



**WILLIAN EDUARDO AMARAL DE LIMA**

**ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA A  
REATIVADORES DA ENZIMA  
BUTIRILCOLINESTERASE INIBIDA POR  
CICLOSARIN E SARIN**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**WILLIAN EDUARDO AMARAL DE LIMA**

**ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA A REATIVADORES DA  
ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASE INIBIDA POR CICLOSARIN E  
SARIN**

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

Orientador

Dr. Teodorico CastroRamalho

Coorientador

Dr. TanosCelmar Costa França

**LAVRAS - MG**

**2015**

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

Lima, Willian Eduardo Amaral de.

Análise multivariada aplicada a reativadores da enzima  
butirilcolinesterase inibida por ciclosarin e sarin / Willian  
Eduardo Amaral de Lima. Lavras:UFLA, 2015.

108 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal  
de Lavras, 2015.

Orientador(a): Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Butirilcolinesterase. 2. Oximas. 3. Organofosforados. 4.  
Modelagem Molecular. 5. Quimiometria. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**WILLIAN EDUARDO AMARAL DE LIMA**

**ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA A REATIVADORES DA  
ENZIMA BUTIRILCOLINESTERASE INIBIDA POR CICLOSARIN E  
SARIN**

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2015.

Dr. Marcelo Henrique dos Santos	UFV
Dr <sup>a</sup> . Daiana Teixeira Mancini	UFLA
Dr <sup>a</sup> . Elaine Fontes Ferreira da Cunha	UFLA

Dr. Teodorico C. Ramalho  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

À minha família, pelo incentivo e por me orientar a seguir a vida sempre com coragem e retidão.

Em especial ao meu orientador, Professor Teo, pelos ensinamentos de química e por ter me acompanhado em meus trabalhos.

Aos meus amigos do Laboratório de Modelagem Molecular (Era do Gelo), pelo companheirismo.

Com grande sinceridade, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Tanos, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Cleiton Nunes pelos ensinamentos de Quimiometria.

Minha sincera gratidão aos membros avaliadores deste trabalho, Profa. Elaine, Profa. Daiana e Prof. Marcelo, por aceitarem o convite de participação e suas contribuições.

Aos amigos que me acompanharam na reta final, Rennê Fonseca, Ricardo Resende e Magnum Alves que também participaram ativamente no design da apresentação.

## RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é a enzima responsável pela segunda parte da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A reação entre o resíduo de Ser198 do sítio ativo da BChE humana (*HssBChE*) e agentes neurotóxicos resulta na inibição desta enzima da mesma forma como acontece com a enzima acetilcolinesterase humana (*HssAChE*), cuja reação com os neurotóxicos pode levar a uma inibição irreversível e resultar na chamada síndrome colinérgica. Para evitar isto, é necessário um nucleófilo, como uma oxima, cujo grupo hidroxila é capaz de remover o neurotóxico do sítio ativo e reativar a *HssBChE* ou a *HssAChE*. Neste trabalho, aplicamos uma metodologia teórica envolvendo ancoramento molecular, análise dos componentes principais (ACP) e estudo por teoria do funcional de densidade (TFD), usando os programas Molegro<sup>®</sup>, Spartan<sup>®</sup>, Gaussian09W, STATISTICA e MatLab para avaliar a capacidade de reativação da *HssBChE* inibida pelos neurotóxicos sarin (GB) e ciclosarin (GF) por duas novas oximas, uma no estado neutro e a outra carregada positivamente, comparando energia de interação, forças das ligações hidrogênio e resíduos de aminoácidos que interagem com a oxima, estabilizando sua entrada no sítio ativo da *HssBChE*. Os resultados do ancoramento foram tratados quimiometricamente usando o método de análise multivariada ACP como objetivo de selecionar conformeros estáveis para o estudo do mecanismo molecular. Os resultados sugerem que as poses localizadas no intervalo de  $\pm 0,2$  U.A. (unidade arbitrária) entre as duas primeiras componentes principais são as mais indicadas para se realizar o mecanismo de reação. Todos os conformeros selecionados pelo método multivariado foram reativos quando realizado o mecanismo reacional. Os gráficos onde as curvas de energia potencial (CEP) demonstraram que para o GB as oximas *I* e *II* formaram estados de transição (ET) do tipo poço-duploque é caracterizado por um estado intermediário de transição (preET), um estado de transição principal (ET principal) e, também, um ET posterior (posET). Já para o GF, as oximas *I* e *II* formaram ET do tipo poço-triplo que é assinalado por dois estados intermediários preET, um ET principal e dois posET. Nossos resultados apresentaram uma boa correlação entre as energias livres de ligação e dados experimentais das oximas e sugerem que a oxima *II* é mais eficiente para ambos neurotóxicos, pois o ataca a uma maior distância, cerca de 7 Å. Além disso, a sua geometria molecular e a carga positiva propiciaram uma maior estabilização no sítio ativo da *HssBChE*, facilitando assim sua entrada e, conseqüentemente, a reação com o neurotóxico.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase. Oximas. Ancoramento. Mecanismo de Reação. Organofosforados e Quimiometria.

## ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE) is the enzyme responsible for the second part of the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine (ACh). The reaction between the Ser198 residue of the active site of human BChE (*HssBChE*) and neurotoxic agents results in the inhibition of this enzyme in the same manner as with human acetylcholinesterase (*HssAChE*), of which reaction with the neurotoxic agents can lead to an irreversible inhibition, resulting in the so-called cholinergic syndrome. To avoid this, a nucleophile is necessary as an oxime, of which hydroxyl group is capable of removing the neurotoxic from the active site and reactivate the *HssBChE* or *HssAChE*. In this work, we applied a theoretical method involving molecular anchoring, principal component analysis (PCA) and study by density functional theory (DFT), using the Molegro<sup>®</sup>, Spartan<sup>®</sup>, Gaussian 09W<sup>®</sup>, STATISTICA<sup>®</sup> and MatLab<sup>®</sup> programs to assess the reactivation capacity of the *HssBChE*, inhibited by the serin (GB) and ciclosarin (GF) neurotoxic agents, with two new oximes, one in the neutral state and the other, positively charged. We also compared the interaction energy, hydrogen bonding and amino acid residues that interact with the oxime, stabilizing its entrance in the active site of the *HssBChE*. The docking results were chemiometrically treated using the ACP multivariate analysis in order to select stable conformers for studying the molecular mechanisms. The results suggest that poses located in the interval of  $\pm 0.2$  AU (arbitrary unit) between the first two principal components are the most suitable to perform the reaction mechanism. All conformers selected by the multivariate method were reactive when conducting the reaction mechanism. The graphs of potential energy curves (PEC) demonstrated that, for the GB, oximes *I* and *II* formed transition state (TS) of the double-well type, which is characterized by an intermediate transition state (preTS), a principal TS (principal TS) and a post TS (postTS). For the GF, oximes *I* and *II* formed a triple-well type TS, which is marked by two intermediate state preTS, a principal TS and two postTS. Our results presented good correlation between the free binding energies and the experimental data of the oximes, suggesting that oxime *II* is more efficient for both neurotoxic, since it attacks from a greater distance, of about 7 Å. Furthermore, the molecular geometry and the positive charge provided higher stabilization in the active site of the *HssBChE*, thus facilitating the entry and, consequently, the reaction with the neurotoxic.

Keywords: Butyrylcholinesterase. Oximes. Docking. Reaction mechanism. Organophosphate and chemometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas dos principais agentes neurotóxicos.....	22
Figura 2	Processo de inibição e reativação da AChE .....	23
Figura 3	Estruturas de algumas oximas comercializadas como antídotos contra agentes dos nervos .....	24
Figura 4	Cinética da reação entre uma oxima e a BChE inibida por um OP.....	26
Figura 5	Fluxograma genérico com os principais passos seguidos nos cálculos com a TFD.....	33
Figura 6	Representação do ancoramento de um ligante em uma proteína. V = favorável e X não favorável.....	36
Figura 7	Substituição S <sub>N</sub> 2. Nu: é um nucleófilo e I o grupo abandonador.....	39
Figura 8	Curva de energia potencial $\Delta E$ versus avanço reacional via reações do tipo S <sub>N</sub> 2: Poço Simples, Poço Duplo e Poço Triplo .....	41
Figura 9	Processo de ancoramento e reatividade de uma oxima na BChE ...	41
Figura 10	Ilustração de um esquema de análise do modelo de deformação da ligação química.....	43
Figura 11	Cavidade do sistema <i>Hss</i> BChE/GF .....	54
Figura 12	Ligações hidrogênio formadas entre as poses da oxima <i>I</i> de menor energia de interação e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do sistema <i>Hss</i> BChE/GF .....	56
Figura 13	Ligações hidrogênio formadas entre as conformações da oxima <i>II</i> e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>Hss</i> BChE/GF ....	57
Figura 14	Gráfico da explicação de proporção de variação de cada componente principal do sistema <i>Hss</i> BChE/GF/Oxima <i>I</i> .....	59

Figura 15	Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima I</i> ..... 60
Figura 16	Gráfico de explicação da proporção de variação de cada componente principal para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima II</i> ..... 61
Figura 17	Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima II</i> ..... 62
Figura 18	Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima I</i> ..... 64
Figura 19	Projeção CP1 vs CP2 para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima I</i> ..... 65
Figura 20	Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima I</i> .... 66
Figura 21	Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima II</i> ..... 67
Figura 22	Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima II</i> ..... 68
Figura 23	Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema <i>HssBChE/GF/Oxima II</i> ..... 69
Figura 24	Curva de variação da energia potencial $\Delta E$ ao longo da reação entre a oxima <i>I</i> e o sistema <i>HssBChE/GF</i> ..... 72
Figura 25	Contribuição das energias eletrônica e deformacional nos ET para as interações entre a oxima <i>I</i> e o complexo <i>HssBChE/GF</i> ..... 73
Figura 26	Curva de energia potencial $\Delta E$ ao longo da reação entre a oxima <i>II</i> e o complexo <i>HssBChE/GF</i> ..... 74
Figura 27	Contribuição das energias eletrônica e deformacional nos ET para as interações entre a oxima <i>II</i> e o complexo <i>HssBChE/GF</i> .... 75
Figura 28	Comparação entre as oximas <i>I</i> e <i>II</i> na formação do ET com a <i>HssBChE</i> inibida por GF ..... 76
Figura 29	Cavidade em estudo para o sistema <i>HssBChE/GB</i> ..... 77

Figura 30	Ligações hidrogênio formadas entre as poses de menor energia da oxima <i>I</i> e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do sistema <i>HssBChE/GB</i> .....	79
Figura 31	Ligações hidrogênio formadas entre as conformações da oxima <i>II</i> e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	81
Figura 32	Gráfico da explicação de proporção de variação de cada componente principal do sistema <i>HssBChE/GB/Oxima I</i> .....	82
Figura 33	Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações do sistema <i>HssBChE/GB/Oxima I</i> .....	83
Figura 34	Gráfico de explicação da proporção de variação de cada CP do sistema <i>HssBChE/GB/Oxima II</i> .....	84
Figura 35	Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações do sistema <i>HssBChE/GB/Oxima II</i> .....	85
Figura 36	Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima I</i> .....	87
Figura 37	Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima I</i> ....	88
Figura 38	Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima I</i> ....	89
Figura 39	Gráfico tridimensional das três primeiras componentes principais para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima II</i> .....	90
Figura 40	Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima II</i> ....	91
Figura 41	Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema <i>HssBChE/GB/Oxima II</i> .....	91
Figura 42	Superfície de energia potencial $\Delta E$ ao longo da reação entre a oxima <i>I</i> e o complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	94
Figura 43	Contribuição das Energias Eletrônica e de Deformação no ET da oxima <i>I</i> no interior do complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	95

Figura 44	Curva de energia potencial $\Delta E$ ao longo da reação entre a oxima <i>II</i> e complexo <i>HssBChE/GB</i> .....96
Figura 45	Contribuição das Energias Eletrônica e de Deformação no ET da oxima <i>II</i> no complexo <i>HssBChE/GB</i> .....97
Figura 46	Comparação entre as oximas <i>I</i> e <i>II</i> na formação do ET com a <i>HssBChE</i> inibida por <i>GB</i> .....98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados experimentais das oximas <i>I</i> e <i>II</i> reportados por Sit (2014). .....	27
Tabela 2	Valores de energia de encuramento entre os melhores confôrmeros da oxima <i>I</i> com o complexo <i>HssBChE/GF</i> .....	55
Tabela 3	Valores de energia de encuramento entre os melhores confôrmeros da oxima <i>II</i> e o complexo <i>HssBChE/GF</i> .....	56
Tabela 4	Valores de energia de encuramento das poses das oximas <i>I</i> e <i>II</i> escolhidas por ACP no complexo <i>HssBChE/GF</i> .....	70
Tabela 5	Valores de energia de encuramento entre as melhores confôrmeros da oxima <i>I</i> e o complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	78
Tabela 6	Valores de energia de encuramento entre as melhores poses da oxima <i>II</i> e o complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	80
Tabela 7	Valores de energia de encuramento das conformações escolhidas por ACP no complexo <i>HssBChE/GB</i> .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análise de Componentes Principais
Ala	Alanina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChE-OP	Acetilcolinesterase inibida por organofosforado
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
ET	Estado de transição
GB	Sarin
GF	Ciclosarin
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina
<i>HssAChE</i>	Acetilcolinesterase <i>Homo SapiensSapiens</i> (humana)
<i>HssBChE</i>	Butirilcolinesterase <i>Homo SapiensSapiens</i> (humana)
Ile	Isoleucina
Lis	Lisina
<i>MmAChE</i>	Acetilcolinesterase <i>Mus Musculus</i> (camundongo)
OP	Organofosforado
preET	Pré estado(s) de transição
postET	Posterior estado(s) de transição
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina

Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano

## LISTA DE SIGLAS

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
HF	Hartree-Fock
PM3	Método semiempírico de Química computacional
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
MVD	Molegro Virtual Docker
THI	Intermediáriotetraédrico
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteínas)
QM	Mecânica Quântica
MM	Mecânica Molecular
SM	Semiempírico
$K_i$	Constante de inibição
$K_D$	Constante de dissociação do complexo enzima-reativador
$K_R$	Constante de dissociação do complexo enzima inibida-reativador
$k_R$	Constante de velocidade de reativação de primeira ordem
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$K_i$	Constante de inibição



## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
Ψ	Psi
μM	Micromolar
K	Kelvin
nm	Nanômetro
mg	Miligramas
kg	Kilogramas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
2.1	Armas químicas, um breve histórico .....	20
2.2	Butirilcolinesterase.....	25
2.3	Química computacional: gênese e desenvolvimento .....	27
2.4	Métodos de cálculo: semiempírico e TFD.....	28
2.5	Ancoramento molecular .....	34
2.6	Mecanismos de reação.....	36
2.7	Energia de ancoramento vs reatividade.....	41
2.7.1	Modelo de deformação da ligação química via TFD ( <i>Activation strain model</i> ) .....	42
2.8	Quimiometria .....	44
2.9	Análise de componentes principais .....	46
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	50
4.1	Estruturas 3D das moléculas estudadas.....	50
4.2	Ancoramento molecular das estruturas.....	51
4.3	Mecanismo de reação .....	51
4.4	Análise multivariada .....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
5.1	<i>HssBChE</i> inibida por GF .....	53
5.1.1	Ancoramento Molecular .....	53
5.1.2	Seleção de estruturas.....	58
5.1.3	Seleção por frequência de ocupação .....	63
5.1.4	Mecanismo de reação .....	71
5.2	<i>HssBChE</i> inibida por sarin .....	77
5.2.1	Ancoramento Molecular .....	77
5.2.2	Seleção de estruturas.....	81
5.2.3	Seleção por frequência de ocupação .....	86
5.2.4	Mecanismo de reação .....	93
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

Os agentes de guerra química e biológica são classificados como armas não convencionais, de baixo custo, difícil detecção e capazes de causar um grande número de mortes, além de terem um alto potencial de uso por parte de grupos terroristas, independente do seu tamanho ou importância. Os ataques em 2013 na Síria, utilizando o agente neurotóxico sarin (GB), alertaram mais uma vez a opinião pública mundial e a comunidade científica quanto à utilização de armas químicas e/ou biológicas (GIACOPPO, 2014). Na atualidade, nenhum país do mundo encontra-se em condições ideais para enfrentar um ataque com armas desse tipo que, normalmente, requerem uma resposta rápida a fim de minimizar o espalhamento do agente, e, conseqüentemente, diminuir o número de baixas (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

Na Primeira Guerra Mundial, as armas químicas ganharam importância bélica, quando em 1915, o exército alemão utilizou 180 toneladas de gás cloro contra as tropas aliadas em Ypres, na Bélgica, ocasionando 15.000 vítimas, das quais 5.000 fatais. Ainda, durante a guerra surgiram novos agentes como o fosgênio, difosgênio, cianeto de hidrogênio, cloreto de cianogênio e o gás mostarda (SILVA et al., 2012) forçando o desenvolvimento de máscaras, que impediam a inalação dos gases tóxicos, e roupas de proteção para prevenir que os agentes atingissem o corpo por meio da pele.

Com o término da guerra (1918), o desenvolvimento de novos e mais agentes tóxicos de guerra química continuou, culminando com o surgimento dos agentes neurotóxicos no período entre 1936 e 1950. Os principais representantes desta classe são: somam (GD), tabun (GA), sarin (GB) e VX. Esses compostos são extremamente tóxicos e podem levar a vítima ao óbito em questão de minutos. São conhecidos como agentes dos nervos por agirem nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP). De fato, estes compostos são

potentes inibidores da butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE), enzimas responsáveis por realizar a hidrólise da butirilcolina (BCh) e acetilcolina (ACh) e, conseqüentemente, a terminação da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas. O acúmulo de BCh e ACh leva à chamada síndrome colinérgica, caracterizada por uma série de sintomas, sendo um deles a depressão do centro respiratório, podendo levar à morte em poucos minutos dependendo do nível de intoxicação (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010). Uma recente estratégia na intoxicação por agentes dos nervos consiste na administração da enzima BChE complexada com a devida oxima para sequestrar parte do fósforo, limpando a fenda sináptica diminuindo, assim, a inibição das enzimas colinérgicas. No entanto, a limpeza ocorre de forma lenta e propícia ao envelhecimento (sem possibilidade de reativação). A melhoria na taxa de reativação por novas e mais eficientes oximas poderia contribuir para atenuar esse problema e aumentar a eficiência da *HssBChE* como removedor de OP (CERASOLI et al., 2005).

Embora existam programas de defesa contra armas químicas, os antídotos existentes apresentam muitas limitações e, ainda, existem grandes estoques destas armas em diversos países. Essas armas constituem, portanto, uma ameaça real, fato que justifica a busca e o desenvolvimento de antídotos mais eficientes, principalmente, contra os neurotóxicos. A química computacional contribui de forma significativa nesses estudos, tendo em vista a dificuldade de se testar esses compostos em humanos. Além disso, ela propicia uma grande economia de recursos financeiros com reagentes e materiais bem como o ganho de tempo na busca por antídotos mais eficazes (COCHRAN et al., 2011).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Armas químicas, um breve histórico

Agentes químicos de guerra são definidos como quaisquer substâncias químicas utilizadas com a finalidade principal de matar, ferir ou incapacitar indivíduos, animais ou plantas (SILVA et al., 2012) e relatos de seu uso vêm desde a antiguidade (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

Ilustrando o uso desses agentes em guerras, podemos citar:

- a) Em 600 a.C, os atenienses envenenaram as águas do rio Cefiso com raízes de Heléboro provocando intenso mal estar e diarreias nos soldados do exército de Pístrato que consumiram suas águas (SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997; SMART, 1996).
- b) Nas batalhas de Plateia e Délio, durante a Guerra de Peloponeso (431 – 404 A.C), os espartanos utilizaram o fogo grego, uma mistura de piche e enxofre em chamas (SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997; WHEELIS, 2002).
- c) Em 190 a.C, na batalha de Eurimedon, Aníbal, considerado por muitos como um dos maiores táticos militares da história, lançou vasos contendo cobras venenosas nos navios Romanos de Pérgamo (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).
- d) Em 200 a.C, os cartagineses utilizaram raízes do gênero mandrágora, cujos princípios ativos são a escopolamina e a atropina, ambos alcaloides da família do tropano, para contaminar o vinho e intoxicar seus inimigos (SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997; SMART, 1996).

- e) Entre os séculos V e VX, intensificou-se a utilização de armas não convencionais nas batalhas, embora ainda de maneira bastante rudimentar. A dinastia Sung na China utilizou gases à base de arsênio em batalhas entre anos de 960 e 1279. Os povos Tupinambás do nordeste do Brasil Colonial desenvolveram uma forma bem rudimentar de gás lacrimogênio, utilizando pimenta que, ao ser queimada a favor do vento, forçava seus inimigos a abandonar posições defensivas (URBAN, 1992; PINTO, 1935).

Apesar das armas químicas serem utilizadas desde a antiguidade, pode-se dizer que, na verdade, a guerra química moderna teve início na Primeira Guerra Mundial, em 15 de abril de 1915, quando os alemães utilizaram dezenas de toneladas de gás cloro contra as tropas aliadas em Ypres, na Bélgica (SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997). Vários ataques com agentes químicos por ambos os lados em conflito se seguiram ao de Ypres incluindo, além do cloro, também o fosgênio e o agente mostarda (SILVA et al., 2012). Esses acontecimentos levaram ao desenvolvimento das primeiras máscaras contra gases e, conseqüentemente, ao surgimento de novos agentes cujas propriedades físico-químicas dificultassem a sua retenção pelas máscaras. Ao final da Guerra, a utilização de agentes químicos resultou em, aproximadamente, 100 mil mortes e 1,3 milhões de feridos (GONÇALVES, 2009).

Na década de 30, o pesquisador alemão Gerhard Schraeder, ao pesquisar inseticidas com base em uma estrutura organofosforada, chegou aos compostos *o*-etil-*N*, *N*-dimetil-fosforoamida-cianidato (GA) e *o*-isopropil-metil-fosfonofluoridrato (GB). Em razão de sua alta letalidade para mamíferos, esses compostos logo foram descartados como potenciais insumos agrícolas. Todavia pesquisadores e militares alemães enxergaram as substâncias tóxicas como agentes de guerra e logo começaram a estudar, fabricar e estocar os

compostos. Em 1944, foi sintetizado pelo pesquisador Richard Kuhn, o *o*-pinacolil-metil-fosfono-fluoridrato, posteriormente conhecido como soman (GD). No início dos anos 50, foi sintetizado na Inglaterra o VX ou *o*-etil-*S*-[2-(di-isopropilamino)-etil]-metil-fosfonotiato, dando origem a uma nova classe de neurotóxicos, conhecida como série V, de *venomous* que significa venenosos. Os neurotóxicos dessa série são mais tóxicos e persistentes que os da série G e, conseqüentemente, muito mais letais.

Os neurotóxicos são inibidores irreversíveis extremamente tóxicos dos agentes anticolinesterásicos (PATOČKA et al., 2005). Eles são capazes de depositar um grupo fosforilno sítio ativo da AChE e BChE, resultando em um acúmulo do neurotransmissor ACh e BCh, na conseqüente ativação descontrolada das sinapses colinérgicas (EDDELSTON et al., 2002). As estruturas dos principais neurotóxicos são apresentadas na Figura 1.

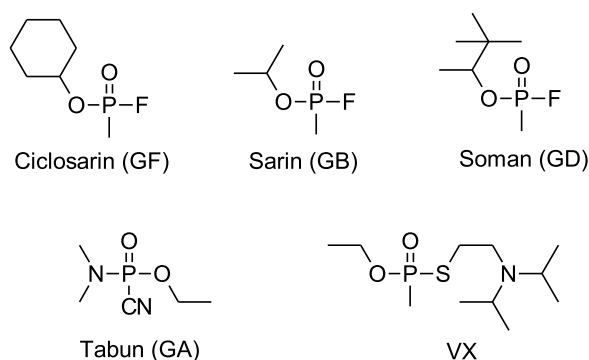


Figura 1 Estruturas dos principais agentes neurotóxicos

O acúmulo dos neurotransmissores ACh e BCh nas fendas sinápticas levam a uma hiperestimulação das estruturas enervadas pelas fibras colinérgicas (coração, glândulas e músculos lisos), provocando a chamada síndrome colinérgica que é caracterizada por tonturas, convulsões, micção involuntária,

diminuição do ritmo cardíaco, depressão respiratória, lacrimação, salivação, corrimento nasal, transpiração excessiva, ansiedade, fraqueza e cólicas. A morte normalmente ocorre poucos minutos após a exposição em virtude de uma disritmia que leva o miocárdio à falência. No entanto, se a vítima sobreviver aos efeitos da síndrome colinérgica, os efeitos da intoxicação são geralmente reversíveis e não deixam sequelas (GONÇALVES, 2009).

Antes do envelhecimento, a inibição da enzima pode ser revertida pela saída do grupo fosforilo ligado ao aminoácido serina, por meio de um nucleófilo, normalmente uma oxima pirimidínica, capaz de remover o agente neurotóxico e reativar a enzima, como mostra o esquema da Figura 2 para a enzima AChE, o mesmo esquema pode ser montado para a BChE, a única diferença que o fósforo estará ligado ao resíduo Ser198, enquanto da AChE no resíduo Ser203.

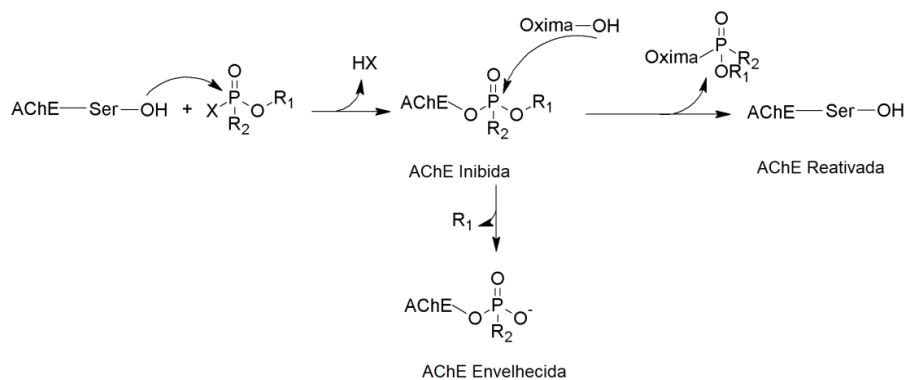


Figura 2 Processo de inibição e reativação da AChE

Legenda: R<sub>1</sub> = grupo alquila, O-alquila ou amida, R<sub>2</sub> = grupo O-alquila ou amida; e X = grupo abandonador.

Atualmente, o tratamento padrão contra neurotóxicos inclui a utilização de um anticolinérgico, Atropina intravenosa, por exemplo, para diminuir os efeitos da acumulação dos neurotransmissores combinados com um depressor do sistema nervoso central, como o Diazepan, para reduzir as convulsões e



espasmos musculares, e uma oxima catiônica (Figura 3) para reativar os agentes anticolinesterásicos. Essa combinação pode ser usada em seringas autoinjektoras que fazem parte dos kits de defesa contra agentes químicos atualmente em uso pelos exércitos de vários países (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

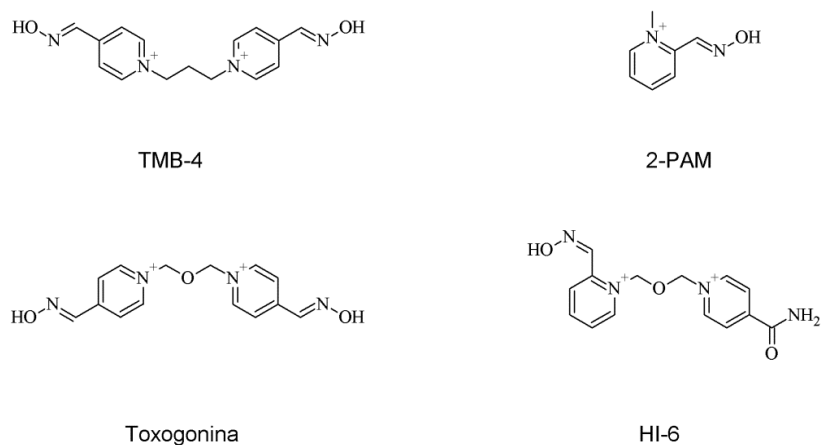


Figura 3 Estruturas de algumas oximas comercializadas como antídotos contra agentes dos nervos

Existem inúmeras oximas reportadas na literatura e disponíveis no mercado como antídotos contra neurotóxicos. Todavia ainda não foi encontrada uma oxima universal capaz de agir de maneira eficiente contra todos os neurotóxicos conhecidos. Normalmente, uma oxima é eficiente contra alguns neurotóxicos e completamente inútil contra outros (CASTRO; FIGUERO-VILLAR, 2002; WOREK et al., 2007). Uma explicação para esse fato só será possível quando houver um maior entendimento do mecanismo de ação, ainda desconhecido, desses compostos no sítio ativo da AChE.

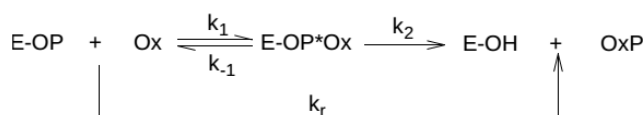
## 2.2 Butirilcolinesterase

Em bioquímica, colinesterase é um termo que se refere às duas enzimas que hidrolisam a acetilcolina, sendo elas a AChE, também chamada de colinesterase de glóbulo vermelho, existente principalmente nas hemácias, sinapses (terminação nervosas) e músculos estriados, e a butirilcolinesterase (BChE), (formalmente denominada acilcolinaacil-hidrolase) existente no fígado, plasma, pâncreas e no intestino delgado. Ambas catalisam a hidrólise do neurotransmissor ACh na fenda sináptica (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; QUINN, 1987). Os tipos de colinesterase diferem-se pelas preferências dos substratos. A AChE quebra a ACh mais rapidamente, enquanto a BChE hidrolisa mais rapidamente o neurotransmissor butirilcolina (BCh) (LARINI, 2008).

Alguns neurotóxicos, por formarem compostos conjugados com fósforo ligado covalentemente ao resíduo catalítico Ser198, interferem no mecanismo catalítico da BChE. Estes compostos impedem a hidrólise da BCh, obstruindo a transmissão colinérgica (GONÇALVES, 2009; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

Uma das novas estratégias para o tratamento de intoxicações agudas por neurotóxicos, envolve a administração da BChE como biosequestrante para prevenir a inibição completa da AChE e da BChE endógenas nas sinapses (RAVESH et al., 1993; RAVESH et al., 1997; CERASOLI et al., 2005). As limitações dessa estratégia incluem a exigência de grandes quantidades da BChE exógena para a retirada estequiométrica de organofosforados (OP) de baixa massa molecular, a sua propensão para o envelhecimento, e uma baixa taxa de reativação (WOLFE et al., 1992). A fim de reduzir o problema da lenta taxa de reativação, várias novas oximas estão sendo desenvolvidas e testadas (RAVESH et al., 1993; RAVESH et al., 1997).

A cinética da reação global entre uma oxima e o OP complexado no sítio ativo da BChE pode ser descrita de acordo com a Figura 4. Inicialmente, a oxima entra na cavidade da BChE (simulado por ancoramento molecular) e reage com o OP, retirando-o (mecanismo de reação) da cavidade, e regenerando, assim, a enzima. A primeira etapa é caracterizada pela constante de ligação  $K_{ox}$  e a segunda etapa é caracterizada pela constante de velocidade  $k_2$ . Quanto maior o valor de  $k_2$  mais eficiente será a oxima.  $k_1$  e  $k_{-1}$  correspondem as constantes de velocidade direta e inversa relativas ao ancoramento molecular da oxima com a enzima inibida.  $k_2$  é a constante de velocidade da reação entre a oxima e o OP.



$$K_{ox} = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

$$k_r = k_2/K_{ox}$$

$$k_{obs} = k_2/\{1 + (K_{ox}/[Ox])\}$$

$$k_2 \ll k_{-1}$$

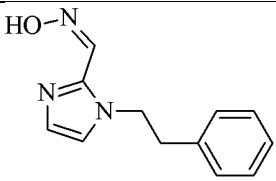
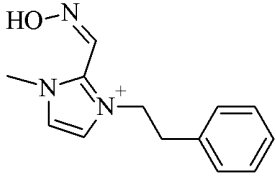
$$K_{ox} \sim k_{-1}/k_1$$

Figura 4 Cinética da reação entre uma oxima e a BChE inibida por um OP

As oximas *I* e *II* (Tabela 1) desenvolvidas Sit et al. (2014) foram testadas como reativadores da BChE humana (*HssBChE*) inibida pelos neurotóxicos GB e GF e tiveram seus parâmetros cinéticos determinados. Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que a oxima *II* se mostrou surpreendentemente eficiente na reativação da *HssBChE* inibida por GF, em comparação com a oxima *I*. Em ambos os casos, o  $K_{obs}$  da oxima *II* se mostra superior tanto com GB como com GF, sendo que, no último caso, essa diferença é

bastante significativa. Estudos por química computacional poderiam ser utilizados numa tentativa de explicar esses resultados e, eventualmente, levar a um melhor entendimento do mecanismo de reativação da BChE inibida por agentes dos nervos.

Tabela 1 Dados experimentais das oximas *I* e *II* reportados por Sit (2014).

Oximas	Constantes experimentais da enzima <i>HssBChE</i>	
	GB	GF
 <p style="text-align: center;"><i>I</i></p>	$K_{\text{obs}} = 0.15$	$K_{\text{obs}} = 0.12$
 <p style="text-align: center;"><i>II</i></p>	$K_{\text{obs}} = 0.23$	$K_{\text{obs}} = 5.7$

### 2.3 Química computacional: gênese e desenvolvimento

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico possibilitou o desenvolvimento das ciências de maneira geral. Em química, isso foi plantado no início do século XIX, por meio da mecânica quântica, quando as soluções da equação de Schrödinger permitiram obter informações sobre sistemas atômicos e moleculares (CASTRO; CANUTO, 2007). A mecânica quântica tem seus

princípios elaborados particularmente da mecânica newtoniana e da teoria eletromagnética de Maxwell (MAXWELL, 1881).

Os conceitos da física clássica e eletromagnética são suficientes para interpretar e explicar o universo macroscópico, porém, incapazes de encontrar uma explicação adequada e coerente do obscuro mundo microscópico, ou seja, atômico-nuclear e também molecular. Em razão disso, por volta de 1900, Max Planck desenvolveu a chamada "teoria dos quanta de energia" ou Antiga Mecânica Quântica. Posteriormente, Einstein (1905), Bohr (1913) e De Broglie (1924) desenvolveram a então ciência abstrata. Todavia, tal ciência não foi suficientemente robusta para explicar outros fenômenos físico-químicos. Assim, Heisenberg (1925) encontrou uma convergência de seus resultados por meio de um novo caminho chamado por ele de Mecânica Matricial. Uma abordagem puramente matemática que não emprega nenhum modelo atômico. Um ano mais tarde, Schrödinger, baseando-se nas ideias de De Broglie, desenvolveu a Mecânica Ondulatória, a qual tem um aspecto mais físico, embora ainda impreciso. Essa imprecisão nos resultados foi estudada e minimizada por Pauli (1924) e Dirac que desenvolveram a chamada Mecânica Quântica Moderna (SILVA, 2003).

#### **2.4 Métodos de cálculo: semiempírico e TFD**

Prever propriedades moleculares, tendências qualitativas dessas propriedades ou explicar a natureza de uma ligação química são os objetivos da química computacional. Existem vários níveis ou métodos para encarar esses problemas, alguns tradicionais como os *ab initio*, empíricos e semiempíricos e também outros mais sofisticados como a Teoria do Funcional de Densidade (TFD).

Os métodos semiempíricos são baseados no formalismo de Hartree-Fock (campo autoconsistente), contudo, utilizam várias aproximações e dados retirados do experimental. Já o TFD contempla o sistema eletrônico por meio de funcionais, que são funções da função de onda de Schrödinger ( $\Psi$ ) que espacialmente dependem da densidade eletrônica. Esse método é particularmente importante no estudo de sistemas moleculares, pois os descreve relativisticamente, aumentando a acurácia das informações. Por esta e outras razões, a metodologia tem sido empregada nas áreas farmacêutica, agroquímica, biotecnológica e na ciência dos materiais. Os conceitos modernos desta teoria foram inicialmente formulados para estados não degenerados e encontram-se nos trabalhos de Hohenberg (HOHENBERG; KOHN, 1964) e Kohn (KOHN; SHAM, 1965).

Nem sempre os métodos *ab initio* são satisfatórios em relação aos experimentais, e, além disso, requerem meios de cálculo extremamente extensos, dispendiosos ou inacessíveis. Por isso existe uma gama de métodos semiempíricos, nos quais se fazem várias aproximações adicionais, de modo a reduzir as dificuldades de cálculo e conseqüentemente aumentar a sua precisão. Em geral, os métodos semiempíricos limitam-se a elétrons de valência, não considerando explicitamente os elétrons do cerne, que pouco contribuem para o comportamento químico das moléculas.

O operador de Fock, dado pela equação 1:

$$f = h^{CERNE} + \sum (J_b - K_b) \quad (1)$$

Contem  $oh^{CERNE}$ , que inclui os termos de energia cinética e de atração para o cerne. Em mecânica quântica o operador de Fock é a aproximação da matriz do operador energético do elétron. As integrais envolvendo  $oh^{CERNE}$  são em geral substituídas por parâmetros empíricos ou calculados separadamente. As

energias e os orbitais moleculares são calculados, de modo idêntico, pela função diferencial conhecida como equação secular (equação 2):

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + V(x) \psi(x) = E(x) \quad (2)$$

Um dos métodos de cálculo da estrutura eletrônica de átomos, moléculas e sólidos, com maior sucesso atualmente, é a TFD. A teoria é baseada na noção de que a energia total de um sistema, incluindo todas as interações ou permutas de correlações, é um funcional único da densidade eletrônica, e que o mínimo desse funcional é a energia do estado fundamental. A proposta da TFD é obter as propriedades do estado fundamental das moléculas sem a necessidade da função de onda multieletrônica.

As diferenças podem ser evidenciadas com uma regressão aos primórdios da mecânica quântica. Uma alternativa simples para a equação de Schrödinger foi proposta por H. L. Thomas e Enrico Fermi em 1927, conhecida como a aproximação de Thomas-Fermi (FERMI, 1928). Nesta aproximação, em vez da função de onda do sistema, considera-se a densidade eletrônica  $\rho(r)$ . A energia total  $E$  do sistema é escrita como um funcional de  $\rho(r)$ , ou seja,  $E[\rho(r)]$ . Uma simplificação drástica e admirável: a equação para um sistema de  $N$  elétrons, e, portanto, com  $3N$  coordenadas independentes, é reduzida pela aproximação de Thomas-Fermi a um problema em 3 dimensões apenas. Algumas observações sobre a aproximação de Thomas-Fermi e o formalismo de Schrödinger são pertinentes. Cálculos com a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos requerem a solução de integrais envolvendo, simultaneamente, coordenadas de um elétron ou de dois elétrons, com recorrências a espaços de três e seis dimensões, respectivamente. Sendo os elétrons partículas indistinguíveis, percebe-se que bastaria conhecer as funções de distribuição de um e dois elétrons para calcular estas integrais. Logo, pode-se

argumentar que a equação de Schrödinger, ao considerar as coordenadas de todos os elétrons simultaneamente, contém mais informação do que o necessário.

Assim, a teoria do funcional da densidade consiste em obter informações sobre um dado sistema baseadas em sua densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , como descreve a equação 3:

$$\begin{aligned}
 E &= E[\rho_R] \\
 E[\rho_R]_{MIN} &= E_0 = E[\rho_{OR}] \\
 E[\rho_{OR}] &= T[\rho_{OR}] + E_{NE}[\rho_{OR}] + E_{ee} E[\rho_{OR}] \\
 E[\rho_{OR}] &= T[\rho_{OR}] + \int \rho_{OR} V_{Ne} dR + E_{ee}[\rho_{OR}] \quad (3)
 \end{aligned}$$

Onde T é o termo atribuído à energia cinética,  $E_{Ne}$  é relativo à energia potencial de atração núcleo-elétron e  $E_{ee}$  é a energia potencial de repulsão elétron-elétron, enquanto  $V_{Ne}$  refere-se ao potencial de atração entre o núcleo e os elétrons, denominado de potencial externo. Rearranjando-a, obtém-se o funcional de Hohenberg-Kohn, FHK  $\rho_O(r)$  como apresentado na equação 4:

$$\begin{aligned}
 E[\rho_O(r)] &= \int \rho_O(r) V_{NE} dr + F_{HK}[\rho_O(r)] \\
 F_{HK}[\rho_O(r)] &= T[\rho_O(r)] + E_{ee}[\rho_O(r)] = \langle \Psi | T + V_{ee} | \Psi \rangle \quad (4)
 \end{aligned}$$

Desde a sua proposição, a TFD tem sido muito utilizada para estudar a estrutura eletrônica de sólidos. Avanços consideráveis foram conseguidos na proposição de funcionais adequados para a utilização da TFD no cálculo de propriedades moleculares. Kohn e Sham (KOHN; SHAM, 1965) relacionaram um sistema de referência fictício e densidade  $\rho_S(r)$ , no qual os seus n elétrons não interagem entre si nem com um sistema real. Admitindo que ambos os sistemas possuíssem densidades iguais obtiveram a equação cinco:



$$\rho_S(r) = \sum_i^n \sum_s^n |\varphi(r, s)|^2 = \rho_O(r) \quad (5)$$

Os orbitais de Kohn-Sham são determinados, utilizando-se o teorema variacional na FTD. Minimizando a energia ( $\epsilon_i$ ) e aplicando o operador de Kohn-Sham ( $h_i^{KS}$ ) obtêm-se a equação 6.

$$\begin{aligned} h_i^{KS} \varphi_i(r) &= \epsilon_i \varphi_i(r) \\ \left\{ -\frac{\nabla^2}{2} + V_{KS}[\rho(r)] \right\} \varphi_i(r) &= \epsilon_i \varphi_i(r) \end{aligned} \quad (6)$$

Portanto, os autovalores das energias da TFD não possuem significado físico e não há um teorema equivalente ao de Koopmans na teoria de Kohn-Sham que relacione as energias dos orbitais com as energias de ionização. Contudo, o autovalor de energia do mais alto orbital ocupado ( $\epsilon_{máx}$ ) relaciona-se com a energia de ionização, se for utilizado o potencial de correlação e troca exato ( $V_{XC}$ ), e este por sua vez, está associado ao funcional de correlação e troca, conforme apresentado na equação 7 onde os subscritos X e C significam correlação e troca provenientes dos termos escritos na língua inglesa.

$$V_{XC} \equiv \frac{\delta E_{XC}[\rho(r)]}{\delta[\rho(r)]} \quad (7)$$

Na prática, a qualidade da aproximação do funcional da densidade depende principalmente da escolha da aproximação utilizada para o funcional de correlação e troca ( $E_{XC}$ ) para a descrição das propriedades do sistema em questão, que podem ser do tipo ADL (aproximação da densidade local), ADSL (aproximação da densidade de spin local), AGG (aproximação do gradiente generalizado), híbridos e outras. As aproximações objetivam o funcional energia

de troca e correlação para se obter a densidade eletrônica do estado fundamental ( $V_{XE}$ ). Considerando-se que todas as metodologias ou códigos da TFD tentam resolver a equação 7, então, para encontrar o potencial de Kohn-Sham, ( $V_{KS}$ ), utiliza-se a equação 8:

$$V_{KS}[\rho(r)] = V_{ext}(r) + V_{Hartree}[\rho(r)] + V_{XC}[\rho(r)] \quad (8)$$

Assim, resumidamente os cálculos realizados com os métodos da TFD seguem os passos mostrados na Figura 5.

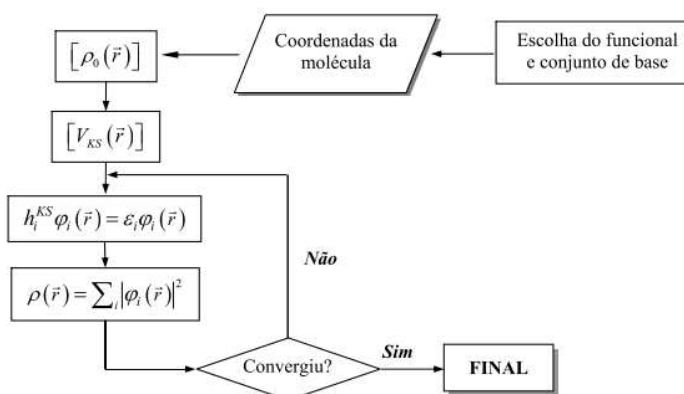


Figura 5 Fluxograma genérico com os principais passos seguidos nos cálculos com a TFD

O grande impacto da TFD na química quântica está relacionado com o fato de esta teoria produzir resultados superiores aos obtidos com o método de Hartree-Fock (SLATER, 1951), a um custo computacional muito menor. Já há algum tempo, a TFD foi implementada em vários programas computacionais de química quântica, dentre os quais a versão 94 do programa Gaussian® produzida

pelo grupo do Prof. Pople. Destaca-se, também, a evolução de conceitos e metodologias para extrair da TFD grandezas úteis para a interpretação de propriedades moleculares. Estas novas facilidades computacionais, apoiadas por uma fundamentação teórica consistente, tem incentivado a utilização da TFD na investigação de propriedades eletrônicas de sistemas químicos poliatômicos. Exemplos incluem os estudos dos sítios ativos de enzimas, reações em superfície, propriedades de catalisadores, propriedades eletrônicas de sólidos e polímeros.

## 2.5 Ancoramento molecular

A simulação computacional do ancoramento molecular (*docking*) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre uma proteína e um ligante, nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (SILVEIRA, 2003) seja por cristalografia ou pela técnica computacional de modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (D'ALFONSO; TRAMONTANO, 2001; FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010; SOUZA et al., 2008). Os valores da função de desempenho do ancoramento  $E_{score}$  são definidos pelas Equações (9 e 10) abaixo:

$$E_{SCORE} = E_{INTER} + E_{INTRA} \quad (9)$$

$$E_{INTER} = \sum_{j \in \text{ligante}} \sum_{i \in \text{proteína}} [ E_{PLP}(r_{ij}) + 332 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} ] \quad (10)$$

onde,

$E_{INTER}$  corresponde à energia de interação ligante-proteína. O termo  $E_{PLP}$  representa a energia potencial do inibidor por partes que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (*van der Waals*) entre átomos e outro potencial para a ligação 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 para  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; SOUZA et al., 2008; RAMALHO et al., 2009; OGUNGBE; SETZER, 2009).

$E_{INTRA}$  é a energia interna do ligante (Equação 11):

$$E_{INTRA} = \sum_{LIGANTE(i)} \sum_{LIGANTE(j)} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{LIG.FLEXÍVEIS} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{PENALIZADA} \quad (11)$$

As duas primeiras somas contidas na equação estão relacionadas a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia de torção, onde  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. O último termo,  $E_{PENALIZADA}$  (chamado de termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 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, essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa como mostra o esquema da Figura 6, porém, nem sempre as estruturas escolhidas são reativas.

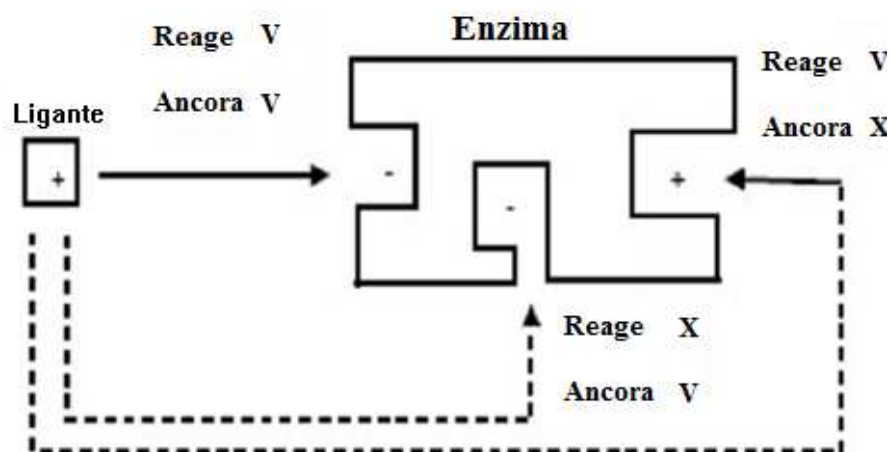


Figura 6 Representação do ancoramento de um ligante em uma proteína. V = favorável e X não favorável

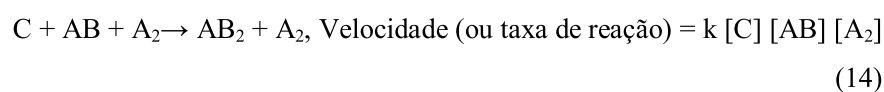
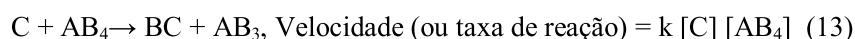
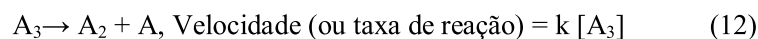
Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados (interação oxima enzima inibida e reatividade), eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI; TOMIOKA; IAI, 1994).

## 2.6 Mecanismos de reação

Em química, uma sequência passo a passo de reações elementares, por meio das quais a transformação química acontece, é conhecida como mecanismo de reação. De outro modo, a reação universal (ou, global) acontece por meio de um conjunto de processos químicos descritos por etapas ou reações elementares. Um mecanismo é uma proposta acadêmica da qual se pode escrever uma lei de

velocidade que está de acordo com a lei de velocidade observada. O fato de um mecanismo explicar os resultados experimentais não significa necessariamente que ele esteja correto. A descrição mecanística nada mais é do que uma atividade artística do químico em imaginar de que modo uma reação no seu todo acontece. A proposta de um mecanismo de reação é uma excelente atividade acadêmica de exercício mental (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006).

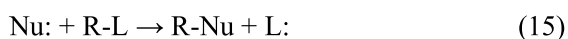
Uma reação elementar expressa as configurações das moléculas ou íons reagindo entre si. A equação em um processo elementar representa a reação no seu nível molecular, não a reação global. De acordo com o número de moléculas envolvidas na etapa elementar, três tipos de passos elementares são propostos: unimolecular (equação 12), bimolecular (equação 13) e trimolecular (equação 14). Em cada um desses processos, pode-se escrever uma lei de velocidade, a qual deve ser escrita sempre de acordo com a equação proposta. A derivação da lei de velocidade final pode ser bem diferente da equação de velocidade dessas etapas elementares (LUMBINY; HUI; ISLAM, 2014).



Os processos elementares são escritos para mostrar o avanço de uma reação química até a sua finalização. A coleção desses processos elementares forma o mecanismo de reação. Processos elementares apresentam diferentes velocidades. A etapa lenta é a determinante na velocidade de reação. A ordem

dessa etapa é a ordem de uma reação e as concentrações das espécies que ali reagem devem ser expressas em termos das concentrações dos reagentes. O mecanismo descreve quais ligações são quebradas, em que ordem elas são transformadas, qual é a natureza do estado de transição (ET) e qual é a velocidade relativa de cada etapa. Uma descrição completa do mecanismo deve considerar todos os reagentes e substratos utilizados, a função do catalisador, a estereoquímica, todos os produtos formados e a quantidade de cada um. Um mecanismo de reação deve também considerar a ordem na qual as moléculas reagem (WU et al., 2014).

Ao se estudar reações orgânicas, pode-se perceber que alguns mecanismos ocorrem na natureza via substituição e/ou eliminação. A reação de substituição é aquela em que o nucleófilo, rico em elétrons, substitui em uma posição eletrófila, pobre em elétrons, de uma molécula a um átomo ou grupo, denominado lábil (L), como pode ser visto no esquema representado pela equação 15. Se ignorarmos as cargas formais a reação geral consiste em:



O nucleófilo (Nu:), mediante seu par de elétrons, substitui no substrato R-L, onde R é o eletrófilo, ao grupo L, o qual leva consigo um par de elétrons. O nucleófilo pode ser uma espécie neutra ou um ânion, ainda que o substrato possa ser neutro ou ter carga positiva. As reações de substituição se subdividem, de acordo com o tipo de mecanismo envolvido, em S<sub>N</sub>1 e S<sub>N</sub>2, onde S significa substituição, N simboliza nucleófilo e os números 1 ou 2 representam a ordem de reação.

A reação S<sub>N</sub>2 (substituição nucleofílica bimolecular) ocorre em uma única etapa na qual a adição do nucleófilo e a eliminação do grupo de saída o correm simultaneamente como mostra o esquema da Figura 7. Portanto é uma

reação concertada, sendo favorecida quando a posição do átomo de carbono eletrófilo é facilmente acessível ao nucleófilo.

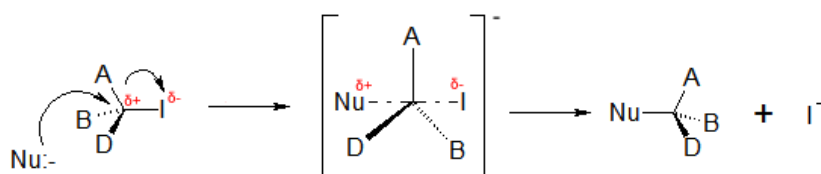


Figura 7 Substituição  $S_N2$ . Nu: é um nucleófilo e I o grupo abandonador

A reação por  $S_N2$  origina produtos cujas configurações são absolutamente opostas à inicial. Isso porque a entrada do nucleófilo (no caso do exemplo acima, o Nu:) se dá em lado contrário ao grupo abandonador (Figura 7, I), em decorrência das repulsões entre pares eletrônicos dos grupos ligantes. O carbono, inicialmente com geometria tetraédrica, adquire uma estrutura radial, no ET, com cinco ligantes: a ligação com o I está sendo desfeita e, simultaneamente, está se formando a ligação com o Nu:. Em seguida, após a saída do I, o carbono reassume a forma tetraédrica, mas em configuração invertida à original (WADE, 2003).

Por outro lado, a reação  $S_N1$  (substituição nucleofílica unimolecular) implica duas etapas, uma lenta e a outra rápida (equações 17 e 18).



Na primeira etapa tem lugar à eliminação do grupo de saída e à formação do intermediário carbocátion (etapa determinante da velocidade) e, na



continuação, (segunda etapa) o nucleófilo se une a este. A  $S_N1$  tende a ser importante quando o átomo de carbono do substrato está rodeado de grupos volumosos, em razão dos fatos que tais grupos interferem estericamente com a reação  $S_N2$  e que os carbonos mais substituídos formam carbocátions mais estáveis (WADE, 2003).

Espécies contendo átomos de fósforo pentavalentes desempenham um papel chave em uma ampla gama de processos bioquímicos nos seres humanos. Esses processos acontecem sob mecanismos de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$  P). No entanto, a natureza destas reações não está totalmente compreendida, em particular, não é possível identificar se os intermediários são complexos de transição (CT) ou ET que se desfazem antes de serem isolados para caracterização ou detecção (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006).

Os cálculos de mecanismo revelam que os principais fatores que determinam a forma da curva de energia potencial - CEP, ou seja, a presença ou ausência de barreiras de reação, são a demanda estérica de substituintes no fósforo e, em menor medida, a natureza do grupo abandonador. Em particular, o aumento do efeito estérico no átomo a ser substituído desloca o mecanismo para o tipo potencial Poço Simples (com um centro estável do CT que é comum para substituição em átomos do terceiro período, por meio de um potencial Poço Triplo (com um pré e pós-ET antes e depois do CT central), de volta para o poço de potencial Poço Duplo (com um ET central) que é bem conhecido para a substituição do átomo central. A figura 8 ilustra as diferentes formas para a curva de energia potencial (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006).

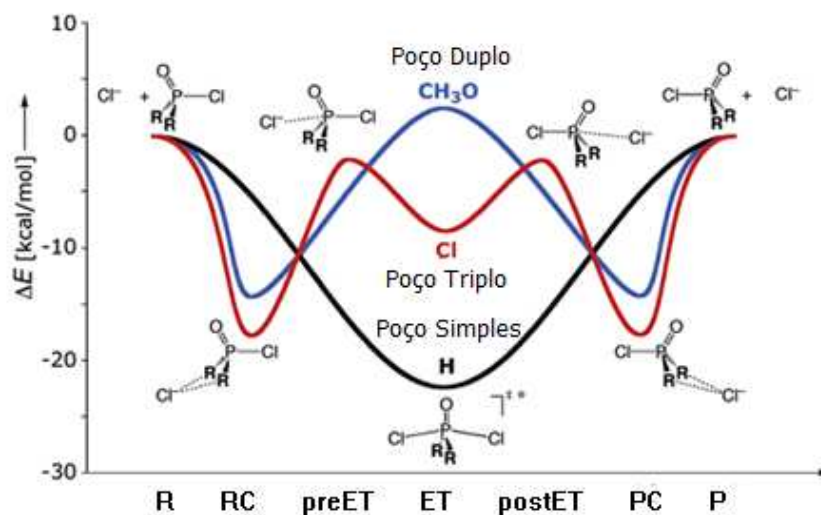


Figura 8 Curva de energia potencial  $\Delta E$  versus avanço reacional via reações do tipo  $S_N2$ : Poço Simples, Poço Duplo e Poço Triplo

Fonte: (Adaptado: VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006).

## 2.7 Energia de ancoramento vs reatividade

Uma das maiores dificuldades para se calcular os intermediários de reação e o mecanismo de reação com base em um resultado de ancoramento é a escolha de qual pose utilizar na simulação. Geralmente, as poses de menor energia são as mais indicadas para o mecanismo, porém, nem sempre essas estruturas formam ET e são as mais representativas do conjunto de todas as possibilidades de ligação entre substrato e proteína. Na Figura 9 são ilustrados os processos de ancoramento molecular e mecanismo de reação para BChE.

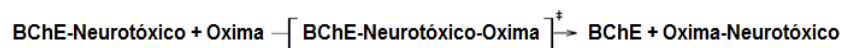


Figura 9 Processo de ancoramento e reatividade de uma oxima na BChE

Como visto na Figura 9, não necessariamente o conformero escolhido do ancoramento molecular reage conforme esperado, ou seja, para uma oxima ser considerada reativa, deve-se formar ET que leve à formação do produto final da reação. A caracterização dos ET pode acontecer em pontos de mínimo ou máximo, dependendo da natureza da reação química. Reações que acontecem sob domínio do mecanismo  $S_N2$  puro formam um ponto de mínimo, conhecido como curva do tipo Poço Simples (Figura 9). No entanto, alguns mecanismos apresentam pontos de máximo, como é caso das curvas do tipo Poço Duplo e Triplo. Dessa forma, uma análise mais criteriosa desta conformação inicial se torna fundamental para uma descrição mais realística dos resultados experimentais (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006).

### **2.7.1 Modelo de deformação da ligação química via TFD (*Activation strain model*)**

Um dos pré-requisitos para um planejamento mais eficiente de novos fármacos é determinar se uma reação catalisada tem uma baixa barreira de ativação. O entendimento da reatividade química pode ser avaliada pela forma como os reagentes que originam as reações são deformados ao longo do mecanismo (VAN ZEIST; BICKELHAUPT, 2010).

O modelo de deformação da ligação química fornece os recursos necessários para uma compreensão completa da reatividade química e as tendências das mesmas em termos das propriedades dos reagentes (VAN ZEIST; BICKELHAUPT, 2010). Este modelo refere-se à barreira de ativação relacionada à rigidez dos reagentes e à deformação geométrica que está associada com (e caracteriza) o caminho de reação sob consideração. Este aspecto de distorção geométrica aparece na energia de desestabilização. O modelo também

está relacionado com a capacidade de ligação e interação mútua entre os reagentes cada vez mais deformados ao longo de uma mesma via.

O ponto de partida são os dois reagentes separados, que se aproximam desde o infinito e começam a interagir para formar o produto. Neste modelo, a energia de ativação  $\Delta E^\ddagger$  do ET é decomposta em  $\Delta E_{DEFORMAÇÃO}^\ddagger$ , a energia de deformação e a energia de interação  $\Delta E_{INT}^\ddagger$ , como mostra a equação (21) abaixo:

$$\Delta E^\ddagger = \Delta E_{DEFORMAÇÃO}^\ddagger + \Delta E_{INT}^\ddagger \quad (21)$$

A tensão de ativação  $\Delta E_{STRAIN}^\ddagger$  é a energia associada com a deformação dos reagentes a partir da sua geometria de equilíbrio em direção à geometria que adquire no complexo ativado. Ela pode ser dividida em contribuições de cada um dos reagentes, por exemplo, do catalisador e do substrato. O  $\Delta E_{INT}^\ddagger$  é a energia de interação efetiva entre os reagentes deformados no estado de transição (Figura 10).

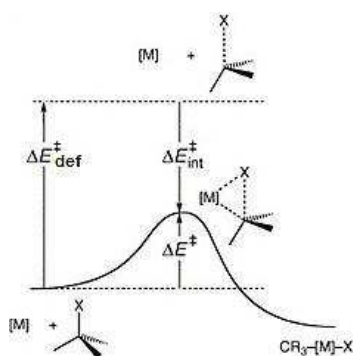


Figura 10 Ilustração de um esquema de análise do modelo de deformação da ligação química

O modelo pode ser estendido para incluir todo o caminho de reação. A decomposição dos termos de energias  $\Delta E(\zeta)$  em  $\Delta E_{DEFORMAÇÃO}^{\#}(\zeta)$  e  $\Delta E_{INT}^{\#}(\zeta)$  é levada em consideração ao longo da coordenada de reação ( $\zeta$ ), ou seja, com base em reagentes por meio do ET e dos produtos. A  $\zeta$  é geralmente obtida pelo cálculo de coordenadas intrínsecas de reação (CIR) a partir de um cálculo do gradiente. Este caminho de reação pode então ser projetado sobre um parâmetro crítico geométrico, tal como a ligação que é quebrada durante o processo de ativação (VAN ZIEST; BICKELHAUPT, 2010).

Os valores de  $\Delta E_{DEFORMAÇÃO}^{\#}$  e  $\Delta E_{INT}^{\#}$  no ET devem ser interpretados com muito cuidado, tendo em vista que o ET da estrutura otimizada é resultado de um balanço dos componentes de  $\Delta E_{DEFORMAÇÃO}^{\#}(\zeta)$  e  $\Delta E_{INT}^{\#}(\zeta)$ . Ao longo da coordenada de reação, a tensão  $\Delta E_{INT}^{\#}(\zeta)$  aumenta, em geral, porque o substrato fica altamente deformado. Ao mesmo tempo, a interação  $\Delta E_{INT}^{\#}(\zeta)$  se torna mais estabilizante na maioria dos casos. O resultado líquido é o perfil total de energia  $\Delta E(\zeta)$  que atinge seu máximo em um ponto (por exemplo, o ET) no decorrer da coordenada da reação onde:  $\frac{d\Delta E_{DEFORMAÇÃO}^{\#}(\zeta)}{d(\zeta)} = -\frac{d\Delta E_{INT}^{\#}(\zeta)}{d(\zeta)}$  (VAN ZEIST; BICKELHAUPT, 2010).

O objetivo deste modelo é entender mecanismos de reações de substituição nucleofílica e também reações catalíticas (BICKELHAUPT, 1999; DIEFENBACH, 2005; VAN STRALEN; BICKELHAUPT, 2006).

## 2.8 Quimiometria

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, sendo atualmente considerada como uma disciplina da química e inserida na grade curricular de

diversos cursos de graduação e de pós-graduação em universidades brasileiras (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Dentre as diversas subáreas da quimiometria pode-se destacar o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. Na área de planejamento de experimentos, busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos) que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (concentração, por exemplo) (HOUGHTON; KALIVAS, 2000). Na literatura podem ser encontrados diversos experimentos didáticos em calibração multivariada, (LIMA et al., 2008) reconhecimento de padrões (CAZAR, 2003) e planejamento de experimentos (RUSAK et al., 2003).

A quimiometria é dinâmica e constantemente novos algoritmos surgem ou são modificados, por isso ambientes computacionais são largamente empregados por pesquisadores especializados em consequência da possibilidade de programação de rotinas dentro destes ambientes, como no caso do MatLab<sup>®</sup> (HANSELMAN; LITTLEFIELD, 1997), do Scilabdo Octave (LEVENSPIEL, 1972). Todos ambientes computacionais interativos de alto desempenho, voltados para o cálculo numérico, cujo elemento básico de informação é uma matriz, sendo largamente empregados no desenvolvimento de métodos quimiométricos (LIMA et al., 2008).

Os métodos de análise exploratória são utilizados para extrair informação e detectar tendências nos dados, baseados nas medidas multivariadas das amostras. De maneira geral, eles podem ser classificados como métodos

supervisionados como, por exemplo, Análise Linear de Discriminantes (ALD) (LACHENBRUCH, 1975), Vizinho Mais Próximo - K(VZP-K) (GARCIA; DEBREUVE; BARLAUD, 2008), Análise Quadrática de Discriminantes Mínimos (AQDM) (BARKER; RAYENS, 2003) e Programa-Independente de Modelagem por Classes Análogas (PIMCA) (SVANTE; MICHEL, 1977), ou não supervisionados como, por exemplo, a Análise dos Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) (ANDERBERG, 1973) permitindo assim a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Nos métodos supervisionados, é necessário que exista alguma informação inicial sobre a identidade das amostras para a formação das classes e o objetivo é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras. Por outro lado, nos métodos não supervisionados, a separação de classes acontece sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras e o objetivo é identificar agrupamentos naturais entre as amostras (BRERETON, 2007).

## **2.9 Análise de componentes principais**

A análise de componentes principais (ACP) é uma técnica que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais (CP). As CP apresentam as seguintes propriedades:

- a) Cada CP é uma combinação linear de todas as variáveis originais;
- b) São independentes entre si e estimadas com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados;

- c) A ACP é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível de informação;
- d) Procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados.

Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois, embora a informação estatística presente nas  $n$  variáveis originais seja a mesma das  $n$ CP, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras CP mais que 80% desta informação. O gráfico da CP1 *versus* a CP2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço  $n$  dimensional. A análise de CP 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 das primeiras CP são as mais importantes do ponto de vista estatístico (WANG; MIZAIKOFF; KRANZ, 2009).

Portanto, a tarefa do químico que trabalha com estatística multivariada, consiste em interpretar a distribuição dos pontos no gráfico de CP e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das CP mais importantes (LIMA et al., 2008). Existem pacotes computacionais de estatística que fazem todas as operações necessárias à obtenção de CP, inclusive o tratamento prévio de padronização e escalonamento dos dados, como é o caso do SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) (NOROSIS, 1994) e do SYSTAT (Statistics and Graphics Package Software) (WILKINSON, 1992). Em alguns programas, como o SPSS, a opção de CP aparece no menu por meio de uma de suas finalidades: a redução de dados. O procedimento matemático para obtenção de CP pode ser facilmente seguido por aqueles que têm



conhecimento de álgebra matricial e é encontrado em diversos artigos e livros direcionados para químicos (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a descrição, em nível molecular, das interações entre as duas oximas (*I* e *II*) reportadas na Tabela 1 (item 2.2) e a *HssBChE*, em dois sistemas:

- 1- *HssBChE* inibida pelo neurotóxico GF;
- 2- *HssBChE* inibida pelo neurotóxico GB;

Além disto, comparar diferentes parâmetros (energia de interação, distância entre oxigênio e fósforo, ângulo de ataque e posição espacial da molécula em reação) das duas oximas que se encontram em diferentes estados de ionização.

Também investigar o mecanismo da reação de substituição nucleofílica e também o processo de reativação da *HssBChE*.

Finalmente, utilizar a ACP no estudo de correlações entre as variáveis, com o intuito de constatar quais dispersam os resultados de ancoramento. Almeja-se também explicar por meio da ACP, as divergências entre ancorar e reagir bem.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Estruturas 3D das moléculas estudadas

As estruturas da *HssBChE* inibida por GF e GA foram construídas usando como moldes as estruturas da AChE de *Mus musculus* (*MmAChE*) inibida por GB e complexada com HI-6, depositada no *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN; LEONARD, 1990) por Akfur, Artursson e Ekstrom (2013) (código PDB 2Y2V; resolução = 2.45 Å, R = 0.185) e a estrutura da *HssBChE* complexada com tacrina depositada no PDB por Nachon et al. (2013) (código PDB 4BDS; resolução = 2.10 Å, R = 0.176). Inicialmente *MmAChE* e *HssBChE* foram superpostas utilizando o programa *spdbviiwer* e as coordenadas do GB da *MmAChE* foram copiadas para o sítio ativo da *HssBChE* com o objetivo de gerar o complexo *HssBChE*/GB. Logo, para construir o complexo *HssBChE*/GF, a estrutura do GB no complexo *HssBChE*/GB foi convertida em GF por meio da inserção e otimização do grupo  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  usando o programa *Discovery Studio 3.5*. As estruturas das oximas foram construídas por meio do programa *PC Spartan Pro* e otimizadas utilizando o método semiempírico PM3 (STEWART, 1989).

Neste trabalho, utilizaram-se os métodos QM/MM, que podem ser aplicados no desenvolvimento de um modelo para simulação da reação entre as oximas e a *HssBChE* inibida por GF e GB, possibilitando estudos das características principais do sistema. Nesses estudos, tratamos quanticamente os átomos constituintes da oxima e do neurotóxico que estão diretamente envolvidos no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos, e alguns outros aminoácidos pertencentes ao sítio ativo. A parte MM foi obtida principalmente dos resultados dos estudos por ancoramento molecular. A conformação dos reativadores e dos resíduos de aminoácidos da *HssBChE*

inibida, obtida do ancoramento, foi recortada de forma a deixar somente a parte que será utilizada nos cálculos de QM. Esta metodologia sequencial de cálculo tem sido validada para mecanismos de reações e obtenção de propriedades espectroscópicas (RAMALHO et al., 2009).

#### **4.2 Ancoramento molecular das estruturas**

Os cálculos das energias de interação das oximas dentro das cavidades de *HssBChE/GF* e *HssBChE/GB* foram realizadas utilizando o programa Molegro Virtual Docker<sup>®</sup> (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Este programa é capaz de prever a conformação mais provável na qual um ligante irá interagir com uma macromolécula.

A identificação da conformação do ligante é feita por meio da avaliação de um número de candidatos (conformações dos ligantes ou poses) estimando a energia de suas interações com a enzima. Os complexos foram construídos no programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativo, avaliando certo número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando a energia de suas interações com os resíduos da proteína.

#### **4.3 Mecanismo de reação**

Os cálculos de mecanismo de reação foram efetuados nos programas PC Spartan Pro e Gaussian09W. A região QM consiste dos átomos da oxima e do neurotóxico que estão envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos, e a região MM consiste do restante do sistema. Cada confôrmero foi totalmente otimizado em nível TFD, com gradiente de conjugação e algoritmos quasi-Newton-Raphson. A geometria final

foi obtida com o funcional de densidade Becke's e o gradiente funcional corrigido de Lee, Yang e Paar (B3LYP) (YANG; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2005) usando a base 6-31g+ (d,p).

#### **4.4 Análise multivariada**

A dispersão entre cada variável determinada nas conformações das oximas ancoradas na *HssBChE* foi estudada pela APC. Os dados obtidos foram autoescalonados como forma de pré-processamento e os softwares MATLAB, R2012b (8.0.0.783) e STATISTICA versão 10 (ELECTRONIC VERSION, 2013), foram utilizados para a realização das análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a melhor compreensão dos resultados, os dados foram divididos em dois sistemas, os quais representam a *HssBChE* inibida por GB e GF. Nesses sistemas, as oximas *I* e *II* (Tabela 1), foram estudadas por ancoramento molecular, TFD e quimiometria conforme discutido a seguir.

### 5.1 *HssBChE* inibida por GF

Os resultados de ancoramento molecular, estudos por TFD do mecanismo de reação e quimiometria para o sistema *HssBChE*/GF estão descritos e discutidos nos subitens a seguir.

#### 5.1.1 Ancoramento Molecular

O reancoramento da estrutura cristalográfica do HI-6 no interior dos complexos *HssBChE*/GF e *HssBChE*/GB retornou valores de desvio médio quadrático (DMQ), de 0,804 Å e 1,245 Å, respectivamente. Tendo em vista que um valor de DMQ por volta de 2,000 Å é considerável aceitável (KONTOYANNI; McCLELLAN; SOKOL, 2004; LEACH; SHOICHET; PEISHOFF, 2006; WARREN et al., 2006), estes resultados validam o protocolo de ancoramento utilizado.

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para avaliar o sítio de ligação do sistema *HssBChE*/GF por meio do software MVD (THOMSEM; CHRISTENSEN, 2006). O volume da cavidade calculado foi de 332, Å<sup>3</sup>(Figura 11).

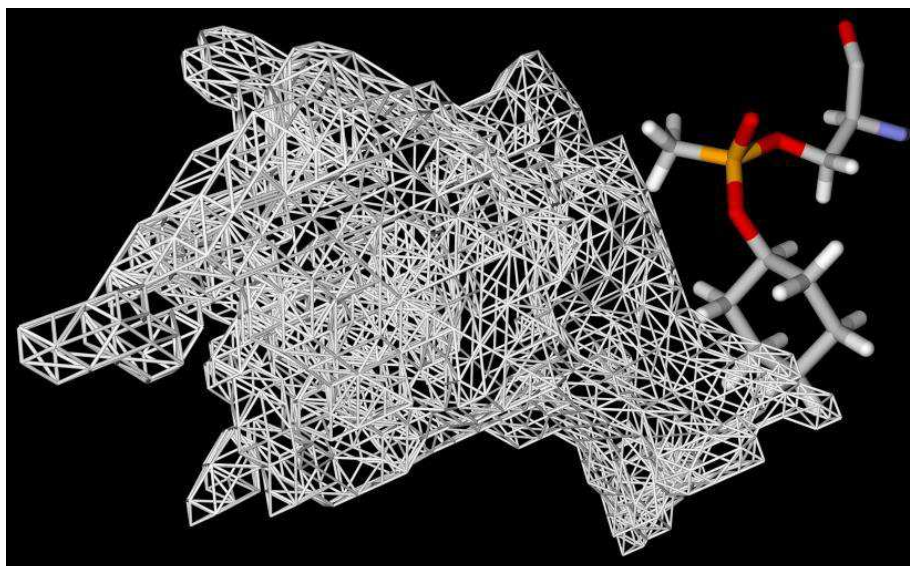


Figura 11 Cavity do sistema *HssBChE/GF*

Os resultados teóricos obtidos no ancoramento molecular das oximas *I* e *II* no complexo *HssBChE/GF* foram avaliados e comparados com os resultados experimentais dessas oximas apresentados na Tabela 1. As oximas em estudo foram ancoradas no sítio ativo do complexo *HssBChE/GF* usando como referência a estrutura da HI-6 copiada da estrutura cristalográfica da *MmAChE* depositada no PDB (BERMAN; LEONARD, 1990) sob o código 2Y2V, por Akfur, Artursson e Ekstrom (2013). As energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender as variações entre os modos de interação dos compostos do sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores responsáveis pela atividade das oximas.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de energia de interação e das ligações hidrogênio com os aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBChE/GF* para os três conformeros de menor energia de interação intermolecular da oxima *I*.

Tabela 2 Valores de energia de encaixe entre os melhores conformeros da oxima *I* com o complexo *HssBChE/GF*

Pose	Energia de Interação (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Distância (Å)	Aminoácidos
6	-125,25	-2,50	2,60	Tyr128
		-0,02	2,87	Trp82
1	-122,76	-0,22	2,93	Trp82
7	-120,96	–	–	–

Com base nos conformeros selecionados, foram analisadas as interações intermoleculares realizadas entre a oxima *I* e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBChE/GF* (Figura 12). Nesse sentido, cada ligação hidrogênio formada entre o reativador e a enzima foi analisada, destacando sempre os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com as oximas em estudo. Os aminoácidos da *HssBChE* que interagiram com a oxima *I* foram o Trp82 e a Tyr128 (Figura 12), com energias de ligação hidrogênio de cerca de -2,50, -0,02 e -0,22 kcal·mol<sup>-1</sup>, respectivamente, para as poses 6 e 1, permanecendo a uma distância máxima de 2,93 Å. Foi observado que a pose 7 não realizou nenhuma ligação hidrogênio com os resíduos de aminoácido presentes no sítio catalítico da enzima. Isso, provavelmente, deve-se à forma em que os átomos eletronegativos ficaram posicionados em relação aos hidrogênios da enzima.



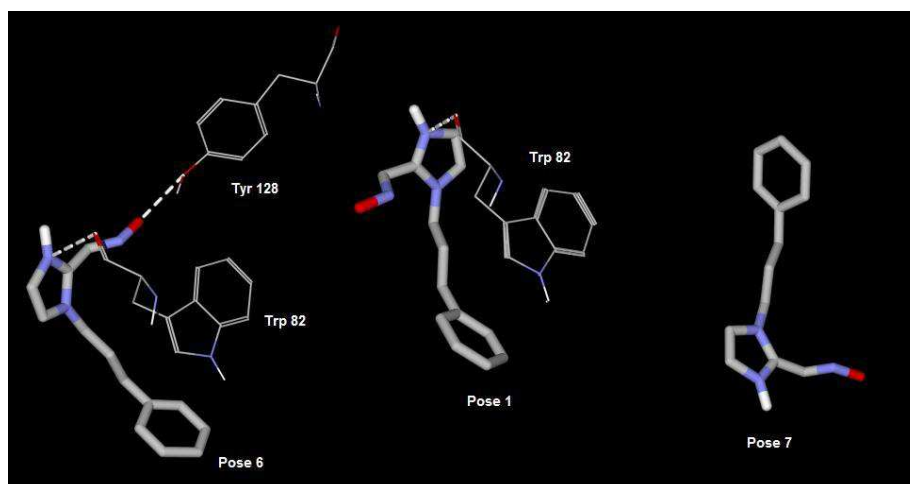


Figura 12 Ligações hidrogênio formadas entre as poses da oxima *I* de menor energia de interação e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do sistema *HssBChE/GF*

Na Tabela 3 são apresentados os valores de energia de interação e informações sobre as ligações hidrogênio realizadas com os aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBChE/GF* para as três poses de menor energia da oxima *II*.

Tabela 3 Valores de energia de encaixe entre os melhores conformeros da oxima *II* e o complexo *HssBChE/GF*

Pose	Energia Intermolecular (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação de Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Distância (Å)	Aminoácidos
4	- 128,46	- 2,39	3,12	Thr120
		- 0,86	2,75	Thr120
13	-125,94	-1,09	2,71	Tyr128
		-2,50	3,26	Gly115
1	-124,64	-2,5	2,89	Tyr128

Cada interação do reativador com a enzima foi analisada, destacando os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com a oxima em estudo. Os resíduos de aminoácido da *HssBChE* que interagiram com as conformações da oxima *II* foram: Gly115, Thr120 e Tyr128 (Figura 13), com as seguintes energias de interação, -2,39, 0,86, -1,09, -2,50 e -2,50 kcal·mol<sup>-1</sup>, respectivamente, e permanecendo a uma distância máxima de 3,26 Å.

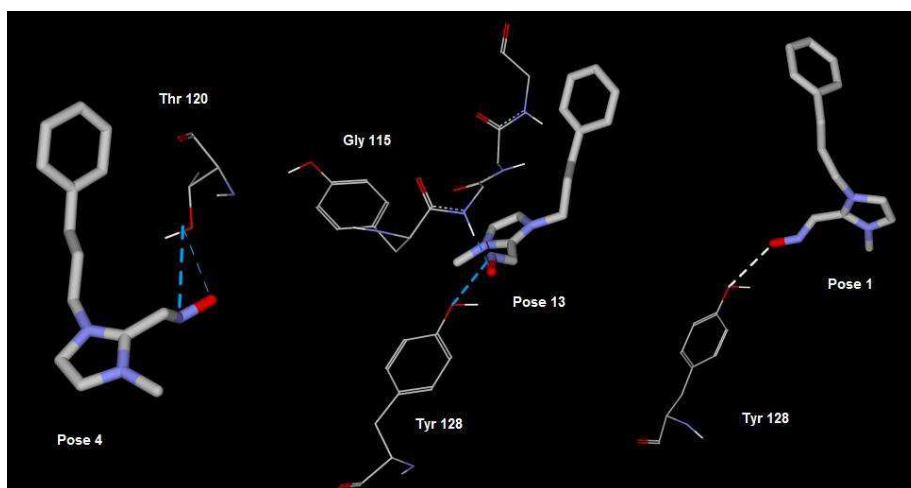


Figura 13 Ligações hidrogênio formadas entre as conformações da oxima *II* e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HssBChE/GF*

As duas únicas diferenças entre as estruturas das oximas em estudo estão no substituinte metílico e na carga positiva presente em um dos nitrogênios do anel heterocíclico da oxima *II*. Essas diferenças estruturais proporcionam a oxima *II* uma maior estabilidade de entrada no sítio ativo da *HssBChE* em relação a oxima *I*. Visto que o sítio ativo da *HssBChE* possui uma cavidade aniônica, ou seja, uma região onde a densidade eletrônica é maior, um composto com uma carga positiva (oxima *II*) gera estabilidade adicional quando comparado com outro no estado neutro (oxima *I*). É importante observar que

uma mudança mínima na estrutura molecular das oximas pode interferir na sua reatividade e logo, na sua capacidade de reativação da *HssBChE*.

### 5.1.2 Seleção de estruturas

Uma vez realizado o ancoramento molecular, o MVD (THOMSEM; CHRISTENSEN, 2006) reporta inúmeras poses, ou confôrmeros de entrada no sítio ativo da enzima com seus respectivos valores de energia. Usualmente, os confôrmeros de menor energia são escolhidos para representar a oxima no mecanismo de reação. No entanto, esse método de selecionar os confôrmeros de menor energia pode não ser satisfatório (CUNHA et al., 2012), pois nem sempre as poses de menor energia serão representativas, gerando confôrmeros efetivos para a reação. Isto pode levar a uma inconsistência no método de seleção de estruturas para o mecanismo de reação a partir dos resultados de ancoramento molecular. Por meio da ACP pode-se explicar a falha em escolher as poses de menor energia para representar a estrutura no mecanismo de reação. A seguir será discutida a aplicação da ACP para as oximas *I* e *II* na reativação do complexo *HssBChE/GF*.

A Figura 14 mostra a seleção das componentes principais (novas variáveis geradas) e a porcentagem de variação explicada pela componente está no eixo das ordenadas e os autovalores estão representados em ordem decrescente no eixo das abscissas. Como se pode observar na Figura 14, as duas primeiras componentes explicam cerca de 70% da variância total, havendo uma estabilização relativa do gráfico após a segunda componente. Pode-se observar, também, que as outras componentes apresentaram sempre uma menor taxa de explicação, não sendo aconselhável incluí-las na análise neste caso.

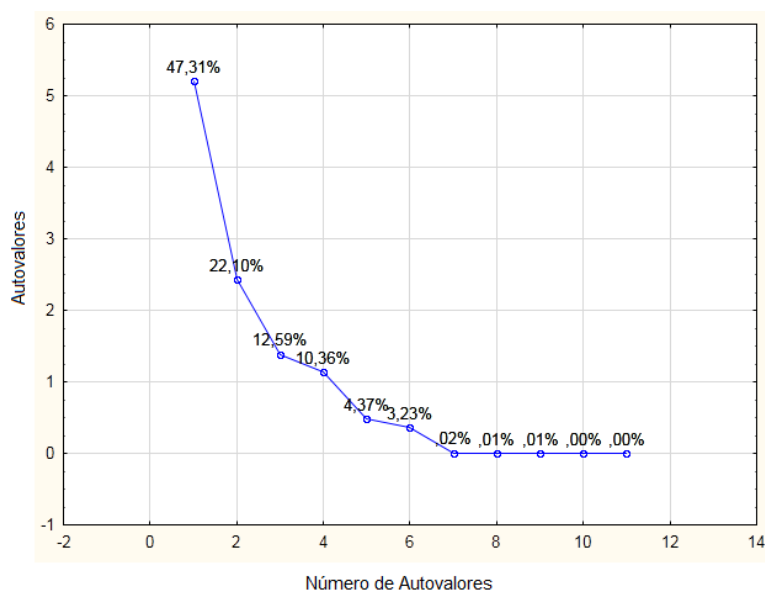


Figura 14 Gráfico da explicação de proporção de variação de cada componente principal do sistema *HssBChE/GF/Oxima I*

A interpretação dos componentes principais é, sem dúvida, um dos pontos mais delicados da análise. Aqui, um aspecto importante que pode ser explorado é a correlação das variáveis originais com as componentes, as quais fornecem a contribuição de maior relevância entre as variáveis. A Figura 15 apresenta informações sobre as variáveis no chamado gráfico de pesos onde  $P_x$ ,  $P_y$  e  $P_z$  representam as coordenadas cartesianas do átomo de P do GF,  $O_{Ser_x}$ ,  $O_{Ser_y}$  e  $O_{Ser_z}$  representam as coordenadas cartesianas do átomo de O da Ser198 e  $O_{Ox_x}$ ,  $O_{Ox_y}$  e  $O_{Ox_z}$  correspondem às coordenadas do átomo de O da oxima *I*.

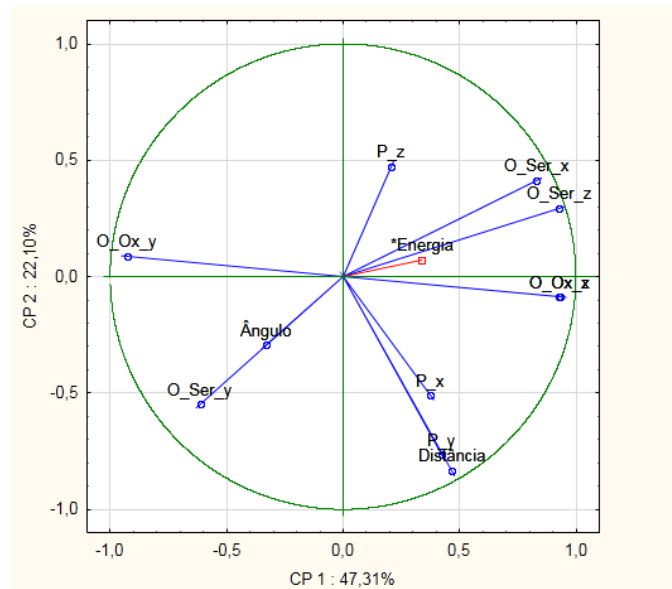


Figura 15 Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações para o sistema *HssBChE/GF/Oxima I*

A Figura 15 retrata o círculo de correlação unitário com a nuvem de variáveis. Pode-se observar que as variáveis se aglomeraram em quatro regiões principais (quatro quartos do círculo). No primeiro semicírculo, observa-se que as variáveis O\_Ser\_z, O\_Ser\_x, P\_z e energia possuem alta correlação estatística, pois se encontram na mesma região do círculo. Como o foco é avaliar a energia de interação como variável efetiva, a interpretação irá focar apenas nas correlações envolvendo esta variável.

A representatividade de um quarto de círculo é medida pelo tamanho desse vetor. Quando o valor tende a 1, essa variável possui alto peso em relação às outras, ou seja, ela possui maior representatividade. Na região em estudo pode-se observar que as variáveis de maior representatividade são as coordenadas cartesianas z e x da Serina. Conseqüentemente as de menor peso

são a coordenada cartesiana  $z$  do P do GF e a energia. Esse resultado indica que a variável energia não se mostra uma boa opção como parâmetro de escolha.

Da mesma forma que para a oxima *I*, foi realizado um estudo onde se demonstra as porcentagens de variação de cada componente principal para a oxima *II*. Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 16.

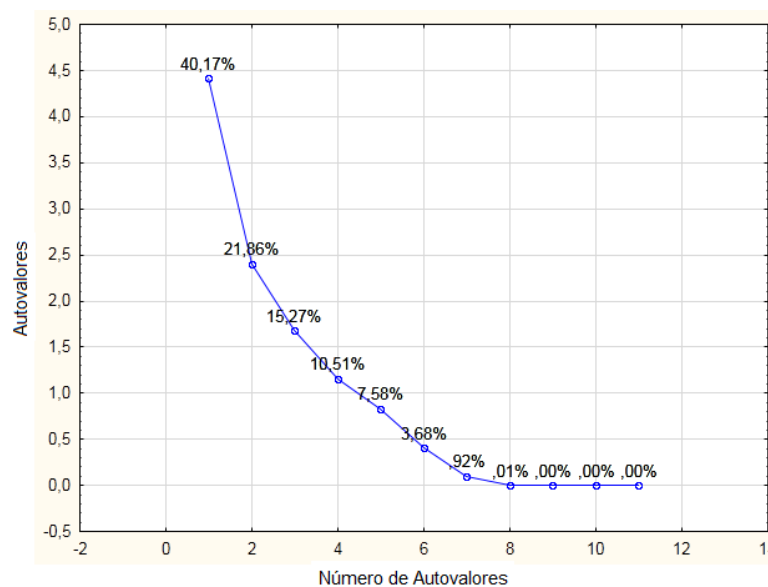


Figura 16 Gráfico de explicação da proporção de variação de cada componente principal para o sistema *HssBChE/GF/Oxima II*

Da mesma forma que para a oxima *I*, serão utilizadas para este estudo apenas duas componentes que representam cerca de 62 % do sistema original de dados. A redução de variáveis consiste basicamente em extrair o mínimo de variáveis com a máxima porcentagem de explicação do conjunto original de dados. Nesse caso a porcentagem de explicação da terceira componente não é significativa o suficiente para que ela seja adicionada no estudo.

O gráfico de pesos para a oxima *II* no sistema *HssBChE/GF*, expressando o comportamento das duas primeiras variáveis, é apresentado na Figura 17.

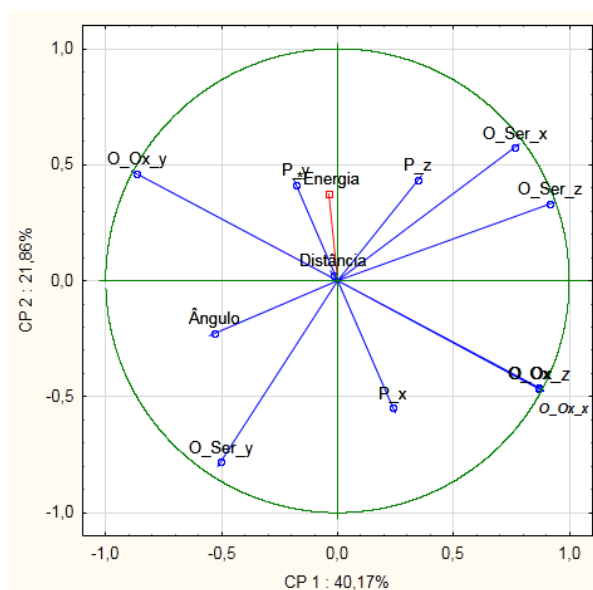


Figura 17 Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações para o sistema *HssBChE/GF/Oxima II*

Na Figura 17, pode-se observar que as variáveis O\_Ser\_x, O\_Ser\_y, O\_Ser\_z, O\_Ox\_x, O\_Ox\_y e O\_Ox\_z possuem um maior peso em relação às demais variáveis (P\_x, P\_y, P\_z, distância, ângulo e energia) que se encontram mais distantes do perímetro do círculo unitário. Como no caso da oxima *I*, foi observado que a energia é um parâmetro inadequado para representar o grupo. As coordenadas da Ser198 e da oxima *II* representam, portanto, com maior peso o grupo de variáveis em estudo.

Os resultados apresentados nas Figuras 15 e 17 sugerem que a energia de interação não é a variável de maior representatividade para ambas as oximas

no sistema *HssBChE/GF*. Assim, a seleção de estruturas para o mecanismo de reação provenientes do ancoramento molecular, baseada apenas no critério de menor energia, pode não ser adequada.

### 5.1.3 Seleção por frequência de ocupação

Uma vez que a energia não pode ser colocada como parâmetro de escolha, surge a questão de como garimpar os resultados de ancoramento molecular para escolher a conformação (pose) mais adequada para os estudos de mecanismo de reação. É desejável que esta conformação seja um bom representante do conjunto constituído pelas várias formas de interação da oxima com a *HssBChE*. Procurou-se resolver esse problema por meio do método quimiométrico de ACP-3D (nessa abordagem há o uso de três CP) pelo qual é possível delimitar as moléculas que mais possuem representatividade no conjunto. O método de seleção baseia-se na ideia de frequência de ocupação, ou seja, selecionar a(s) molécula(s) que menos contribui(em) para o desvio padrão da estrutura mediana.

A Figura 18 apresenta o resultado da análise tridimensional por ACP para a oxima *I* no sistema *HssBChE/GF*. A ilustração exprime em apenas três dimensões uma representatividade de 67% do conjunto original de dados.



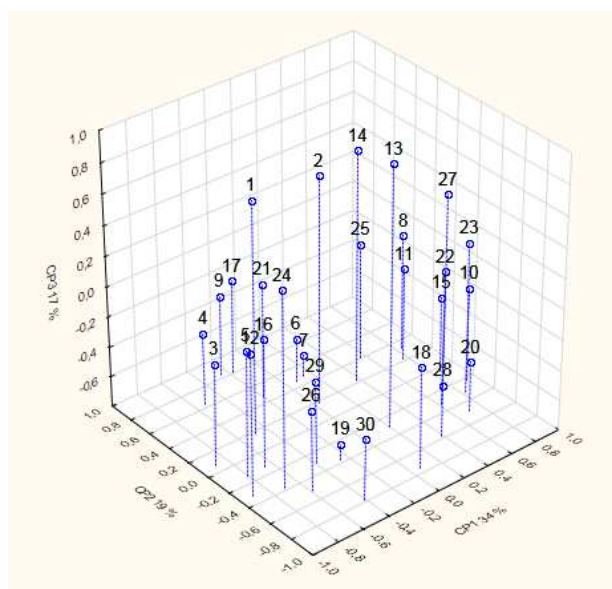


Figura 18 Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema *HssBChE/GF/Oxima I*

Em um gráfico tridimensional, a interpretação varia em relação ao ângulo de observação dos eixos. Então, serão construídas representações bidimensionais, combinando as projeções de forma a maximizar as informações contidas nelas. Na ACP, a porcentagem de explicação da componente 1 será sempre maior que a da componente 2 e assim sucessivamente. Logo, as projeções que podem representar o conjunto original são: CP1 vs CP2 e CP1 vs CP3, pois sempre  $CP_N > CP_{N+1}$ .

As Figuras 19 e 20 apresentam os ângulos de visão que possibilitam a melhor interpretação e, conseqüentemente, a indicação de um conjunto de poses adequadas para o mecanismo de reação.

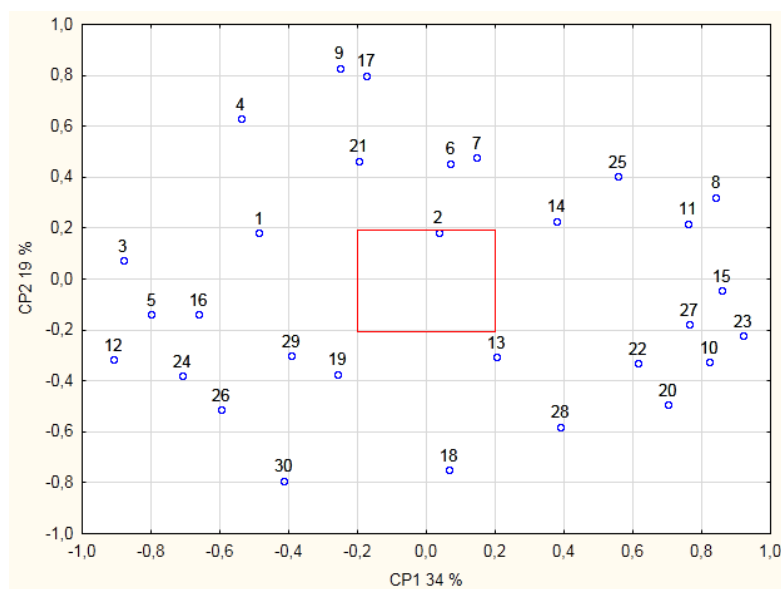


Figura 19 Projeção CP1 vs CP2 para o sistema *HssBChE/GF/Oxima I*

A Figura 19 reporta a dispersão das poses em função da primeira e da segunda CP. A pose 2, que está no limiar do quadrado, é teoricamente o confôrmero mais representativo do conjunto original de dados, ou seja, a pose que possui maior semelhança com a estrutura média, ou aquela que se acredita que possa representar de forma mais adequada a interação entre a oxima e a *HssBChE*. Esta conformação será fundamental para o processo de reativação. Os limites (-0,2 e +0,2) foram escolhidos arbitrariamente e determinam as estruturas mais próximas à pose média, com erro de  $\pm 0,2$ .

A fim de corroborar os resultados encontrados acima, a Figura 20 representa a dispersão das poses em função de CP1 vs CP3. Uma comparação entre as Figuras 19 e 20 foi feita com o objetivo de projetar conformações representativas para o mecanismo de reação.

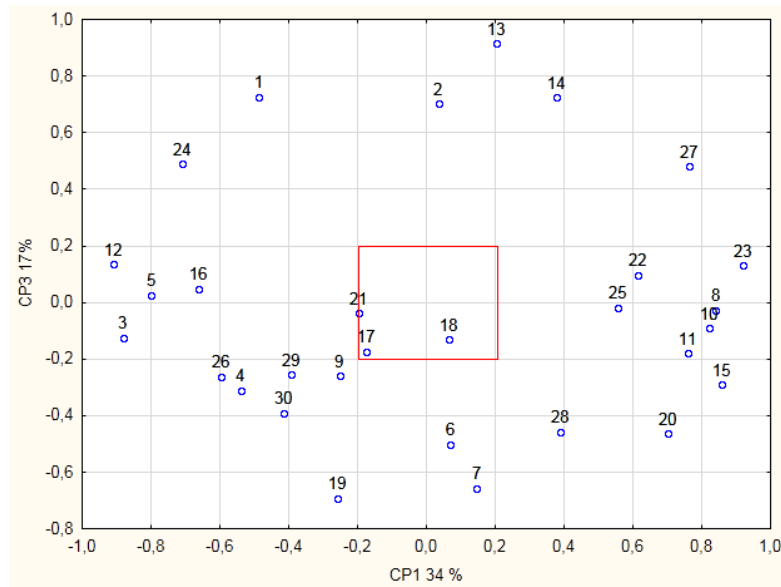


Figura 20 Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema *HssBChE/GF/Oxima I*

Na Figura 20, pode-se observar que as poses que possuem menor variância em relação à média global são as poses 17, 18 e 21. É notável que as poses delimitadas não se repetem nas Figuras 19 e 20, porém, é conhecido que o plano da Figura 19 contém uma maior explicação do conjunto original de dados. Nesse sentido, a ideia será utilizar como primeira aproximação a pose 2, indicada no plano CP1 vs CP2. Se necessário as poses da Figura 20 serão as próximas a serem investigadas. Esta escolha será baseada na menor variância do conjunto original de dados observada via análise multivariada, mais especificamente redução das variáveis em CP.

O mesmo procedimento foi aplicado para a oxima *II*. A Figura 21 representa a projeção tridimensional das primeiras CP as quais de forma ortogonal somam 65%. Esse valor corresponde a representatividade do grupo original de dados com apenas 3 variáveis.

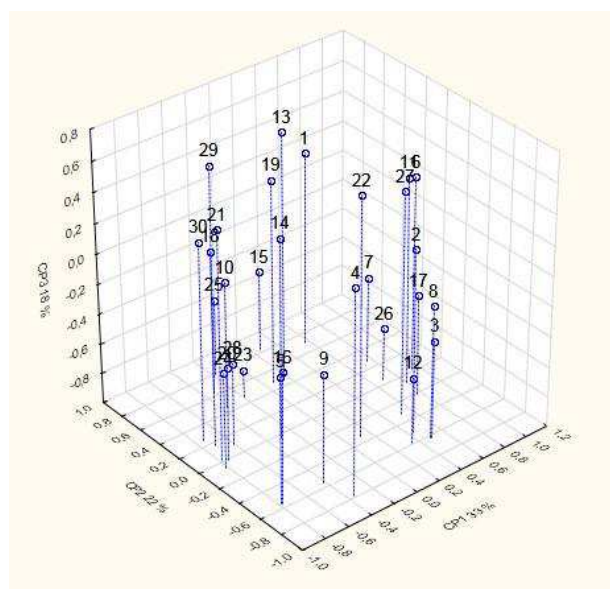


Figura 21 Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema *HssBChE/GF/Oxima II*

As Figuras 22 e 23 representam os dois planos que possibilitaram a melhor interpretação e, conseqüentemente, a indicação de um conjunto de poses que poderão ser usadas no estudo do mecanismo de reação.

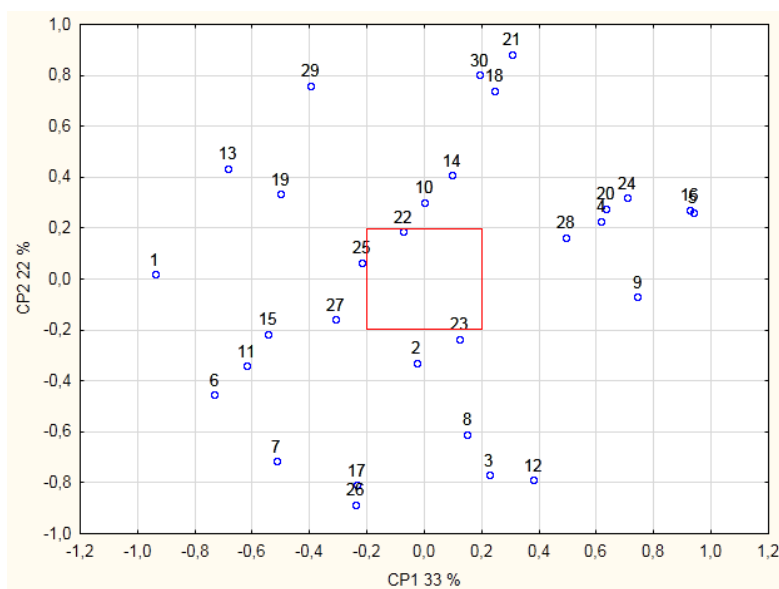


Figura 22 Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema *HssBChE/GF/Oxima II*

A Figura 22 demonstra a dispersão das poses em função da primeira e da segunda CP. A pose 22, que está dentro do quadrado, é teoricamente o confôrmero mais representativo do conjunto original de dados, ou seja, a pose que possui maior semelhança com a estrutura média. Os limites (-0,2 e +0,2), escolhidos arbitrariamente, determinam as estruturas mais próximas à pose média (teórica) com erro de  $\pm 0,2$ .

A Figura 24 representa a dispersão das poses em função da CP1 vs CP3. A comparação entre as Figuras 23 e 24 possibilitou a garimpagem de poses para o estudo do mecanismo de reação.

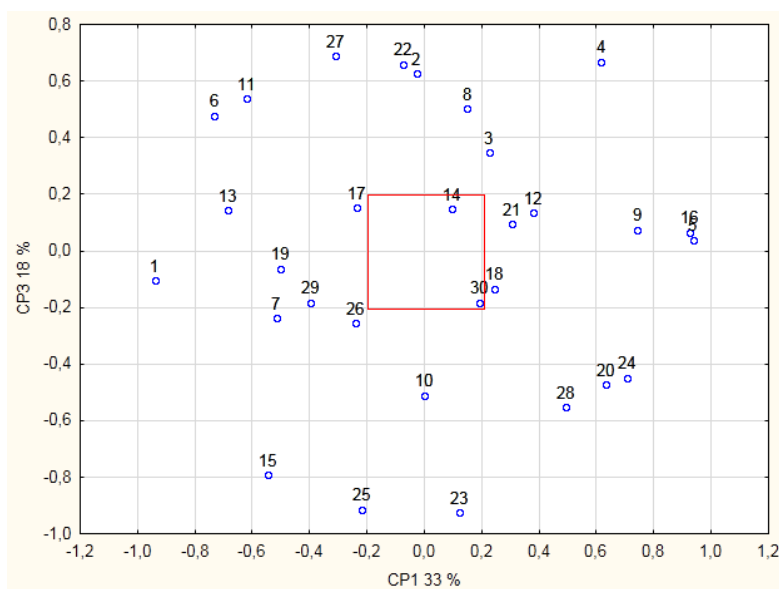


Figura 23 Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema *HssBChE/GF/Oxima II*

Na Figura 23, pode-se observar que as poses que possuem menor variância em relação à média global são as poses 14 e 30. Estatisticamente, as poses 14, 22 e 30 podem formar um conjunto a ser levado ao mecanismo de reação, uma vez que essas estruturas assemelham-se à estrutura média. Elas foram as estruturas que melhor representam a média nessa projeção, ou seja, aquelas que se encontram mais próximas ao ponto de origem das CP (o ponto 0,0). Porém, como o plano CP1 vs CP2 possui maior explicação do conjunto original de dados, para o mecanismo de reação, será usado o confôrmere 22 como primeira aproximação.

Uma vez escolhidas as poses das duas oximas, foi feito um estudo analisando criteriosamente as energias de interação, ligação hidrogênio e força de ligação para as oximas *I* e *II* complexadas com a *HssBChE* inibida por GF. O algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para

avaliar o sítio de ligação *HssBChE* por meio do software MVD (THOMSEM; CHRISTENSEN, 2006).

As energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos do sítio ativo da *HssBChE* e verificar quais fatores são responsáveis pela atividade das oximas.

Na tabela 4 pode-se observar os melhores confôrmeros das oximas *I* e *II* projetados pela ACP e seus respectivos valores de energia de interação e também das ligações hidrogênio feitas com os aminoácidos presentes no sítio ativo do complexo *HssBChE*/GF.

Tabela 4 Valores de energia de encuramento das poses das oximas *I* e *II* escolhidas por ACP no complexo *HssBChE*/GF

Oxima	Pose	Energia Intermolecular (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação de Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Comprimento da ligação de Hidrogênio (Å)	Aminoácidos
<i>I</i>	2	-122,76	-0,22	2,92	Trp82
<i>II</i>	22	-94,15	-2,5	2,84	Thr120
			-1,95	3,20	Thr120

Analisando a tabela 4, pode-se observar que a oxima *I* possui menor energia intermolecular e faz uma ligação hidrogênio com o resíduo Trp82 da *HssBChE*. Porém, como demonstrado anteriormente, apenas a variável energia não consegue apontar um confôrmero reativo, ou seja, aquele capaz de formar o ET favorável para a conclusão da reação.

#### 5.1.4 Mecanismo de reação

A fim de projetar novos e mais estereoseletivo reativadores da *HssBChE*, é fundamental compreender os processos mecanísticos da reação química em questão. A química computacional é capaz de investigar e, consequentemente, maximizar o processo de reativação levando em conta os efeitos estéricos ou deformativos e eletrônicos da reação química.

O estudo por QM/MM é o primeiro passo na compreensão, de forma teórica, do processo de reativação, pelas oximas *I* e *II*, da *HssBChE* inibida por GB e GF. Uma vez dentro da cavidade da enzima, o reativador precisa sequestrar o P ligado a Ser198. Para avaliar teoricamente esse processo simulou-se, em nível QM/TFD, o mecanismo da reação. Por meio do método de cálculo da CEP (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006) foi possível prever o produto da reação por meio dos estados de transição (E-OP\*Ox) da reação: E-OP + Ox. Os resultados mostram que a oxima *I* desviou muito do sistema S<sub>N</sub>2 padrão, pois sua curva de energia potencial (Figura 24) tende ao modelo de transição do tipo poço triplo (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006). A reação S<sub>N</sub>2 perfeita seria representada pelo gráfico de transição do tipo poço único. O gráfico da Figura 24 sugere que a oxima *I* efetua seu ataque ao átomo de P do complexo *HssBChE*/GF a uma distância em torno de 4,3 Å. Tal fato pode ser observado pelos pontos de sela do gráfico CEP, onde os estados intermediários, principais e posteriores de transição são representados pelas letras: **a**, **b**, **c**, **d** e **e**.



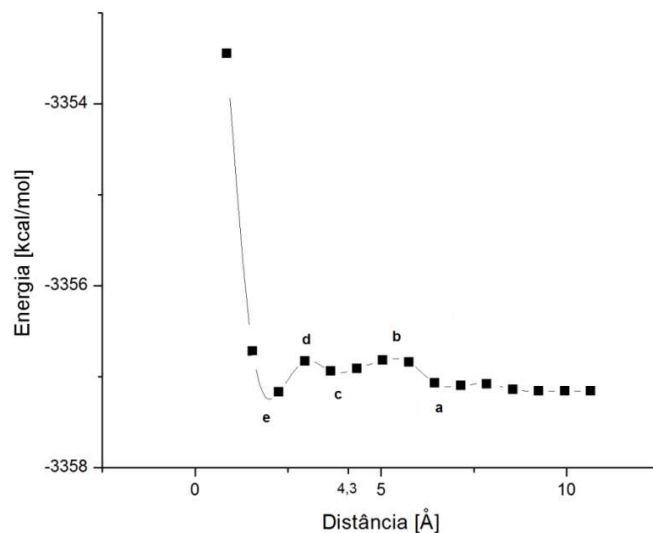


Figura 24 Curva de variação da energia potencial  $\Delta E$  ao longo da reação entre a oxima *I* e o sistema *HssBChE/GF*

O modelo de poço triplo é caracterizado na Figura 24 pela presença dos dois intermediários de ET, o RC (a, 6,45 Å) e preET (b, 5,75 Å), um ET (c, 4,35 Å) e os dois ET posteriores, postET (d, 3,65 Å) e PC (e, 2,95 Å) gerando uma curva bastante singular. A fim de investigar com mais detalhe os efeitos eletrônicos e estéricos que governam a formação dos ET, as contribuições das energias eletrônica (EE) e deformacional (ED) para o modelo poço triplo foram calculadas e são apresentadas na Figura 25. Neste sentido, pode-se notar que à medida que os reagentes se transformam em ET que potencialmente se rearranjaram para formar produtos, ou seja, naquele momento de rompimento e formação de ligações químicas, a EE aumenta de forma assintótica passando por dois pontos de sela. Já a contribuição da ED decai bruscamente passando por três pontos de inflexão. A fim de esmiuçar os ET envolvidos no processo de reativação da enzima, foi feita uma análise da contribuição de dois parâmetros

químicos, os eletrônicos e estéricos entre oxima e enzima. Pode-se ver pela Figura 25 que a contribuição da energia de interação é maior em todos os ET da reação de reativação da enzima.

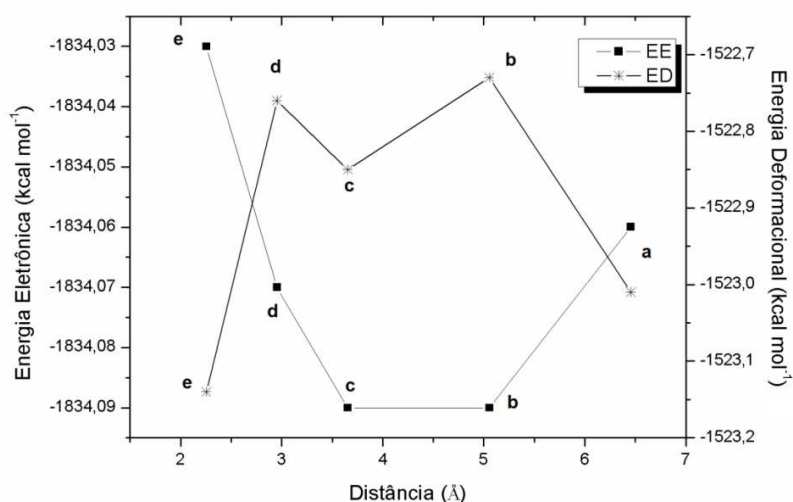


Figura 25 Contribuição das energias eletrônica e deformacional nos ET para as interações entre a oxima *I* e o complexo *HssBChE/GF*

Isso sugere que a oxima *I* é bastante promissora, pois na distância ancorada na enzima ela já inicia uma interação elétrica com a estrutura inibida que pode levá-la para dentro do sítio ativo da *HssBChE*. Logo após esse momento, as EE aumentam sua contribuição na formação dos ET. Ou seja, ocorrem deformações favoráveis para que haja arranjos mais estáveis para a formação dos ET, e conseqüentemente, à formação dos produtos E-OH e Ox\*P. A enzima reativada (E-OH) pode agora retornar a sua atividade bioquímica. Já nos ET seguintes a contribuição da EE supera em torno de -0,34 e -0,12 kcal·mol<sup>-1</sup> no preET e no postET, respectivamente. Uma vez que a distância vai diminuindo é natural que as ED caiam abruptamente, pois nesse momento todos

os átomos já adquiriram posição favorável para a reação acontecer. No estado PC, a diferença de energia é de  $-0,27 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

A Figura 26 ilustra o gráfico de CEP (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006), para a reativação, pela oxima II, da *HssBChE* inibida por GF. Nesse gráfico é possível notar que a oxima II começa a substituição do átomo de P por um átomo de H a uma distância de  $7,35 \text{ \AA}$  do GF. De mesma forma que para a oxima I, o modelo do poço triplo mostrou-se o mais adequado para elucidar os ET dessa oxima na reativação molecular.

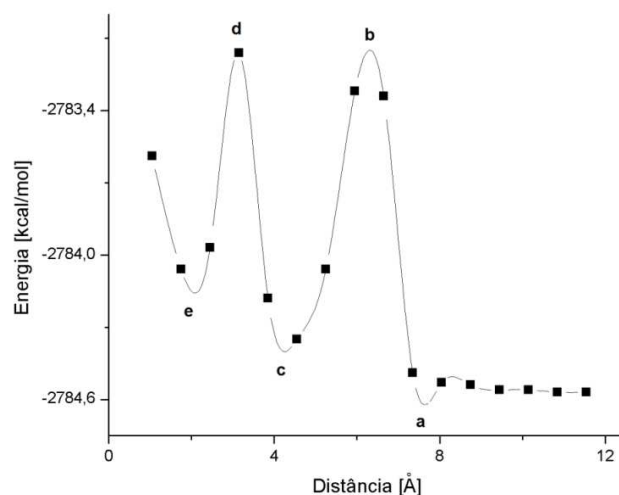


Figura 26 Curva de energia potencial  $\Delta E$  ao longo da reação entre a oxima II e o complexo *HssBChE*/GF

Para a oxima II, os preET ocorreram em  $7,45 \text{ \AA}$  (a, RC),  $5,95 \text{ \AA}$  (b, preET),  $4,55 \text{ \AA}$  (c, ET/TC),  $3,15 \text{ \AA}$  (d, postET) e  $1,75 \text{ \AA}$  (e, PC). A curva gerada pelo CEP (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006) sugere que os ET foram mais acentuados e as curvas de energia que representam os estados intermediários da reação foram mais agudas quando comparadas com a oxima I.

De modo a entender melhor o mecanismo de reação para a oxima *II*, foi calculada a contribuição das EE e das ED na reativação da *HssBChE* inibida por GF (Figura 27).

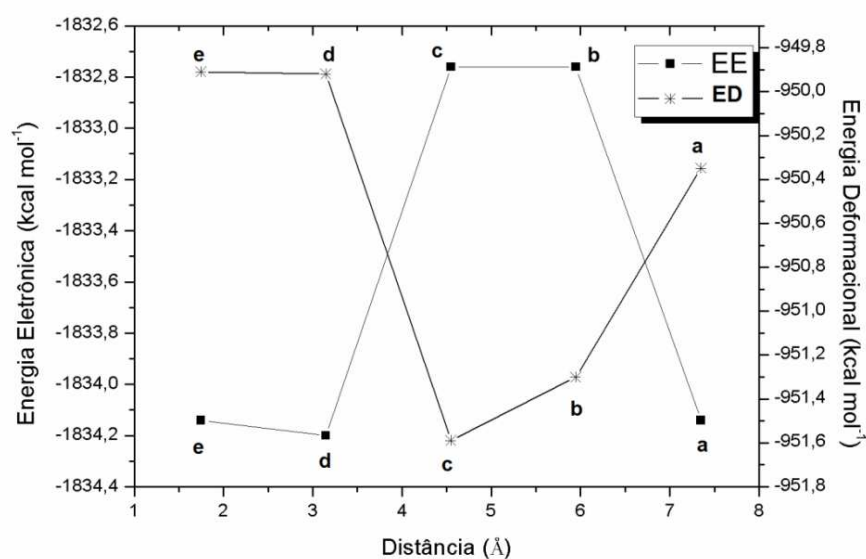


Figura 27 Contribuição das energias eletrônica e deformacional nos ET para as interações entre a oxima *II* e o complexo *HssBChE*/GF

Pode-se notar que antes da formação dos pré-estados intermediários ( $d > 7,5\text{\AA}$ ), a contribuição da ED é bastante inferior à EE relativa e no ponto RC a diferença é de  $-0,95\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . À medida que a distância vai diminuindo é possível notar que a diferença entre as EE e ED relativas vão aumentando. No preET e no ET/TC a discrepância é de  $-0,29$  e  $-0,23\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivamente. Após a formação do estado ET/TC a diferença entre as energias é mais acentuada, girando em torno de  $-0,05\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Fato que corrobora os resultados experimentais que mostram que a oxima *II* é muito mais reativa com a *HssBChE* inibida por GF. Se considerarmos as distâncias do ET/TC, para as

oximas *I* e *II*, é factível que o ataque ao P complexado com a enzima ocorra a uma distância de 7,35 Å. Portanto, o ataque ao P pela oxima *II* ocorre 3Å antes quando comparado com a oxima *I*, fato que corrobora o experimental nos resultados das constantes de velocidade para a reativação. A razão  $K_{\text{obs}}^{\text{OXIMAI}}/K_{\text{obs}}^{\text{OXIMAI}} = 24,78$  sugere que a reação de substituição entre E-OP e Oxima *II* ocorre cerca de 24,78 vezes mais rápido que a oxima *I*. A fim de comparar as capacidades de reativação das duas oximas foi construído o gráfico da Figura 28 que apresenta as energias relativas das mesmas em função da distância entre o P do GF (E-OP) e o O da oxima (Ox-H).

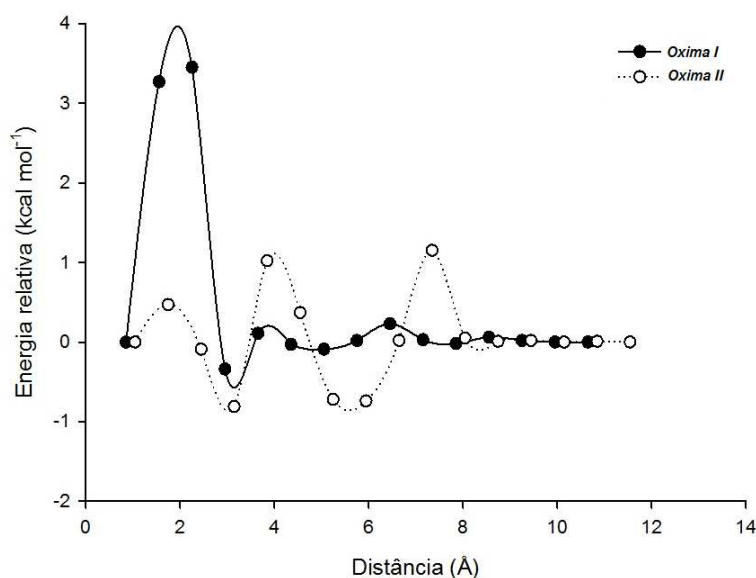


Figura 28 Comparação entre as oximas *I* e *II* na formação do ET com a *HssBChE* inibida por GF

Nota-se pela curva tracejada na Figura 28 que a oxima *II* apresenta pontos de inflexão mais agudos e a uma distância superior em relação à oxima *I*. Deste modo, os ET da oxima *II* são mais favoráveis energeticamente,

viabilizando o ataque nucleofílico a distâncias maiores quando comparada à oxima *I*.

## 5.2 *HssBChE* inibida por sarin

Os resultados de ancoramento molecular, estudos por TFD do mecanismo da reação e quimiometria para o sistema *HssBChE*/GB estão descritos e discutidos nos subitens a seguir.

### 5.2.1 Ancoramento Molecular

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para avaliar o sítio de ligação do sistema *HssBChE*/GB por meio do software MVD (THOMSEM; CHRISTENSEN, 2006). O volume da cavidade calculado foi de 352,57 Å<sup>3</sup> (Figura 29).

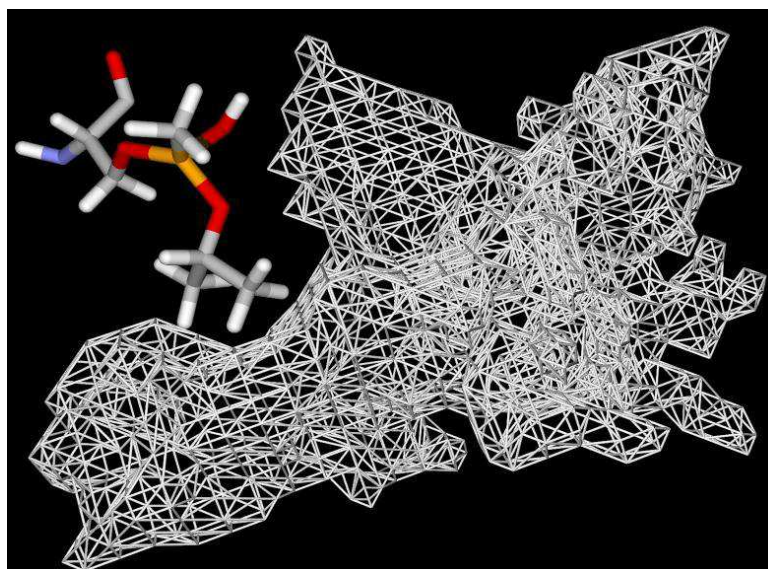


Figura 29 Cavidade em estudo para o sistema *HssBChE*/GB

Os resultados teóricos obtidos no ancoramento molecular das oximas *I* e *II* no complexo *HssBChE/GB* foram avaliados e comparados com os resultados experimentais apresentados na Tabela 1. As oximas em estudo foram ancoradas no sítio ativo do complexo *HssBChE/GB* usando como referência a estrutura da HI-6 copiada da estrutura cristalográfica da *MmAChE* depositada no PDB (BERMAN; LEONARD, 1990) sob o código 2Y2V, por Akfur, Artursson e Ekstrom (2013). As energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos do sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores responsáveis pela atividade das oximas.

Na tabela 5 são exibidos os valores de energia de interação e das ligações hidrogênio com os aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBChE/GB* para as três poses de menor energia de interação intermolecular da oxima *I*.

Tabela 5 Valores de energia de ancoramento entre as melhores conformações da oxima *I* e o complexo *HssBChE/GB*

Pose	Energia Intermolecular (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação de Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Distância (Å)	Aminoácidos
2	- 122,37	-2,50	2,78	His438
		- 0,67	3,29	Trp82
8	-119,12	-1,16	3,25	Trp82
		-2,49	2,60	Gly78
		-1,62	3,07	Trp430
		-2,5	2,92	Tyr440
20	-118,97	-1,08	3,38	Thr120
		-2,5	2,86	Thr120
		-2,5	3,09	Gly115
		-2,5	2,63	Tyr128

A partir dos conformêros selecionados, foram analisadas as interações intermoleculares realizadas entre a oxima *I* e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBCHE/GB* (Figura 30). Nesse sentido, cada ligação hidrogênio formada entre a respectiva pose e a enzima foi analisada, destacando sempre os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com as oximas em estudo. Os aminoácidos da *HssBChE* que interagiram com as conformações selecionadas foram Gly 78, Trp 82, Gly 115, Thr 120, Tyr128, Trp 430, His438 e Tyr440. É observado que a pose 2 realiza 2 ligações hidrogênio com energias de  $-2,50$ ,  $-0,67$  kcal·mol<sup>-1</sup>, enquanto as poses 8 e 20 realizam 4 com energias em torno de  $-1,16$ ,  $-2,49$ ,  $-1,62$ ,  $-2,50$ ,  $-1,08$ ,  $-2,50$ ,  $-2,50$  e  $-2,50$  kcal·mol<sup>-1</sup>. Já as distâncias das ligações hidrogênio variaram de 2,60 à 3,28 Å, respectivamente.

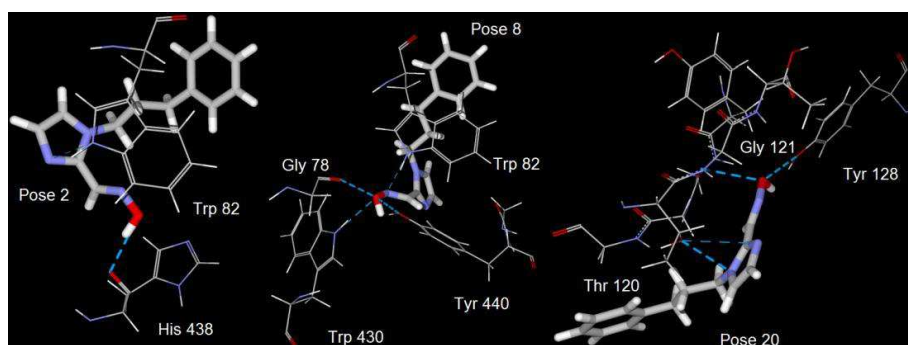


Figura 30 Ligações hidrogênio formadas entre as poses de menor energia da oxima *I* e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do sistema *HssBChE/GB*

Na tabela 6 são apresentados os valores de energia de interação intermolecular e das ligações hidrogênio com os aminoácidos do sítio ativo do complexo *HssBChE/GB* para as três poses de menor energia da oxima *II*.



Tabela 6 Valores de energia de encuramento entre as melhores poses da oxima *II* e o complexo *HssBChE/GB*

Pose	Energia Intermolecular (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação de Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Comprimento da ligação (Å)	Aminoácidos
24	- 134,24	-2,25	3,19	Tyr128
		-2,50	3,15	Tyr128
		-1,82	2,69	Tyr128
		-2,50	3,20	Glu197
		-1,23	3,11	Gly115
6	-129,34	-0,23	3,11	Trp82
		-0,10	2,61	Trp82
		-2,50	2,95	His438
0	-129,32	-2,50	3,09	Tyr128
		-0,33	3,00	Gly121
		-2,50	3,18	Trp82

Cada interação do reativador com a enzima foi analisada, destacando os aminoácidos que interagiram mais fortemente com as oximas em estudo. Pode-se observar que a oxima *II* apresentou mais interações no sítio do complexo *HssBChE/GB* que do complexo *HssBChE/GF*. Fato que sugere uma maior afinidade pelo sítio ativo da enzima inibida por GB. Os resíduos de aminoácidos da *HssBChE* que interagiram mais fortemente com as conformações da oxima *II* foram a Trp82, Gly115, Gly121, Tyr128, Glu197 e His438 (Figura 31), com as respectivas energias de interação, -1,82, -2,25, -1,82, -0,23, -0,10, -1,23, -0,33, -2,50, -2,50 e -2,50 kcal·mol<sup>-1</sup>, permanecendo a uma distância de no máximo 3,20 Å.

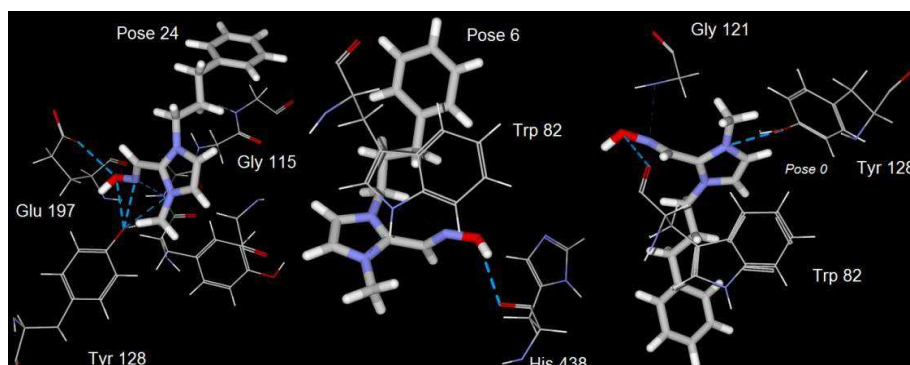


Figura 31 Ligações hidrogênio formadas entre as conformações da oxima *II* e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do complexo *HssBChE/GB*

### 5.2.2 Seleção de estruturas

A Figura 30 mostra a seleção das CP (novas variáveis geradas), para o sistema *HssBChE/GB/Oxima I*, visto que a porcentagem de variação explicada pela componente está no eixo das ordenadas, e os autovalores estão representados em ordem decrescente no eixo das abscissas. Como se pode observar na Figura 31, as duas primeiras componentes explicam cerca de 69% da variância total, havendo uma estabilização relativa do gráfico após a segunda componente. Pode-se observar, também, que as outras componentes apresentaram sempre uma menor taxa de explicação, não sendo aconselhável incluí-las na análise neste caso.

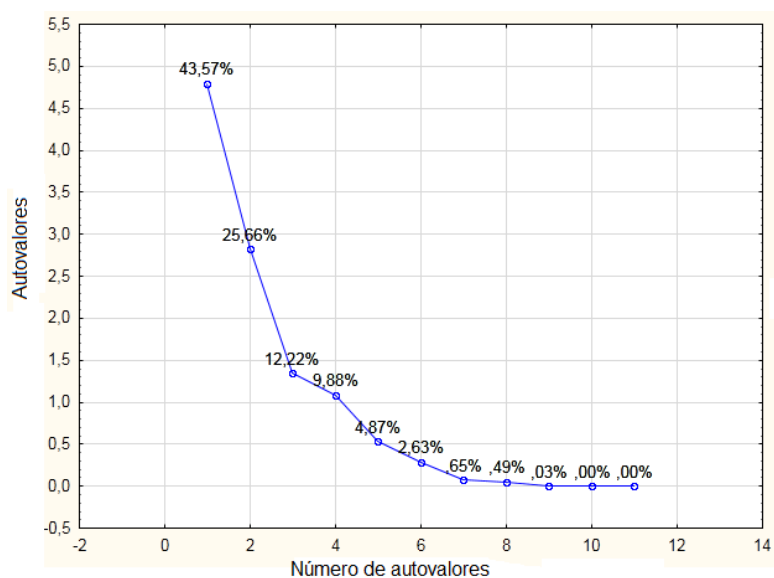


Figura 32 Gráfico da explicação de proporção de variação de cada componente principal do sistema *HssBChE/GB/Oxima I*

A Figura 33 apresenta informações sobre as variáveis no gráfico de pesos, em que  $P_x$ ,  $P_y$  e  $P_z$  representam as coordenadas cartesianas do átomo de P do GB,  $O_{Ser_x}$ ,  $O_{Ser_y}$  e  $O_{Ser_z}$  representam as coordenadas cartesianas do átomo de O da Ser198 e  $O_{Ox_x}$ ,  $O_{Ox_y}$  e  $O_{Ox_z}$  correspondem às coordenadas do átomo de O da oxima *I*.

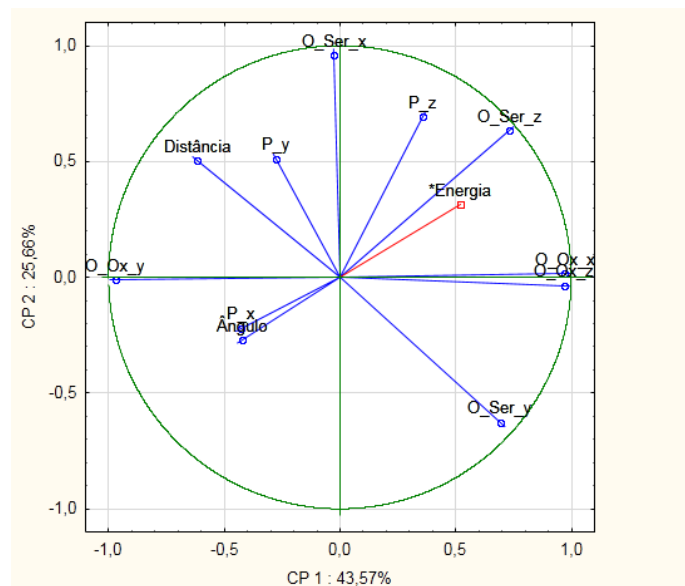


Figura 33 Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações do sistema *HssBChE/GB/Oxima I*

No primeiro semicírculo, observa-se que as variáveis  $P_z$ ,  $O\_Ser_z$ ,  $O\_Ox_x$  e energia possuem alta correlação estatística, pois se encontram na mesma região do círculo. As variáveis  $O\_Ser_z$  e  $O\_Ox_x$  possuem a maior representatividade deste grupo, acompanhadas pela coordenada  $z$  do  $P$  e finalmente pela variável energia. Como o foco é avaliar a energia de interação como variável efetiva, a interpretação irá focar apenas nas correlações envolvendo esta variável.

A representatividade de um  $\frac{1}{4}$  de círculo é medida pelo tamanho desse vetor. Quando o valor tende a um, essa variável possui alto peso em relação às outras, ou seja, ela possui maior representatividade. Na região em estudo pode-se observar que as variáveis de maior representatividade são as coordenadas cartesianas da serina e, também, da oxima. Consequentemente as de menor peso

são a coordenada cartesiana  $x$  do  $P$  e a energia. Esse resultado indica que a variável energia não se mostra uma boa opção como parâmetro de escolha.

Da mesma forma que para a oxima  $I$ , um estudo em que se avaliam as porcentagens de variação de cada componente principal para a oxima  $II$  foi realizado. Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 34.

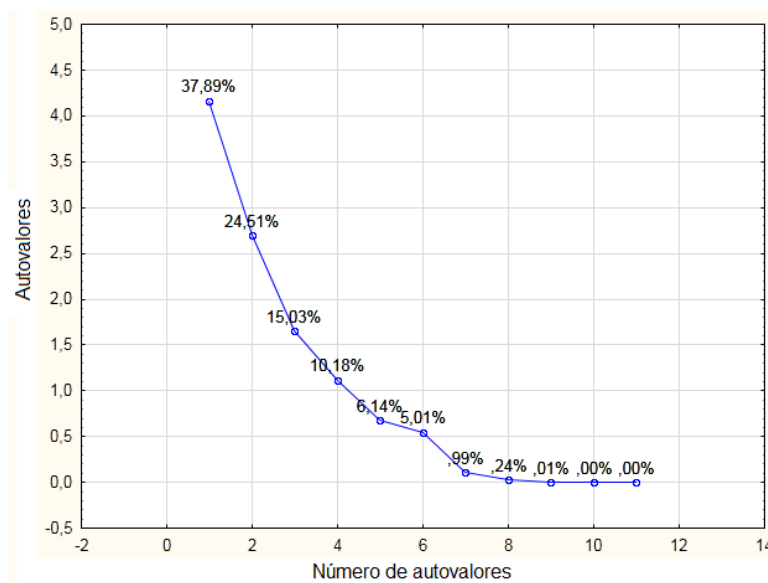


Figura 34 Gráfico de explicação da proporção de variação de cada CP do sistema *HssBChE/GB/Oxima II*

Da mesma forma que para a oxima  $I$ , apenas duas componentes, que representam cerca de 62% do sistema original de dados, serão utilizadas para esse estudo. A redução de variáveis consiste basicamente em extrair o mínimo de variáveis com a máxima porcentagem de explicação do conjunto original de dados. Nesse caso, a porcentagem de explicação da terceira componente não é significativa o suficiente para que ela seja adicionada no estudo.

O gráfico de pesos, expressando o comportamento das duas primeiras variáveis, para a oxima *II* no sistema *HssBChE/GB*, é apresentado na Figura 35.

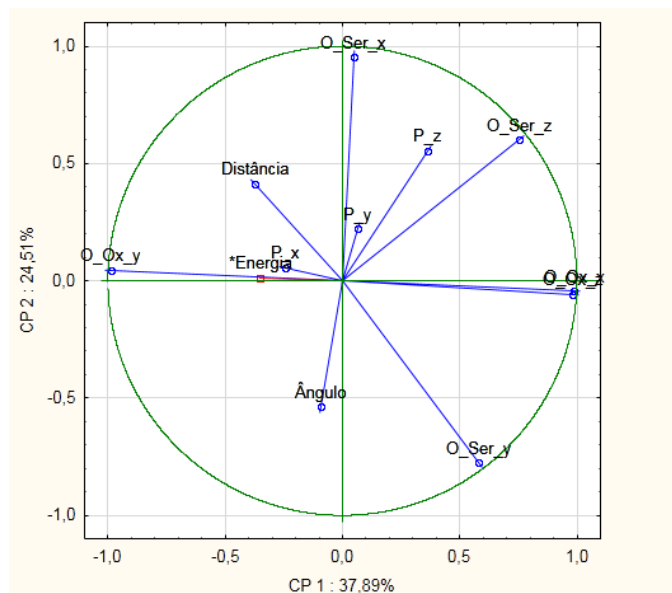


Figura 35 Gráfico da contribuição da nuvem de variáveis, no círculo unitário de correlações do sistema *HssBChE/GB/Oxima II*

Na Figura 35, pode-se observar que as variáveis O\_Ser\_x, O\_Ser\_y, O\_Ser\_z, O\_Ox\_x, O\_Ox\_y e O\_Ox\_z possuem um maior peso em relação às demais variáveis (P\_x, P\_y, P\_z, distância, ângulo e energia) que se encontram mais distantes do perímetro do círculo unitário. Como no caso da oxima *I*, foi observado que a energia é um parâmetro inadequado para se representar o grupo. As coordenadas da Ser198 e da oxima *II* representam, portanto, com maior peso o grupo de variáveis em estudo.

Os resultados apresentados nas Figuras 33 e 35 sugerem que a energia de interação não é a variável de maior representatividade para ambas as oximas no sistema *HssBChE/GB*. Assim, a seleção de estruturas para o mecanismo de

reação provenientes do ancoramento molecular, baseada apenas no critério de menor energia, pode não ser adequada.

### 5.2.3 Seleção por frequência de ocupação

Uma vez que a energia não pode ser colocada como parâmetro de escolha, surge a questão de como garimpar os resultados de ancoramento molecular para escolher a conformação mais adequada para os estudos de mecanismo de reação. É desejável que esta conformação seja um bom representante do conjunto constituído pelas várias formas de interação da oxima com a *HssBChE*. Procurou-se resolver esse problema por meio do método quimiométrico de ACP multivariado, ou 3D por meio do qual é possível delimitar as moléculas que mais possuem representatividade no conjunto. O método de seleção baseia-se na ideia de frequência de ocupação, ou seja, selecionar a(s) molécula(s) que menos contribui (em) para o desvio padrão da estrutura mediana.

A Figura 36 apresenta o resultado da análise tridimensional por ACP para a oxima *I*. A ilustração exprime em apenas três dimensões uma representatividade de 72% do conjunto original de dados.

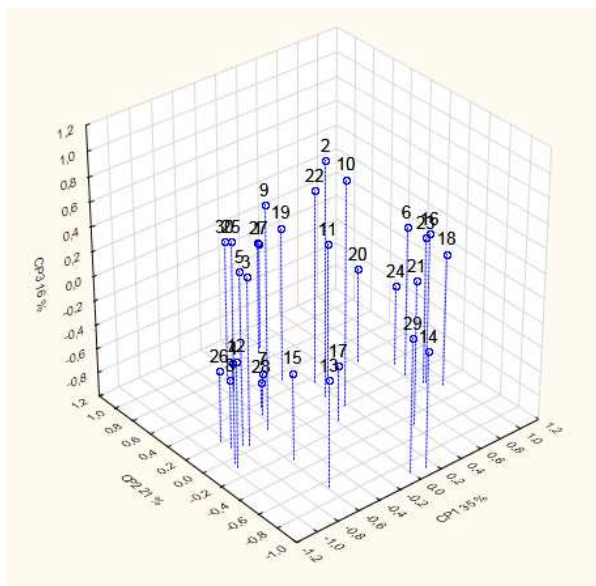


Figura 36 Gráfico tridimensional das três primeiras CP para o sistema *HssBChE/GB/Oxima I*

Em um gráfico tridimensional, a interpretação varia em relação ao ângulo de observação dos eixos. Então, serão construídas representações bidimensionais, combinando as projeções de forma a maximizar as informações contidas nelas. Na ACP multivariada, a porcentagem de explicação da componente 1 será sempre maior que a do componente 2 e, assim, sucessivamente. Portanto, as projeções que podem representar o conjunto original são: CP1 vs CP2 e CP1 vs CP3, pois sempre  $CP_N > CP_{N+1}$ .

As Figuras 37 e 38 apresentam os ângulos de visão que possibilitam a melhor interpretação e, conseqüentemente, a indicação de um conjunto de poses adequadas para o mecanismo de reação.



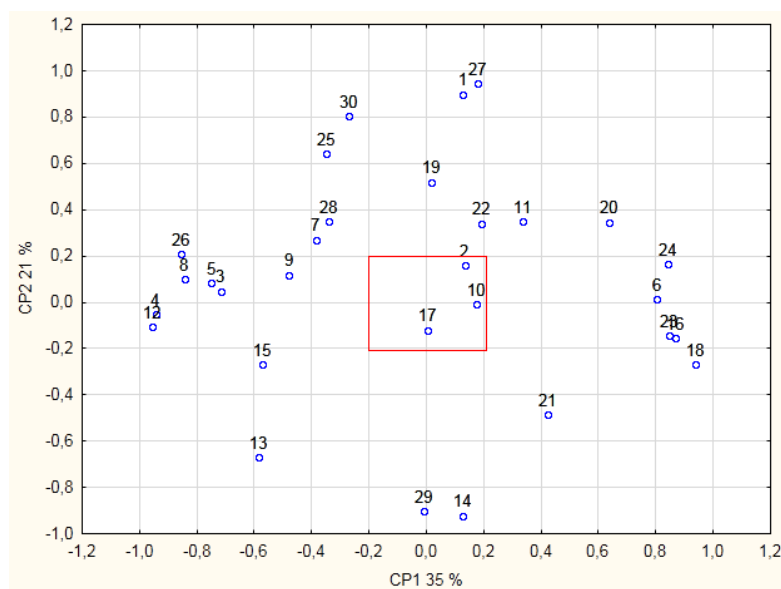


Figura 37 Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema *HssBChE/GB/Oxima I*

A Figura 37 apresenta a dispersão das poses em função da primeira e segunda CP. As poses 17, 10 e 2, dentro do quadrado, são teoricamente os confôrmeros mais representativos do conjunto original de dados, ou seja, as poses que possuem maior semelhança com a estrutura média, ou aquela que se acredita que possa representar de forma mais adequada a interação entre a oxima e a *HssBChE*. Os limites (-0,2 e +0,2) foram escolhidos arbitrariamente. Eles determinam as estruturas mais próximas à pose média (teórica), com erro de  $\pm 0,2$ .

A fim de corroborar os resultados encontrados acima, a Figura 38 demonstra a dispersão das poses em função da CP1 vs CP3. Uma comparação entre as Figuras 18 e 19 foi feita com o objetivo de projetar conformações representativas para o mecanismo de reação.

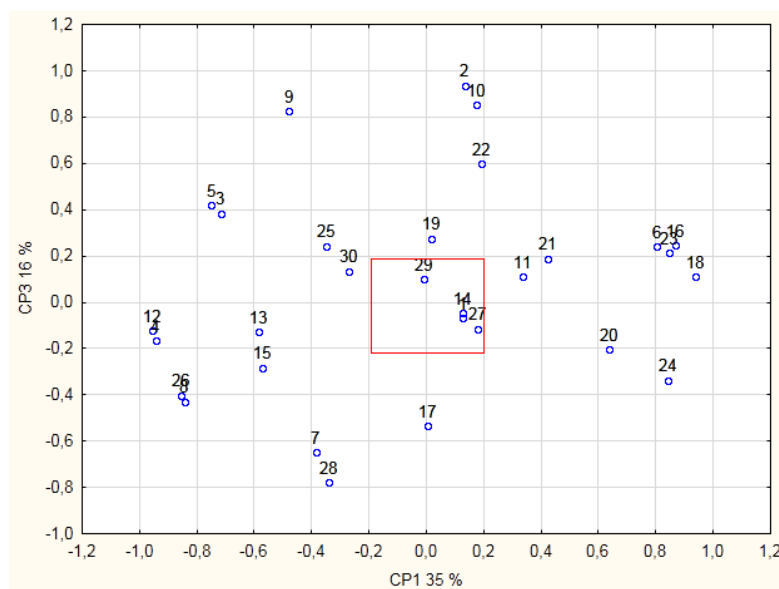


Figura 38 Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema *HssBChE/GB/Oxima I*

Na Figura 38, pode-se observar que as poses que possuem menor variância em relação à média global são as poses 1, 14, 27 e 29. Esses confôrmeros podem ser considerados potenciais candidatos a serem levados ao mecanismo molecular. Portanto, o conjunto de poses a serem consideradas nos estudos do mecanismo molecular será: 1, 2, 10, 14, 17, 27 e 29. As poses delimitadas não se repetem nas Figuras 37 e 38, porém, é conhecido que o plano da Figura 37 apresenta maior explicação do conjunto original de dados. Portanto, a ideia será utilizar como primeira aproximação a pose 17, indicada no plano CP1 vs CP2. Se necessário as poses da Figura 38 serão as próximas a serem investigadas. Esta escolha será baseada na menor variância do conjunto original de dados observada via análise multivariada, mais especificamente redução das variáveis em componentes principais.

O mesmo procedimento descrito acima foi aplicado para a oxima *II*. A Figura 39 representa a projeção tridimensional das primeiras componentes

principais, as quais de forma ortogonal somam 65%. Esse valor corresponde a representatividade do grupo original de dados com apenas 3 variáveis.

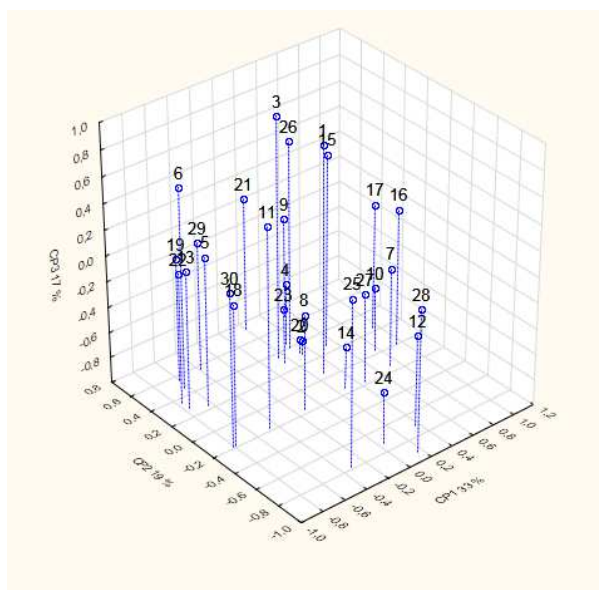


Figura 39 Gráfico tridimensional das três primeiras componentes principais para o sistema *HssBChE/GB/Oxima II*

As Figuras 40 e 41 representam os dois ângulos que possibilitaram a melhor interpretação e, conseqüentemente, a indicação de um conjunto de poses a serem utilizadas nos estudos do mecanismo de reação.

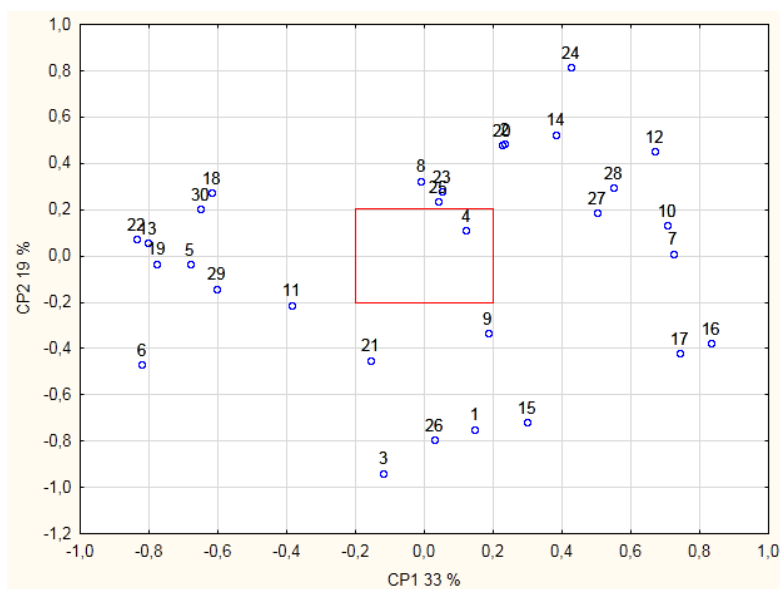


Figura 40 Projeção da CP1 vs CP2 para o sistema *HssBChE/GB/Oxima II*

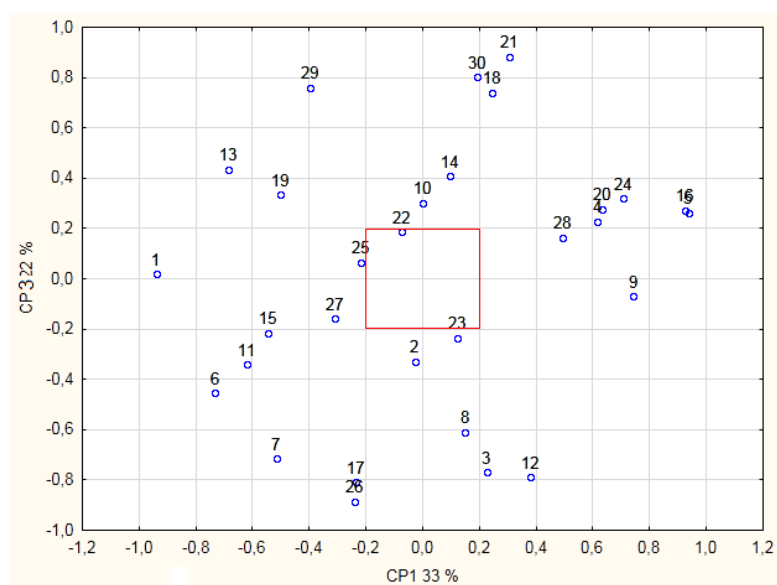


Figura 41 Projeção da CP1 vs CP3 para o sistema *HssBChE/GB/Oxima II*

Na Figura 41 pode-se observar que a pose que possui menor variância em relação à média global é o confôrmero 22. Estatisticamente, as poses 4 e 22 podem formar um conjunto a ser levado ao mecanismo de reação, uma vez que essas estruturas assemelham-se à estrutura média. Elas foram as estruturas que melhor representaram a média nessa projeção, ou seja, aquelas que se encontram mais próximas ao ponto de origem das CP (o ponto 0,0). Porém, como o plano CP1 vs CP2 possui maior explicação do conjunto original de dados, o confôrmero 4 será usado para o mecanismo de reação como primeira aproximação.

Uma vez escolhidas as poses das duas oximas, foi feito um estudo analisando criteriosamente as energias de interação, ligação hidrogênio e força de ligação para as oximas *I* e *II* complexadas com a *HssBChE* inibida por GB. O algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para avaliar o sítio de ligação *HssBChE* por meio do software MVD (THOMSEM; CHRISTENSEN, 2006).

As energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos do sítio ativo da *HssBChE* e verificar quais os fatores são responsáveis pela atividade das oximas.

Na tabela 7, pode-se observar os melhores confôrmeros projetados pela ACP das oximas *I* e *II* e seus respectivos valores de energia de interação e também das ligações hidrogênio feitas com os aminoácidos presentes no sítio ativo do complexo *HssBChE*/GB.

Tabela 7 Valores de energia de encaixe das conformações escolhidas por ACP no complexo *HssBChE/GB*

Oximas	Pose	Energia Intermolecular (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Ligação Hidrogênio (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Distância (Å)	Aminoácidos
<i>I</i>	17	-110,33	-2,46	3,10	Tyr128
			-2,24	3,09	Gly115
			-0,86	2,96	Gly121
<i>II</i>	4	-119,56	-2,5	3,00	Ser287

Analisando a tabela 7, pode-se observar que a oxima *II* possui menor energia intermolecular e faz uma ligação hidrogênio com o resíduo Ser287 da *HssBChE*. Porém, como demonstrado anteriormente, apenas a variável energia não consegue apontar um conformero representativo do conjunto de docking, ou seja, aquele capaz de formar o ET favorável para a conclusão da reação.

#### 5.2.4 Mecanismo de reação

Os resultados dos estudos do mecanismo de reação para o sistema *HssBChE/GB* mostram que a oxima *I* desviou muito do sistema S<sub>N</sub>2 padrão, pois sua curva de energia potencial (Figura 40) tende ao modelo de transição do tipo poço triplo (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006). A reação S<sub>N</sub>2 perfeita seria representada pelo gráfico de transição do tipo poço único. O gráfico da Figura 40 sugere que a oxima *I* efetua seu ataque ao átomo de P do complexo *HssBChE/GB* a uma distância em torno de 5,53 Å. Tal fato pode ser observado pelos pontos de sela do gráfico CEP onde os estados intermediários, principal e posterior de transição, são representados pelas letras: **a**, **b** e **c**.

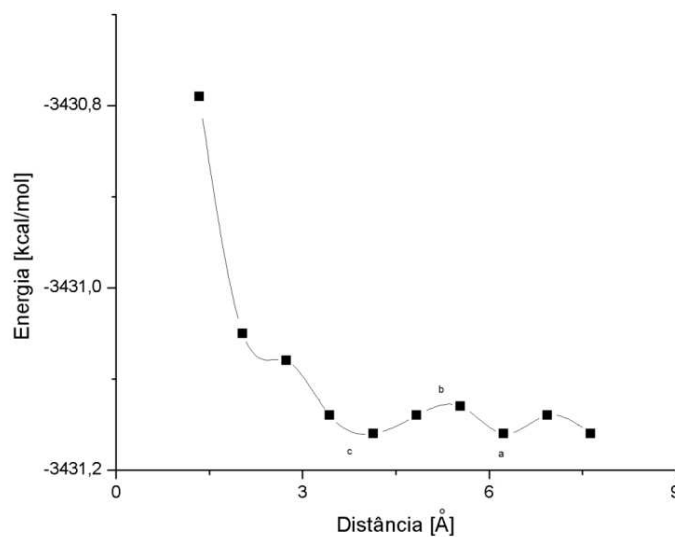


Figura 42 Superfície de energia potencial  $\Delta E$  ao longo da reação entre a oxima *I* e o complexo *HssBChE/GB*

O modelo de poço Duplo é caracterizado na Figura 42 pela presença de um estado intermediário de ET, o RC (a, 6,23 Å), um ET (b, 5,53 Å) e um PC (c, 4,13 Å) gerando um modelo bastante singular. A fim de investigar com mais detalhe os efeitos eletrônicos e estéricos, que governam a formação dos ET, as contribuições das energias eletrônica (EE) e deformacional (ED) para o modelo poço duplo foram calculadas e são apresentadas na Figura 43. Nos estados RC, ET e PC a diferença entre EE e ED ficou em torno de  $-82,33 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

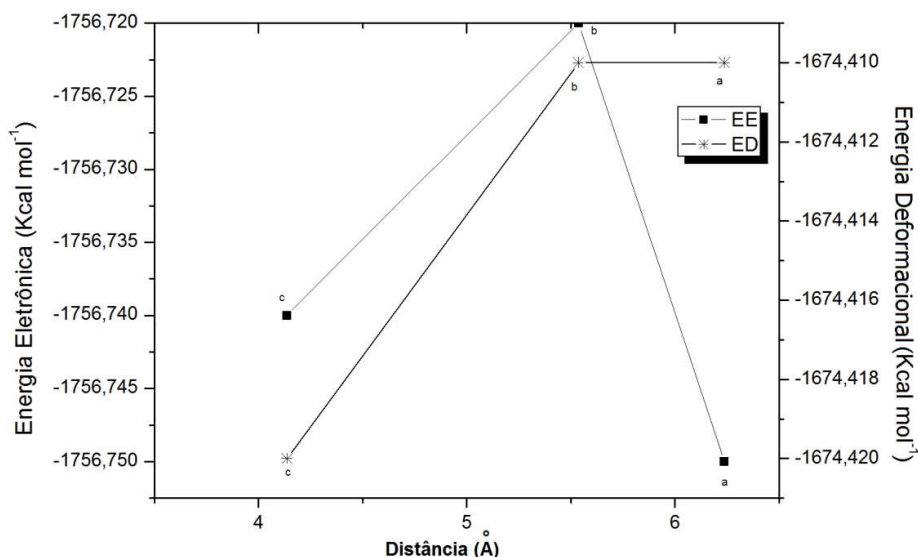


Figura 43 Contribuição das Energias Eletrônica e de Deformação no ET da oxima *I* no interior do complexo *HssBChE/GB*

As informações contidas na Figura 43 sugerem que a oxima *I* é bastante promissora, pois na distância ancorada na enzima, ela já inicia uma interação elétrica com a estrutura inibida que, conseqüentemente, pode levá-la para dentro do sítio ativo da *HssBChE*. Em todos os estados intermediários da reação a contribuição da EE é superior a da ED.

A Figura 44 ilustra o gráfico de CEP (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006) para a reativação, pela oxima *II*, da *HssBChE* inibida por GB. Nesse gráfico, é possível notar que a oxima *II* começa a substituição do átomo de P por um átomo de H a uma distância de 8,60 Å do GB. Da mesma forma que para a oxima *I*, o modelo poço duplo mostrou-se o mais adequado para elucidar os ET dessa oxima na reativação molecular.



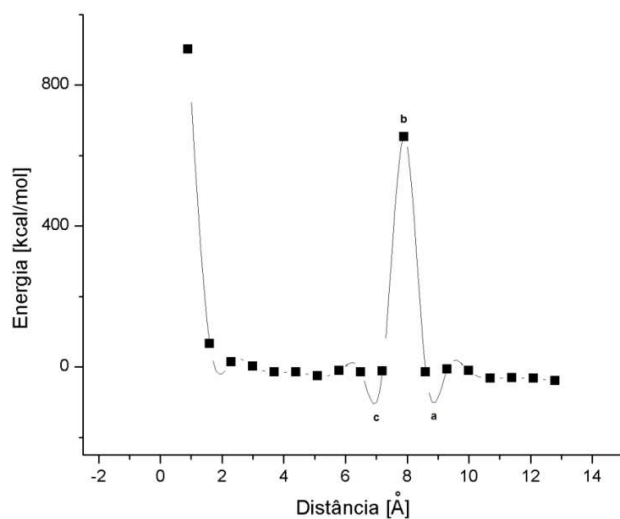


Figura 44 Curva de energia potencial  $\Delta E$  ao longo da reação entre a oxima *II* e complexo *HssBChE/GB*

Para a oxima *II* os ET ocorreram em 9,30 Å (a, RC), 8,60 Å (b, ET) e 7,20 Å (c, PC). A curva gerada pela análise de CEP (VAN BOCHOVE; SWART; BICKELHAUPT, 2006) sugere que a oxima *II* formou um estado de transição estável, propiciando a geometria ideal para formar produtos que no caso são a *HssBChE* reativada e o complexo Oxima-GB. A curva acentuada (b) indica que muitas ligações foram quebradas em reagentes e formadas nos produtos. De forma a melhor compreender o processo de reativação da *HssBChE* inibida por GB, as contribuições eletrônicas e deformacionais nos estados intermediários de reação foram calculadas. A figura 45 demonstra a contribuição eletrônica e estérica para os ET do reativador e a enzima inibida.

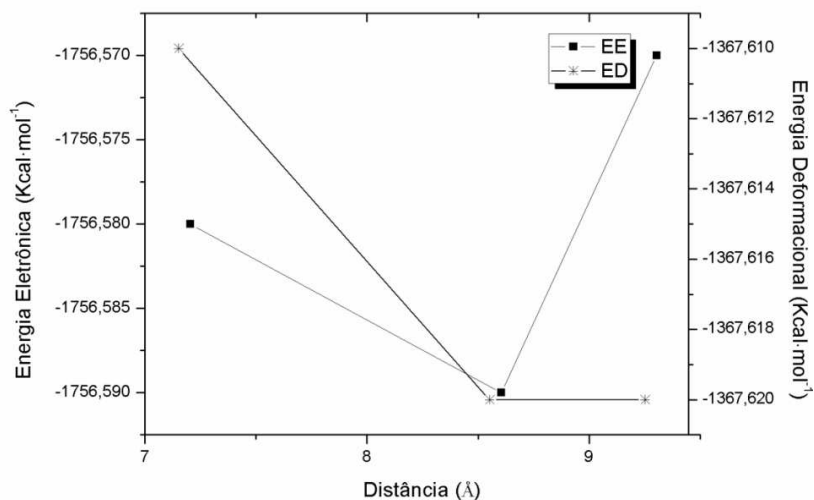


Figura 45 Contribuição das Energias Eletrônica e de Deformação no ET da oxima II no complexo *HssBChE/GB*

Por meio da Figura 45, pode-se notar que a EE é superior à ED em todos os pontos de transição da reativação da enzima inibida por GB. No RC, a ED é máxima ao passo que permanece constante para o estado intermediário seguinte (ET) e diminui a sua contribuição no PC. A EE é mínima no RC, tornando-se máxima no ET, logo diminuindo no estado seguinte PC. Portanto, os achados sugerem que a oxima II se comporta muito bem nos estados preET e ET tornando-se mais eficiente que a oxima I. Fato tal que a oxima II ataca o complexo *HssBChE/GB* a uma maior distância (9,30 Å) quando comparado com a oxima I (5,54Å). A fim de comparar o poder de reativação das duas oximas foi elaborado o gráfico da Figura 46 que apresenta as energias relativas das mesmas em função da distância entre o P do GB (E-OP) e O da oxima (Ox-H).

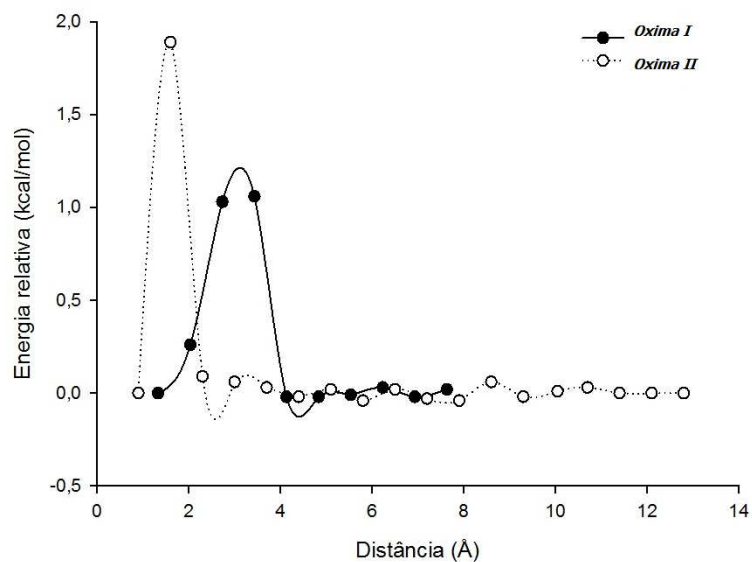


Figura 46 Comparação entre as oximas *I* e *II* na formação do ET com a *HssBChE* inibida por GB

De acordo com o gráfico da Figura 46, a oxima *II* começou a formar os estados preET e ET a uma maior distância quando comparada com a oxima *I*, justificando a maior constante experimental de reativação  $K_{OBS}$  apresentada na Tabela 1. Deste modo, a oxima *II* é mais eficiente, pois consegue atacar o átomo P e formar um ET antes da oxima *I* na *HssBChE* inibida por GB.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma boa concordância entre os dados experimentais e teóricos na *HssBChE* corrobora as metodologias de ancoramento e mecanismo de reação como adequadas para os sistemas em estudo. A metodologia teórica proposta é capaz de prever qualitativamente a afinidade e a reatividade entre as oximas *I* e *II* e a *HssBChE* inibida pelos neurotóxicos GF e GB.

A oxima *II* apresentou nos estudos por ancoramento os menores valores de interação intermolecular, resultado que sugere que essa oxima se estabiliza melhor no sítio ativo da *HssBChE* inibida por GF ou GB. Acredita-se que o substituinte metila e a carga positiva (agente redutor) no anel pirimidínico contribuíram para tais resultados. Interações com os resíduos Gly115, Thr120, Thr128 e Glu197 podem ser as responsáveis pela maior estabilidade nos sistemas *HssBChE*/GF e *HssBChE*/GB em relação a oxima *I*.

Por meio da ACP, foi possível verificar que confôrmeros de menor energia de interação não são, necessariamente, uma boa escolha para os estudos de mecanismo de reação (reatividade), pois a variável energia apresentou, neste estudo, uma baixa significância em relação às demais. As coordenadas *x*, *y* e *z* das oximas *I*, *II* e da Ser198 foram as variáveis mais significativas no estudo quimiométrico. Tal informação corrobora a ideia de que para a oxima ser reativa há a necessidade do posicionamento ideal para que possa haver a reação de reativação.

Pelo novo método de seleção por frequência de ocupação, foi possível selecionar confôrmeros reativos conforme as poses obtidas nos estudos de ancoramento. Todas as estruturas selecionadas por essa abordagem estatística apresentaram estados intermediários que confirmam sua reatividade.

Com base nos cálculos de mecanismo de reação para o GF, foi observado que as oximas *I* e *II* apresentaram o ET do tipo poço triplo, formando

uma curva muito singular, representada por RC, preET, ET, postET e PC. Já, para o GB, as oximas *I* e *II* apresentaram o ET poço duplo, onde a curva é representada por RC, ET e PC.

**REFERÊNCIAS**

- AKFUR, C.; ARTURSSON, E.; EKSTROM, F. **Methylphosphonate adducts of acetylcholinesterase investigated by time correlated single photon counting and X ray crystallography.** [S.l: s.n.], 2013
- ALBUQUERQUE, E. X. et al. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 35, p. 13220-13225, Aug. 2006.
- ALDRIDGE, W. N.; REINER, E. Enzyme inhibitors as substrates. Amsterdam: North-Holland, 1972.
- ANDERBERG, M. R. **Cluster analysis for applications.** New York: Academic Press, 1973.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 17, n. 3, p. 166-173, Mar. 2003.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quimica Nova**, São Paulo, 2006, v. 29, n. 6, p. 1401-1406.
- BERMAN, H. A.; LEONARD, K. Ligand exclusion on acetylcholinesterase. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 47, p. 10641-10649, Aug. 1990.
- BICKELHAUPT, F. M. Understanding reactivity with Kohn-Sham MO theory the E2-SN2 mechanistic spectrum and other concepts. **Journal of Computational Chemistry**, London, v. 20, n. 1, p. 114-128, Jan. 1999.
- BRERETON, R. **Chemometrics for pattern recognition.** Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
- CASTRO, A. T.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Molecular structure, conformational analysis and charge distribution of pralidoxime: Ab initio and DFT studies. **International Journal of Quantum Chemistry** v. 89, n. 3, p. 135-146, 2002.

CASTRO, D. et al. Defesa química : uma nova disciplina no ensino de química. **Uma Nova Disciplina no Ensino de Química**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 84–104, out. 2010.

CASTRO, M. A.; CANUTO, S. O método de Hartree-Fock. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. 2. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap. 1, p. 01-27.

CAZAR, R. A. An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course. **Journal of Chemical Education**, Madison, v. 80, n. 9, p. 1026-1029, 2003.

CERASOLI, D. M. et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, n.157–158, p. 363–365, Dec. 2005.

COCHRAN, R. et al. Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 34, p. 29718–29724, Aug. 2011.

CUNHA, E. F. F. da et al. Molecular modeling of the toxoplasma gondii adenosine kinase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, Cambridge, v. 21, n. 5, May 2012, p. 590-600.

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

DIEFENBACH, A.; JONG, G. T. H. de; BICKELHAUPT, F. M. Fragment-oriented design of catalysts based on the activation strain model. **Molecular Physics**, London, v. 103, n. 6-8, p. 995-998, Apr. 2005.

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

ELECTRONIC VERSION. **Electronic statistics textbook**. Tulsa: StatSoft, 2013.

EYER, P. A. et al. (Ed.). **Chemical warfare agents: toxicology and treatment**. 2<sup>nd</sup> ed. West Sussex: John Wiley, 2007.

FERMI, E. A statistical method for the determination of some atomic properties and the application of this method to the theory of the periodic system of elements. **Zeitschrift für Physik**, Berlin, v. 48, n. 73-79, p. 9, 1928.

FOSTER, M. E.; SOHLBERG, K. Empirically corrected DFT and semi-empirical methods for non-bonding interactions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 307-322, Jan. 2010.

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

GARCIA, V.; DEBREUVE, E.; BARLAUD, M. Fast k nearest neighbor search using GPU. In: COMPUTER VISION AND PATTERN RECOGNITION WORKSHOPS, 8., 2008, Anchorage. **Proceedings...** Anchorage: IEEE, 2008. p. 01-06.

GIACOPPO, J. D. O. S. et al. Chemical warfare: perspectives on reactivating the enzyme acetylcholinesterase inhibited by organophosphates. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 653-670, mar. 2014.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforadotabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

HANSELMAN, D. C.; LITTLEFIELD, B. **Mastering MATLAB 5: a comprehensive tutorial and reference**. New York: Prentice Hall, 1997.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review. B**, New York, v. 136, n. 3, p. 864, Nov. 1964.

HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonalbipyramidal transition state. **Biochemistry**, New York, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Feb. 2007.

HOUGHTON, T. P.; KALIVAS, J. H. Implementation of traditional and real-world cooperative learning techniques in quantitative analysis including near infrared spectroscopy for analysis of live trout. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 77, n. 10, 1314-1318, Oct. 2000.



KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review. A**, New York, v. 140, n. 4, p. 1133, Nov. 1965.

KONTOYANNI, M.; McCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **Journal of Medicinal**, Washington, v.47, n. 3, p. 558-565, Jan. 2004.

LACHENBRUCH, P. A. **Discriminant analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1975.

LARINI, L. **Fármacos e medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **Journal of Medicinal**, Washington, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, Oct. 2006.

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. New York: John Wiley, 1972.

LIMA, K. M. G. et al. Determinação não destrutiva do nitrogênio total em plantas por espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho próximo. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 700-703, 2008.

LUMBINY, B. J.; HUI, Z.; ISLAM, M. A. Influence of substituents on reactivity and reaction mechanism of SN reaction of some organophosphorus compounds; relied on linear free energy relationship. **APCBEE Procedia**, Oxford, v. 9, p. 42-47, 2014.

MAXWELL, J. C. **A treatise on electricity and magnetism**. Oxford: Clarendon Press, 1881.

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

NACHON, F. et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. **The Biochemical Journal**, London, v. 453, n. 3, p. 393-399, Aug. 2013.

NOROSIS, M. J. **SPSS professional statistics 6.1**. New Jersey: Prentice Hall, 1994.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. Comparative molecular docking of antitrypanosomal natural products into multiple trypanosomabrucei drug targets. **Molecules**, Washington, v. 14, n. 4, p. 1513-1536, Apr. 2009.

PATOČKA, J. et al. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. **Journal of Applied Biomedicine**, Hradec Králové, v. 3, p. 91-99, May 2005.

PINTO, E. **Os indígenas do nordeste**: volume 1. São Paulo: Companhia Nacional, 1935.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, Washington, v. 87, n. 5, p. 955-979, May 1987.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of Class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Guilderland, v. 27, n. 2, p. 95-208, Oct. 2009.

RAVESH, L. et al. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 2465–2474, June 1993.

RAVESH, L. et al. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 145, n. 1, p. 43–53, July 1997.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, Nov. 2009.

RUSAK, D. A.; BROWN, L. M.; MARTIN, S. D. Classification of vegetable oils by principal component analysis of FTIR spectra. **Journal of Chemical Education**, Madison, v. 80, n. 5, p. 541-543, 2003.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Office of the Surgeon General, 1997.

SILVA, A. L. B. B. **Introdução a química quântica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

SILVA, G. R. et al. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2012.

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

SIT, R. K. et al. Imidazole aldoximes effective in assisting butyrylcholinesterase catalysis of organophosphate detoxification. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 57, n. 4, p. 1378-1389, Feb. 2014.

SLATER, J. C. A simplification of the hartree-fock method. **Physical Review**, New York, v. 81, n. 3, p. 385-390, 1951.

SMART, J. K. **History of chemical and biological warfare fact sheets. Aberdeen proving ground, Md: US army chemical and biological defense command special study 50**. Saint Clare: [s.n.], 1996.

SOUZA, T. C. S. et al. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit and its molecular docking study with inhibitors. **Molecular Simulation**, New York, v. 34, n. 7, p.707-713, June 2008.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 10, n. 2, p. 209-220, Mar. 1989.

SVANTE, W.; MICHEL, S. SIMCA: a method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy. In: KOWALSKI, B. R. (Ed.). **Chemometrics: theory and application: a symposium**. Oxford: Amer Chemical Society, 1977. Chap. 12, p. 243-282.

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

URBAN, G. **A história da cultura brasileira segundo as línguas nativas: história dos índios no Brasil**. São Paulo: Companhia das Letras, 1992.

VAN BOCHOVE, M. A.; SWART, M.; BICKELHAUPT, F. M. Nucleophilic substitution at phosphorus ( $S_N2@P$ ): disappearance and reappearance of reaction barriers. **Journal of the American Chemical Society**, Amsterdam, v.128, n. 33, p. 10738-10744, Aug. 2006.

VAN STRALEN, J. N. P.; BICKELHAUPT, F. M. Oxidative addition versus dehydrogenation of methane, silane and heavier AH<sub>4</sub> congeners reacting with palladium. **Organometallics**, Washington, v. 25, n. 18, 4260-4268, July 2006.

VAN ZEIST, W. J.; BICKELHAUPT, F. M. The activation strain model of chemical reactivity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 8, 3118-3127, May 2010.

WADE, L. G. **Organic chemistry**. 5<sup>th</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003.

WANG, L. Q.; MIZAIKOFF, B.; KRANZ, C. Quantification of sugar mixtures with near-infrared raman spectroscopy and multivariate data analysis. A quantitative analysis laboratory experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 86, n. 11, 1322-1325, Nov. 2009.

WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medical Chemistry**, Washington, v. 49, n. 20, p. 5912-5931, Oct. 2006.

WHEELIS, M. Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 971-975, Sept. 2002.

WILKINSON, L. **SYSTAT for windows: statistics, graphics, data, getting started**, version 5. New York: Systat, 1992.

WOLFE, A. D. et al. Use of cholinesterase as pretreatment drugs for the protection of rhesus monkeys against soman toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 117, n. 2, p. 189-193, Dec. 1992.

WOREK, F. et al. Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 73, n. 11, p. 1807-1817, 2007.

WU, G. et al. Oxidative dehydrogenation of propane with nitrous oxide over Fe-O-Al species occluded in ZSM-5: reaction and deactivation mechanisms. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 198, p. 82-91, Nov. 2014.

YANG, M.; SENET, P.; VAN ALSENOY, C. DFT study of polarizabilities and dipole moments of water clusters. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, v. 101, n. 5, p. 535-542, Feb. 2005.

YANG, P. Y. et al. Carbofuran-induced delayed neuropathy. **Journal of Toxicology, Clinical Toxicology**, New York, v. 38, n. 1, p. 43-46, Jan. 2000.