown next.

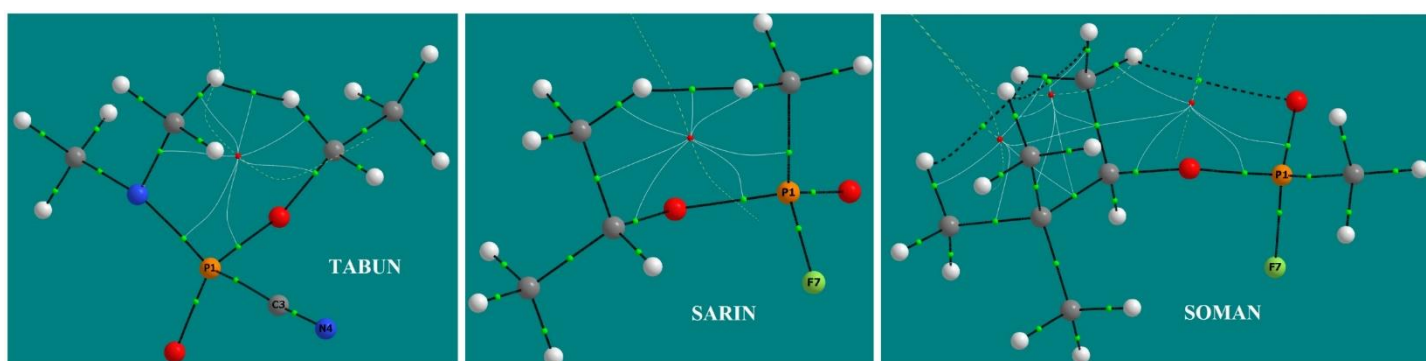
**Table 3.** The AIM B3LYP/ 6-31g (d, p) parameters, electron density ( $\rho(r)$ ), Laplacian ( $\nabla^2\rho(r)$ ), kinetic electron energy density ( $G(r)$ ), and potential electron energy density ( $V(r)$ ) for bond critical points (bcp) of the nerve agents ( $R_P$  enantiomer) chemical bonds with their leaving groups\*\*.

OP	$\rho(r)$ (a.u)	$\nabla^2\rho(r)$ (a.u)	$G(r)$ (a.u)	$V(r)$ (a.u)	$-G/V$	$G+V$
Tabun ( $R_P$ )	+0.1589	+0.1084	+0.1723	-0.3174	+0.5428	-0.1451
Sarin ( $R_P$ )	+0.1618	+1.0204	+0.3319	-0.4088	+0.8119	-0.0769
Soman ( $R_P$ )	+0.1628	+1.0416	+0.3370	-0.4135	+0.8150	-0.0765

\*\* Computed results were performed by using the AIM program

Immediately, after the docking of the neurotoxic compounds in the OpdA active site, an important characteristic was observed. By employing the AIM calculations, it was possible to evaluate the chemical bond character between the nerve agent and its leaving group, keeping in mind that the more ionic the character of the bond leads to an easier expulsion of the leaving group. In this line, according to the Table 3, it is possible to observe that the nerve agent Tabun has the most covalent chemical bond with its leaving group, the cyanide. Although this compound presents a stronger bonding with the leaving group, it is more efficiently degraded by the OpdA enzyme.

Regarding Sarin and Soman, they have a more ionic character between them and their leaving group, the fluorine, but as discussed previously, other factors could influence a lot in the reaction pathway, for instance, steric hindrance effects, not favoring the formation of the hydrolysis products. Their bcp's are represented in Figure 8.



**Figure 8.** Bond critical points for each nerve agent ( $R_P$  enantiomer) prior to the hydrolysis reaction to take place.

In the last step of this theoretical study, we have performed the FERMO analysis in order to evaluate the formation and behavior of the orbitals of each nerve agent in the OpdA active site (reactivity). The LUMO orbitals are very important in this kind of reaction, given that the charged nucleophile attacks to the central phosphorus atom in an *anti* position in relation to the leaving group. These orbitals are represented in Figure 9.



**Figure 9.** LUMO orbitals formation for each nerve agent ( $R_P$  enantiomer) prior to the hydrolysis reaction to take place.

After a deeper analysis of orbitals, the results suggest that the nerve agent Tabun has the most active LUMO orbital, with the minimum energy equals to  $-0.7287$  eV. On the other hand, Sarin and Soman presented very close energy values for the LUMO orbitals,  $1.2373$  eV and  $1.1489$  eV, respectively. This trend was expected, given that these nerve agents have exactly the same leaving group. This decreased energy value for Tabun could bring about significant contributions which could assist in a more effective degradation process. With all exposed so far, we can realize the importance of the bioremediation techniques to control and even reverse the intoxication caused by these neurotoxic compounds, and our theoretical studies are quite relevant to the comprehension and design of new remediation methods.

#### 4 Conclusions

This theoretical study has brought significant contributions for a deeper understanding of the performance of the biodegradation process of warfare nerve agents with the OpdA enzyme from *Agrobacterium radiobacter*. According to our findings, the neurotoxic agents studied here interacted very well in the OpdA active site, and diverse intermolecular interactions, such as hydrogen bonds, electrostatic and hydrophobic interactions, among others, assist in the good accommodation of these compounds in the active cavity. According to the reaction mechanism simulation, the hydrolysis reaction proceeds *via* both reaction pathways

evaluated here, but preferentially *via* Mechanism 1, which likely provides a smaller steric hindrance and the formation of more stable TS. Regarding the data obtained from the hydrolysis, it is noteworthy that our results are quite in agreement with the experimental data. At last, the AIM and FERMO analyses brought information about the reactivity of these neurotoxic agents before the beginning of the reaction process. Regarding this outlook, it is possible to conclude that although the agent presents a favorable initial reactivity in the enzyme active site, not necessarily this compound will be preferentially degraded, as can be observed for the case of Sarin and Soman, wherein Tabun is more efficiently hydrolyzed. The results also suggest that this hydrolysis reaction is asymmetric, and one stereoisomer is preferentially degraded. We strongly feel, then, that our findings might be helpful for understanding the biodegradation process and exploring protein engineering as well, contributing for the processes of enzymatic structural modification, aiming at more efficient biodegradations.

## **5 Conflicts of interest**

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

## **6 Acknowledgements**

This work was supported by 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) (financial support) and Federal University of Lavras (UFLA) (physical infrastructure and working space). The authors wish to thank to all of them.

## 7 References

- [1] Eddleston, Michael., 2019. Novel clinical toxicology and pharmacology of organophosphorus insecticide self-poisoning." *Annual review of pharmacology and toxicology* 59, 341–360.
- [2] de Castro, A.A., Prandi, I.G., Kuca, K., Ramalho, T.C., 2017. Organophosphorus degrading enzymes: Molecular basis and perspectives for enzymatic bioremediation of agrochemicals. *Ciência e Agrotecnologia* 41, 471–482.
- [3] Ganesan, K., Raza, S.K., Vijayaraghavan, R., 2010. Chemical warfare agents. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2, 166–178.
- [4] Pita, R., Domingo, J., 2014. The Use of Chemical Weapons in the Syrian Conflict. *Toxics* 2, 391–402.
- [5] Sidell, F.R., 1994. Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *J. Appl. Toxicol.* 14, 111–113.
- [6] Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T., Worek, F., 2005. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157, 345–347.
- [7] Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.-J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23, 181–199.
- [8] Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., 2008. Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch. Iran. Med.* 11, 65–89.
- [9] Lima, W.E.A. de, Pereira, A.F., Castro, A.A. de, da Cunha, E.F.F., Ramalho, T.C., 2016. Flexibility in the Molecular Design of Acetylcholinesterase Reactivators: Probing Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Lett. Drug Des. Discov.* 13, 360–371.
- [10] Goldsmith, M., Eckstein, S., Ashani, Y., Greisen Jr., P., Leader, H., Sussman, J.L., Aggarwal, N., Ovchinnikov, S., Tawfik, D.S., Baker, D., Thiermann, H., Worek, F., 2016. Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. *Arch. Toxicol.* 90, 2711–2724.
- [11] Nachon, F., Brazzolotto, X., Trovaslet, M., Masson, P., 2013. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem. Biol. Interact.* 206, 536–544.
- [12] 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. *Curr. Med. Chem.* 23, 1041–1061.
- [13] Pedroso, M.M., Ely, F., Mitić, N., Carpenter, M.C., Gahan, L.R., Wilcox, D.E., Larrabee, J.L., Ollis, D.L., Schenk, G., 2014. Comparative investigation of the reaction mechanisms of the organophosphate-degrading phosphotriesterases from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA) and *Pseudomonas diminuta* (OPH). *J. Biol. Inorg. Chem.* 19, 1263–1275.
- [14] Munro, N.B., Talmage, S.S., Griffin, G.D., Waters, L.C., Watson, A.P., King, J.F., Hauschild, V., 1999. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ. Health Perspect.* 107, 933–974.
- [15] Jacquet, P., Daudé, D., Bzdrenga, J., Masson, P., Elias, M., Chabrière, E., 2016. Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: special focus on hyperstable enzymes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8200–8218.
- [16] Yang, H., Carr, P.D., McLoughlin, S.Y., Liu, J.-W., Horne, I., Qiu, X., Jeffries, C.M.J., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., Ollis, D.L., 2003. Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.* 16, 135–145.
- [17] Scott, C., Pandey, G., Hartley, C.J., Jackson, C.J., Cheesman, M.J., Taylor, M.C., Pandey, R., Khurana, J.L., Teese, M., Coppin, C.W., 2008. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 65–79.
- [18] Jackson, C., Kim, H.-K., Carr, P.D., Liu, J.-W., Ollis, D.L., 2005. The structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1752, 56–64.
- [19] Jackson, C.J., Liu, J.-W., Coote, M.L., Ollis, D.L., 2005. The effects of substrate orientation on the mechanism of a phosphotriesterase. *Org. Biomol. Chem.* 3, 4343–4350.
- [20] Ely, F., Hadler, K.S., Mitić, N., Gahan, L.R., Ollis, D.L., Plugis, N.M., Russo, M.T., Larrabee, J.A., Schenk, G., 2011. Electronic and geometric structures of the organophosphatodegrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA). *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 777–787.
- [21] Frisch, M.J, Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A.H., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Fox, D., 2009. Gaussian 09 (Revision A02), Gaussian Inc. Wallingford CT.
- [22] Thomsen, R., Christensen, M.H., 2006. MolDock: A New Technique for High-Accuracy

Molecular Docking. *J. Med. Chem.* 49, 3315–3321.

[23] de Castro, A.A., Caetano, M.S., Silva, T.C., Mancini, D.T., Rocha, E.P., da Cunha, E.F.F., Ramalho, T.C., 2016. Molecular Docking, Metal Substitution and Hydrolysis Reaction of Chiral Substrates of Phosphotriesterase. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 19, 334–344.

[24] Guimaraes, A.P., Oliveira, A.A., da Cunha, E.F.F., Ramalho, T.C., Franco, T.C.C., 2011. Analysis of *Bacillus anthracis* nucleoside hydrolase via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. *J. Mol. Model.* 17, 2939–2951.

[25] 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. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1999–2004.

[26] Silva, M.C., Torres, J.A., Castro, A.A., Cunha, E.F.F. Da, Oliveira, L.C.A. De, 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34, 1839–1848.

[27] 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 195–207.

[28] 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 25, 377–385.

[29] 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 619–625.

[30] Jorgensen, W.L., 2013. Foundations of Biomolecular Modeling. *Cell* 155, 1199–1202.

[31] 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32, 301–307.

[32] 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. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 17, 554–564.

[33] Besler, B.H., Merz, K.M., Kollman, P.A., 1990. Atomic charges derived from

- semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 11, 431–439.
- [33] Ramalho, T.C., de Alencastro, R.B., La-Scalea, M.A., Figueroa-Villar, J.D., 2004. Theoretical evaluation of adiabatic and vertical electron affinity of some radiosensitizers in solution using FEP, ab initio and DFT methods. *Biophys. Chem.* 110, 267–279.
- [34] Singh, U.C., Kollman, P.A., 1984. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5, 129–145.
- [35] 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. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1756–1757.
- [36] Giacoppo, J.D.O.S., França, T.C.C., Ku, K., Cunha, E.F.F., 2014. Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 2048–2058.
- [37] Kumar, P.S.V., Raghavendra, V., Subramanian, V., 2016. Bader's Theory of Atoms in Molecules (AIM) and its Applications to Chemical Bonding. *J. Chem. Sci.* 128, 1528–1536.
- [38] Silva, T.C., de Almeida, K.J., dos Santos Pires, M., de Castro, A.A., Gonçalves, M.A., da Cunha, E.F.F., Ramalho, T.C., 2017. Theoretical structural and electronic analyses with emphasis on the reactivity of iron oxide prototypes in methane C–H bond activation. *React. Kinet. Mech. Catal.* 120, 195–208.
- [39] da Silva, R.R., Ramalho, T.C., Santos, J.M., Figueroa-Villar, J.D., 2006. On the limits of highest-occupied molecular orbital driven reactions: the frontier effective-for-reaction molecular orbital concept. *J. Phys. Chem. A* 110, 1031–1040.
- [40] Cho, C.M.H., Mulchandani, A., Chen, W., 2006. Functional analysis of organophosphorus hydrolase variants with high degradation activity towards organophosphate pesticides. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 99–105.
- [41] Dawson, R.M., Pantelidis, S., Rose, H.R., Kotsonis, S.E., 2008. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA). *J. Hazard. Mater.* 157, 308–314.
- [42] Sartorelli, J., de Castro, A.A., Ramalho, T.C., Giacoppo, J.O.S., Mancini, D.T., Caetano, M.S., da Cunha, E.F.F., 2016. Asymmetric biocatalysis of the nerve agent VX by human serum paraoxonase 1: molecular docking and reaction mechanism calculations. *Med. Chem. Res.* 25, 2521–2533.

## Conclusão

Tendo em vista que o cenário mundial ainda traz grandes preocupações com relação ao emprego de organofosforados como armas de guerra química, a comunidade científica concentra seus esforços em busca de técnicas de desintoxicação eficientes contra esses compostos. Sob essa perspectiva, as metodologias aplicadas nesse trabalho forneceram importantes informações acerca do processo de catálise enzimática. Segundo os resultados obtidos, observou-se que as enzimas DFPase e OpdA exibem contribuições significativas para melhor compreender o processo de biodegradação. Isso porque, foi possível avaliar a afinidade e reatividade dos OP Tabun, Soman, Sarin e Ciclosarin no sítio ativo das enzimas em questão. Onde foi constatado que as diferentes interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, eletrostáticas e hidrofóbicas, entre outras, auxiliaram na boa acomodação desses compostos na cavidade ativa das enzimas. De acordo com a simulação do mecanismo de reação, a reação de hidrólise parece ser promissora, através das duas vias de degradação propostas e para ambas as enzimas, dependendo, apenas, da estrutura do OP e sua estereoquímica. Em relação aos dados obtidos, as metodologias aplicadas parecem ser adequadas, uma vez que existe concordância entre os resultados experimentais verificados na literatura e os teóricos encontrados neste trabalho. Assim, nossos achados podem ser úteis para explorar a engenharia de proteínas como uma ferramenta biológica considerável.