



**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO OXIDATIVA DE  
PESTICIDAS ORGANOFOSFOTIOATOS E INIBIÇÃO DA  
ACETILCOLINESTERASE: CÁLCULOS DE INTERAÇÃO E  
MECANISMO DE REAÇÃO**

**LAVRAS – MG  
2023**

**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO OXIDATIVA DE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFOTIOATOS E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE:  
CÁLCULOS DE INTERAÇÃO E MECANISMO DE REAÇÃO**

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

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Daiana Teixeira Mancini  
Coorientador(a)

**LAVRAS-MG  
2023**

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

Militani, Isabela Aparecida.

Processos de biotransformação oxidativa de pesticidas organofosforados e inibição da acetilcolinesterase: cálculos de interação e mecanismo de reação / Isabela Aparecida Militani. - 2023.

62 p. : il.

Orientador(a): Teodorico de Castro Ramalho.

Coorientador(a): Daiana Teixeira Mancini.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Pesticidas. 2. Biotransformação oxidativa. 3. Inibição da HssAChE. I. Ramalho, Teodorico de Castro. II. Mancini, Daiana Teixeira.

**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO OXIDATIVA DE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFOTIOATOS E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE:  
CÁLCULOS DE INTERAÇÃO E MECANISMO DE REAÇÃO**

**OXIDATIVE BIOTRANSFORMATION PROCESSES OF  
ORGANOPHOSPHOTIOATE PESTICIDES AND INHIBITION OF  
ACETYLCHOLINESTERASE: INTERACTION CALCULATIONS AND REACTION  
MECHANISM**

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

APROVADA em 17 de janeiro de 2023.  
Dr<sup>(a)</sup>. Letícia Cristina de Assis, UFLA  
Dr. Mateus Aquino Gonçalves, UFLA

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador



Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Daiana Teixeira Mancini  
Coorientador(a)

**LAVRAS-MG  
2023**

A Deus, meu filho Miguel, meu namorado Jander e  
aos meus pais Francisco e Rozangela, sem eles  
essa conquista não poderia ser realizada.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, amor, saúde física e mental, proteção, força, coragem, oportunidades, por me abençoar muito mais do que eu mereço e por me amparar nas horas que eu mais precisei.

À intercessão de todos os santos e santas e em especial a São José.

Ao meu filho Miguel, que é a minha maior força e motivação para não desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado Jander pelo apoio, paciência, amor, companheirismo e pelo incentivo a continuar os meus estudos.

Aos meus pais Francisco e Rozangela, que mesmo diante das dificuldades segurou em minhas mãos nas horas que eu mais precisei.

Ao meu avô Israel (in memoriam), que foi minha inspiração para que eu nunca desistisse de sonhar e por estar no céu olhando por mim, pois alguém como você nunca vai embora totalmente.

À minha família pelo apoio e pelos momentos de felicidade proporcionados ao longo dessa caminhada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela formação de excelência.

Ao Departamento de Química (professores, funcionários e colegas de curso) por todo apoio, ensinamento e acolhimento.

Ao professor orientador Dr. Teodorico de Castro Ramalho pela orientação para o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, incentivo, ensinamentos e disponibilidade.

Ao Laboratório de Modelagem Molecular pela oportunidade de realização deste trabalho.

À coorientadora Dr<sup>(a)</sup>. Daiana Teixeira Mancini pela atenção, dedicação e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora por toda contribuição e disponibilidade.

Ao programa de pós-graduação em Agroquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio e financiamento da bolsa para o desenvolvimento do presente trabalho.

À todos que contribuíram para a realização de mais um sonho.

Muito obrigada!

## RESUMO

Os agroquímicos possuem propriedades letais, capazes de controlar ou eliminar um organismo vivo, ou seja, bloqueiam os processos metabólicos vitais do organismo. Causam sérios problemas à saúde humana, pois são altamente tóxicos. Os pesticidas mais utilizados e considerados tóxicos são conhecidos como organofosfotioatos (OF/P=S) em sua forma comercializada e organofosforados (OF/P=O) em sua forma ativa. Esses compostos têm sido motivo de estudos sobre seu metabolismo e toxicologia. Segundo pesquisas realizadas, a toxicidade desses pesticidas é aumentada quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativa, onde os OF/P=S são transformados em OF/P=O. Essa toxicidade se deve à capacidade dos OF/P=O de inibir a enzima acetilcolinesterase humana (*HssAChE*). Baseado nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a biotransformação oxidativa dos pesticidas OF/P=S e a inibição da enzima *HssAChE* pelos OF/P=S e OF/P=O utilizando a técnica de *docking* molecular e cálculos de QM/MM. Os resultados teóricos obtidos mostraram que no processo de biotransformação oxidativa, o paration é o composto com maior capacidade de transformar de OF/P=S para OF/P=O, formando assim o metabólito ativo paraoxon. Na inibição da enzima *HssAChE* pelos OF/P=S e OF/P=O, os resultados mostraram que de todos os compostos investigados, aqueles com maior atividade inibitória são o paration, paraoxon, malation, diazoxon, clorpirifós e ometoato. Este estudo foi essencial devido à falta de informações na literatura sobre o processo de biotransformação oxidativa de pesticidas OF/P=S, bem como a capacidade desses compostos de inibir a enzima *HssAChE*. Com este estudo foi possível observar que, na biotransformação oxidativa, o clorpirifós e o paration possuem maiores capacidades de se transformar em seus metabólitos ativos e na inibição da enzima *HssAChE*, foi possível observar que nem todos os OF/P=O são os que têm maiores capacidades de inibir a enzima *HssAChE*.

**Palavras-chave:** Química computacional. Pesticidas. Biotransformação oxidativa. Inibição da *HssAChE*. *Docking* molecular. QM/MM.

## ABSTRACT

Agrochemicals have lethal properties capable of controlling or eliminating a living organism, that is, they block the organisms' vital metabolic processes. They cause serious problems for human health, as they are highly toxic. The most used pesticides that are considered toxic are known as organophosphothioates (OP/P=S) in their commercialized form and organophosphates (OP/P=O) in their active form. These compounds have been the subject of studies on their metabolism and toxicology. According to research carried out, the toxicity of these pesticides is increased when oxidative metabolic desulfurization reactions occur, where the OP/P=S are transformed into OP/P=O. This toxicity is due to the ability of OP/P=O species to inhibit the human acetylcholinesterase enzyme (HssAChE). Based on this context, the objective of this work was to study the oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides and the inhibition of the HssAChE enzyme by OP/P=S and OP/P=O using the molecular docking technique and QM/MM calculations. The theoretical results obtained showed that in the oxidative biotransformation process, parathion is the compound with the greatest ability to transform OP/P=S into OP/P=O, thus forming the active paraoxon metabolite. In the HssAChE enzyme inhibition by OP/P=S and OP/P=O, our results showed that of all the compounds investigated, those with the highest inhibitory activities are parathion, paraoxon, malathion, diazoxon, chlorpyrifos and omethoate. This study was essential due to the lack of information in the literature about the oxidative biotransformation process of OP/P=S pesticides, as well as the ability of these compounds to inhibit HssAChE enzyme. With this study, it was possible to observe that, in the oxidative biotransformation, chlorpyrifos and parathion have greater capacities to transform into their active metabolites and in the inhibition of the HssAChE enzyme, it was possible to observe that not all OP/P=O are the ones with the highest abilities to inhibit the HssAChE enzyme.

**Keywords:** Computational chemistry. Pesticides. Oxidative biotransformation. HssAChE inhibition. Molecular docking. QM/MM.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Estruturas dos OF/P=S: Clorpirifós, Diazinon, Dimetoato, Malation e Paration. ...	18
Figura 2 - Estruturas dos OF/P=O: Clorpirifós oxon, Diazoxon, Ometoato, Malaixon, Paraoxon. ....	19
Figura 3 - Estrutura geral dos OF/P=S e dos OF/P=O. ....	22
Figura 4 - Transmissão neuronal da ACh pela AChE. ....	24
Figura 5 - Hidrólise da ACh pela AChE. ....	24
Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da ACh no sítio ativo da <i>HssAChE</i> . ....	24

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO

Fig. (1). OP/P=S structures: Chlorpyrifos, Diazinon, Dimethoate, Malathion and Parathion. 38	
Fig. (2). OP/P=O structures: Chlorpyrifos oxon, Diazoxon, Omethoate, Malaixon, Paraoxon. ....	39
Fig. (3). Activation of the cytochrome P450 active site in the presence of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and electrons. ....	40
Fig. (4). Oxidative biotransformation reaction of OP/P=S pesticides. ....	41
Fig. (5). HssAChE enzyme inhibition reaction. ....	42
Fig. (6). Re-docking of the warfarin inhibitor within cytochrome P450. Crystal structure is shown in yellow and re-docking conformation in red. For better visualization, the protein was omitted. ....	45
Fig. (7). Hydrogen bonds (blue dashed) between the active ligand and the active site residues. ....	46
Fig. (8). Re-docking of the donepezil inhibitor within the HssAChE active site. Crystal structure is shown in yellow and re-docking conformation in red. For better visualization, the protein was omitted. ....	49
Fig. (9). Hydrogen bond (blue dashed) between the active ligand and the active site residue. ....	50
Fig. (10). General structure of OP/P=O compounds. ....	56

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO

Table 1. Intermolecular interaction energy values ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) and hydrogen bond ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) between the human cytochrome P450 and the OP/P=S compounds obtained from molecular docking. ....	46
Table 2. Values of the relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for the OP/P=S in the active site of the human cytochrome P450 enzyme. ....	48
Table 3. Intermolecular interaction energy values ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) and hydrogen bond ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) between the HssAChE enzyme and the OP/P=S compounds obtained from molecular docking. ....	51
Table 4. Values of the intermolecular interaction energy ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) and hydrogen bond ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) between the HssAChE enzyme and the OP/P=O compounds obtained from molecular docking. ....	52
Table 5. Experimental LD50 values for the HssAChE enzyme. ....	54
Table 6. Values of the intermolecular interaction energy ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) between the HssAChE enzyme and the OP/P=S and OP/P=O compounds obtained from molecular docking. ....	55
Table 7. Values of the relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for OP/P=S and OP/P=O in the active site of the HssAChE enzyme. ....	55

## LISTA DE SIGLAS

### PRIMEIRA PARTE

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ch	Colina
DFT	Density Functional Theory
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GA	Tabun
GB	Sarin
<i>Hss</i> AChE	Acetilcolinesterase Humana
MM	Molecular Mechanics
OF/P=O	Organofosforado
OF/P=S	Organofosfotioato
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
QM	Quantum Mechanics
S <sub>N</sub> 2	Substituição nucleofílica bimolecular

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO

Ach	Acetylcholine
Ch	Choline
DFT	Density Functional Theory
<i>Hss</i> AChE	Human acetylcholinesterase
MM	Molecular Mechanics
OP/P=O	Organophosphate
OP/P=S	Organophosphothioate
QM	Quantum Mechanics
RMSD	Root Mean Square Deviation
S <sub>N</sub> 2	Bimolecular nucleophilic substitution

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	13
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2. 1	Contaminação dos ecossistemas .....	15
2. 2	Pesticidas .....	16
2. 3	Organofosfotioatos e organofosforados.....	18
2. 4	Enzima citocromo P450 humano.....	22
2. 5	Enzima <i>HssAChE</i> .....	23
2. 6	Métodos computacionais .....	25
2. 6. 1	Ancoramento molecular.....	26
2. 6. 2	Cálculos de QM/MM.....	27
3	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGO</b> .....	36

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Os agroquímicos são produtos químicos sintéticos usados na agricultura no controle de pragas e são altamente tóxicos para os organismos vivos (NASCIMENTO; MELNYK, 2016). Os pesticidas mais utilizados são os organofosforados (OF/com ligações P=S) em sua forma comercializada e os organofosforados (OF/com ligações P=O) em sua forma ativa (BELLO-RAMIREZ; CARREON-GARABITO; NAVA-OCAMPO, 2000). Quando os pesticidas são absorvidos pelo organismo humano, eles podem atuar como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase humana (*HssAChE*), causando hiperestimulação dos receptores da acetilcolina (ACh), impedindo a contração muscular normal (DIKSHIT, 2007). A toxicidade desses pesticidas ocorre devido à sua capacidade de se ligar à enzima *HssAChE*, por meio do aminoácido serina (Ser203) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). A inibição da enzima *HssAChE* leva a um aumento descontrolado na taxa do neurotransmissor ACh, causando problemas de sinapse (ECOBICHON, 2001; TAYLOR, 2001).

De acordo com estudos anteriores, a toxicidade desses pesticidas é aumentada quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativa, onde os OF/P=S são transformados em OF/P=O (COCKER *et al.*, 2002; COSTA, 2006). A ligação P=O em relação à ligação P=S, permite maior transferência de elétrons do fósforo para o oxigênio devido à diferença de eletronegatividade, resultando em interações mais fortes dos OF/P=O com o centro esterásico da enzima *HssAChE*. Os compostos OF/P=S precisam passar por uma bioativação metabólica, ou seja, uma dessulfuração oxidativa através da enzima citocromo P450 humano, resultando na formação de um “oxon”, para que sua atividade biológica (inibição da enzima *HssAChE*) seja realizada (BURATTI; TESTAI, 2007). Apesar da grande importância, há poucos trabalhos computacionais detalhados sobre a biotransformação oxidativa dos pesticidas OF/P=S.

A enzima citocromo P450 humano é encontrada na bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. O fígado é o principal local de biotransformação farmacológica no organismo humano, devido à presença dos principais citocromos processadores de xenobióticos, que são substâncias químicas estranhas ao organismo humano. A enzima citocromo P450 humano tem a função de promover a monooxigenação de diferentes compostos químicos (BIBI, 2008; GUENGERICH, 1992; LEMOS; TRINDADE, 2014; SANTIAGO, 2003).

Para estudar a reação de biotransformação oxidativa, é necessário ativar o sítio de ligação da enzima citocromo P450 humano. Esta ativação ocorre na presença de  $H_2O_2$  ou elétrons (BELLO-RAMIREZ; CARREON-GARABITO; NAVA-OCAMPO, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 1998). Após a ativação da enzima citocromo P450 humano, o sítio ativado ataca o fósforo do OF/P=S realizando a biotransformação oxidativa, onde os OF/P=S são transformados em OF/P=O.

De acordo com a literatura, os pesticidas OF/P=O são inibidores mais efetivos da enzima *HssAChE*. Essa enzima regula a neurotransmissão de impulsos nervosos nas sinapses por meio da hidrólise da ACh. A inibição da enzima *HssAChE* pode levar a sérios problemas de saúde decorrentes da síndrome colinérgica, levando até mesmo à morte. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; GIACOPPO *et al.*, 2014; PATOCKA *et al.*, 2005). Segundo o banco de dados da PubChem, os OF/P=S também são capazes de inibir a enzima *HssAChE* (PUBCHEM, 2022).

A enzima *HssAChE* é encontrada nos sistemas nervoso central e periférico, sendo considerada uma das hidrolases mais eficientes (GIACOPPO *et al.*, 2014; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ, 1990). Cada monômero da enzima *HssAChE* possui um centro catalítico que é composto pelo subsítio catalítico, tríade catalítica e subsítio aniônico, que acomoda o nitrogênio carregado positivamente da ACh (GIACOPPO *et al.*, 2014; PATOCKA *et al.*, 2005). O sítio ativo da enzima *HssAChE* é encontrado em uma garganta e é dividido em duas regiões diferentes e importantes. A primeira região é o sítio esterásico, onde está localizada a tríade catalítica. Além disso, a segunda região é o sítio aniônico, onde ocorre a ligação da ACh pela parte colina (Ch). A tríade catalítica humana é composta pelos resíduos de serina, histidina e glutamato (Ser203, Glu334 e His447), encontrados no fundo da garganta do sítio ativo (DVIR, 2010; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Para entender a inibição da enzima *HssAChE* pelos OF/P=S e OF/P=O, é necessário avaliar a reação  $S_N2$  (substituição nucleofílica bimolecular). Essa reação de inibição ocorre quando o oxigênio do aminoácido Ser203 (nucleófilo) ataca o fósforo do OF/P=O (DOS SANTOS; DONNICI, 2007).

Este estudo é muito importante devido à falta na literatura de trabalhos produzidos a nível molecular sobre a biotransformação oxidativa dos pesticidas OF/P=S pela enzima citocromo P450 humano, bem como a inibição da enzima *HssAChE* pelos pesticidas OF/P=S. Um estudo detalhado das interações e das reações é necessário para avaliar o grau de toxicidade dos OF/P=S e dos OF/P=O, para que futuramente possa desenvolver novos compostos com um

grau de toxicidade menor e também servir como alerta dos malefícios que esses compostos podem causar.

O objetivo deste trabalho foi utilizar técnicas de química computacional, como *docking* molecular, para obter informações importantes sobre os modos de interação dos compostos OF/P=S (clorpirifós, diazinon, dimetoato, malation e paration) no sítio ativo da enzima citocromo P450 humano e a interação dos compostos OF/P=S (clorpirifós, diazinon, dimetoato, malation e paration) e dos OF/P=O (clorpirifós oxon, diazoxon, ometoato, malaixon e paraoxon) no sítio ativo da enzima *HssAChE*. Também, através da abordagem de cálculo QM/MM avaliar o mecanismo de reação para a biotransformação oxidativa dos pesticidas OF/P=S pela enzima citocromo P450 humano, e para a inibição da enzima *HssAChE* pelos OF/P=S e pelos OF/P=O.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Contaminação dos ecossistemas

Os pesticidas são considerados um dos maiores poluentes do meio ambiente, pois são utilizados de forma intensiva na agricultura. Os resíduos desses produtos químicos podem estar presentes nos alimentos, na atmosfera, nas precipitações secas e úmidas e nas águas superficiais e subterrâneas (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2008; VIANNA, 2015).

Cada dia mais, os corpos d'água vem perdendo sua qualidade devido ao grande aumento da poluição por efluentes agrícolas. Na produção de alimentos, estão sendo utilizados desconhecidas misturas de classes de poluentes, onde os mesmos causam graves impactos no meio hídrico. Os pesticidas são um dos grupos de poluentes que mais representam a contaminação ambiental, isso ocorre, devido ao seu grande uso na agricultura mundial, principalmente em países em desenvolvimento (SALVO; SANTIAGO; DE ASSIS, 2018; SANCHES *et al.*, 2003).

O manejo inadequado do solo e a retirada da mata ciliar causa o transporte dos pesticidas do solo para a água, devido ao escoamento superficial promovido pela chuva ou irrigação da cultura. (LARSON; CAPEL; MAJEWSKI, 2002; LOURENÇATO, 2010). A água doce vem sendo ameaçada por extinção de sua qualidade e biodiversidade, devido a contaminação por

pesticidas. Os pesticidas podem causar grandes efeitos na água doce, impedindo importantes funções das espécies e afetando o funcionamento do ecossistema (SCHÄFER *et al.*, 2012).

Técnicas agrícolas podem ser utilizadas a fim de diminuir a contaminação dos solos e rios, como terraceamento que é implantada em áreas vertentes muito inclinadas para barrar o avanço de processos erosivos pelo escoamento acelerado das águas das chuvas sobre o solo; curvas de nível que ajudam a verificar a altitude de um terreno e representar todo tipo de irregularidade em sua superfície; plantio direto que coloca a semente no solo não revolvido usando semeadeiras especiais que diminui o impacto da agricultura e das máquinas agrícolas sobre o mesmo; rotação de culturas que diminui a exaustão do solo trocando as culturas a cada novo plantio de modo que as necessidades de adubação sejam diferentes a cada ciclo; entre outras. O manejo do solo e culturas e o gerenciamento dos recursos hídricos são alternativas capazes de controlar a contaminação por pesticidas, porém, um estudo sobre os pesticidas é de suma relevância para garantir uma maior proteção ao ecossistema e a população (BERTOLUZZI *et al.*, 2006; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; SILVA *et al.*, 2011).

## 2. 2 Pesticidas

Os pesticidas são bastante utilizados na agricultura e tem a função de impedir, incapacitar ou matar as pragas. Quando os pesticidas são utilizados de forma inadequada, eles contaminam os alimentos e poluem o meio ambiente, como o solo, as águas subterrâneas e os cursos de águas naturais. Quando a água e os alimentos contaminados por pesticidas são consumidos tanto pelo ser humano, quanto por outras espécies, os mesmos são intoxicados (MLADENOVIC *et al.*, 2018).

Os pesticidas podem ser classificados como bactericidas, fungicidas, inseticidas, herbicidas, reguladores de crescimento de insetos, nematocidas, moluscicidas, piscicidas, avicidas, rodenticidas, entre outros repelentes. Os pesticidas mais utilizados são os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas de uso agrícola (BUMBACILA; PUTZ, 2020).

A atmosfera pode ser contaminada pelos pesticidas durante sua aplicação feita por avião ou pulverização terrestre. A quantidade de pesticida que vai para a atmosfera varia de 30 a 50% devido à processo de deriva de pulverização, que é quando a trajetória da gota é desviada no processo de aplicação do pesticida, não atingindo o alvo desejado (DA CUNHA, 2008; YERA *et al.*, 2020).



A contaminação por pesticidas ocorre por diferentes vias, como dérmica, oral e por inalação. Quando o ser humano é contaminado por pesticidas, especialmente as lactentes e as crianças, os mesmos apresentam efeitos crônicos como perda de coordenação e memória relacionadas às doenças de Parkinson e Alzheimer. Portanto, é necessário avaliar o risco dos pesticidas a exposição diária à inalação e quocientes de risco em todas as populações (DE MEDEIROS; ACAYABA; MONTAGNER, 2021; VASCONCELLOS *et al.*, 2020; YERA *et al.*, 2020).

Para identificar a eficácia dos pesticidas, é necessário compreender suas características físicas e químicas. Uma das características químicas de interesse são a solubilidade em água e a volatilidade, ou seja, quanto mais solúvel for um pesticida, maior o seu potencial de escoamento e lixiviação e, portanto, sua ineficácia. Os pesticidas que são solúveis em água têm maior potencial de propagação, através do solo e do fluxo de água contaminando rios e lagos próximos, principalmente após o aumento das precipitações (BUMBACILA; PUTZ, 2020; CABRERA; PINHO; PRIMEL, 2008).

Os pesticidas são capazes de envenenar os seres humanos, isso ocorre, quando os compostos dos pesticidas afetam os órgãos ou a funcionalidade dos sistemas dentro do corpo. Os efeitos nocivos por envenenamento pelos pesticidas podem ser de leves a graves, dependendo do tipo de pesticida, da quantidade do composto e do tempo de exposição (BUMBACILA; PUTZ, 2020).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), 26 países em desenvolvimento subsidiavam o uso de agroquímicos, servindo o Estado como uma espécie de “adubo” para o crescimento do uso destes produtos (CUNHA; SOARES, 2020).

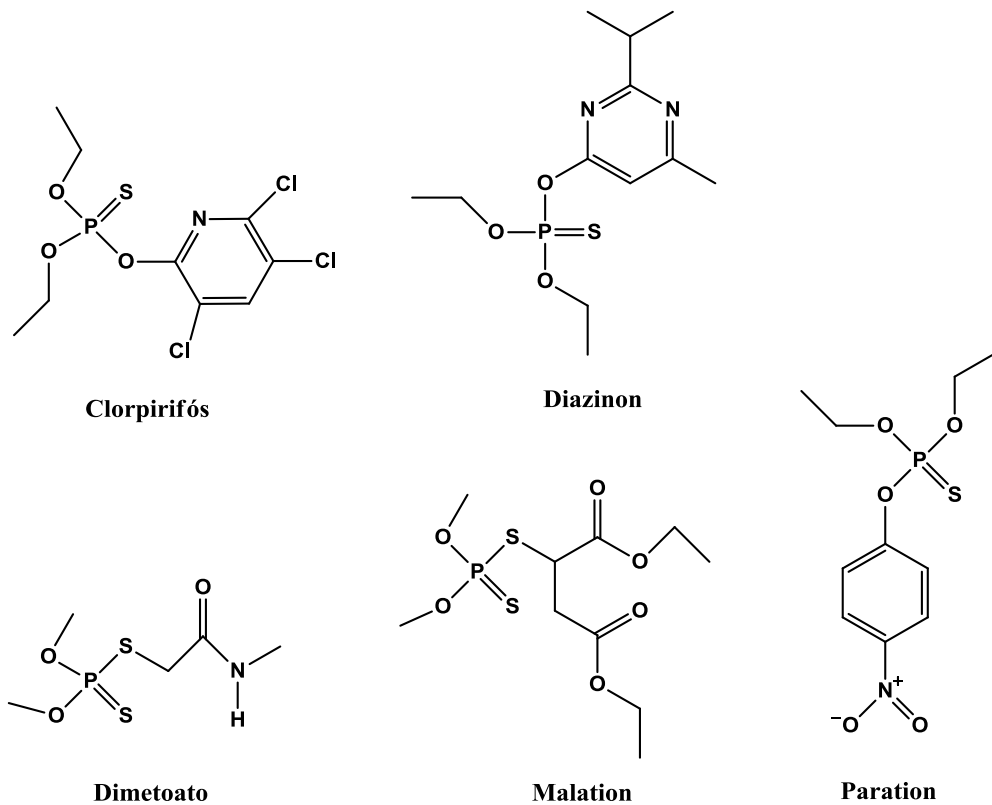
Desde 2008, o Brasil é considerado como um dos maiores consumidores mundiais de agroquímicos. De acordo com a Agência Pública e Repórter Brasil, no período de 2019 à março de 2022, 14.549 mil pessoas foram intoxicadas por agroquímicos no Brasil, sendo que 439 mil pessoas morreram intoxicadas por esses pesticidas. Nesse período, houve um recorde de aprovações de pesticidas, cerca de 1800 novos pesticidas foram registrados e também houve um avanço na tramitação do Projeto de Lei 1459/2022, que recebeu o nome de “Pacote do Veneno”, que modifica as regras de aprovação e comercialização, prejudicando a saúde humana e animal. As principais vítimas intoxicadas pelos pesticidas foram os homens negros. As circunstâncias que levaram as intoxicações foram as tentativas de suicídio, onde 5 mil pessoas tentaram suicidar ingerindo os pesticidas, acidentes, uso habitual dos pesticidas e as contaminações ambientais. As plantações onde ocorreram mais intoxicações foram as lavouras de soja, fumo e milho. E as região onde ocorreu mais intoxicações foi a região sul, sendo que

4.2 mil pessoas foram intoxicadas no estado de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FONSECA; ROHDEN, 2022; SALVO; SANTIAGO; DE ASSIS, 2018).

### 2.3 Organofosfotioatos e organofosforados

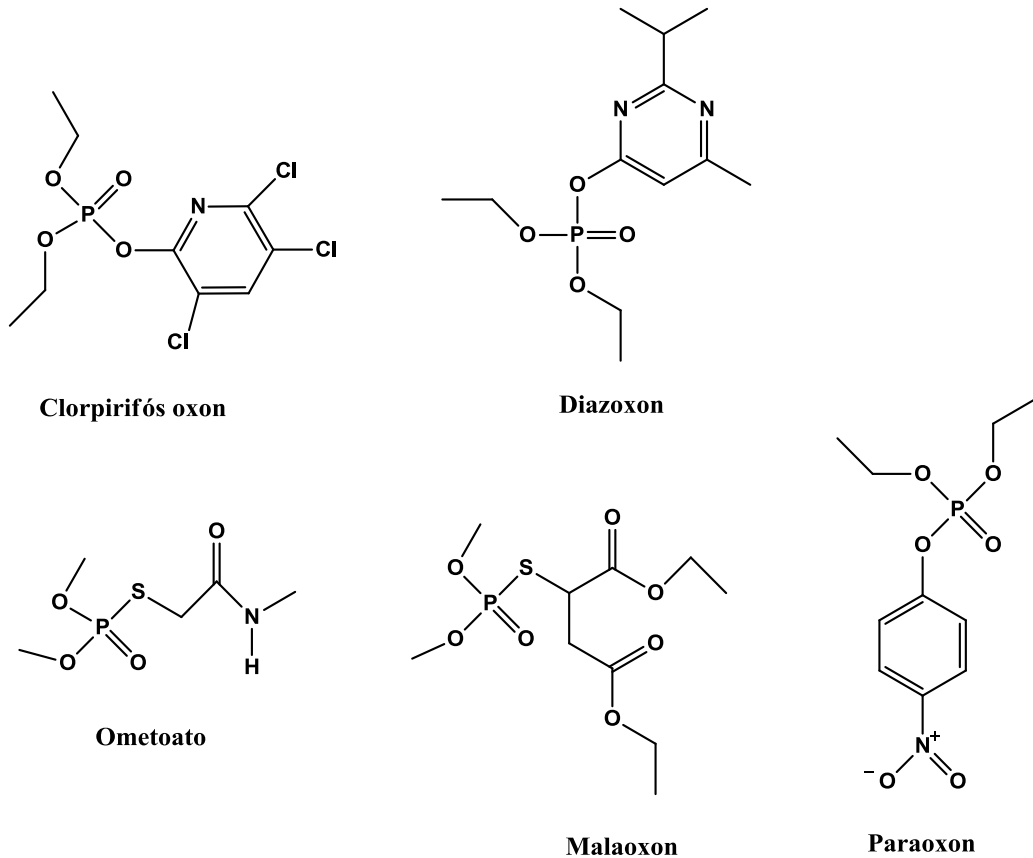
Como já mencionado, os organofosfotioatos (OF/P=S) (FIGURA 1) são a forma comercializada dos pesticidas e os organofosforados (OF/P=O) (FIGURA 2) são a forma ativa dos pesticidas, os quais serão objeto de estudos do seu metabolismo e toxicologia. Como a forma ativa é utilizada para fins de estudo, nesse trabalho, de forma geral, será mencionado os OF/P=O.

Figura 1 - Estruturas dos OF/P=S: Clorpirifós, Diazinon, Dimetoato, Malation e Paration.



Fonte: Adaptado de PubChem (2022).

Figura 2 - Estruturas dos OF/P=O: Clorpirifós oxon, Diazoxon, Ometoato, Malaixon e Paraoxon.



Fonte: Adaptado de PubChem (2022).

Os OF/P=O são utilizados na agricultura e na indústria como pesticidas, plastificantes, componentes de medicamentos, materiais poliméricos e como armas químicas. Devido ao grande uso desses produtos, muitas pessoas são intoxicadas por eles, pois o principal mecanismo dos OF/P=O é a inibição da enzima acetilcolinesterase humana (*HssAChE*) (BELINSKAIA *et al.*, 2019; LIMA, 2008; VINHAL; SOARES, 2018).

O envenenamento pelos OF/P=O podem causar consequências fisiológicas nos sistemas nervosos central e periférico, e com isso, podendo ocorrer diferentes sintomas. Dentre os sintomas estão a broncorrêia, que é a produção de mais de 100 ml por dia de escarro aquoso; broncoconstrição ou broncoespasmo, que consiste na contração da musculatura dos brônquios dificultando a passagem do ar pelas vias aéreas; bradicardia, que é o ritmo cardíaco irregular ou lento; êmese ou vômito, que consiste na expulsão peroral forçada do conteúdo gástrico; contração do músculo esquelético; taquicardia; convulsões; parada respiratória; entre outros, podendo levar a óbito (DE PAULA *et al.*, 2018).

Segundo pesquisas realizadas sobre a intoxicação pelos OF/P=O, os trabalhadores agrícolas da América Latina, Europa e EUA que vivem em áreas agrícolas e que estão expostos a estes pesticidas, apresentaram depressão e sintomas depressivos (SUAREZ-LOPEZ *et al.*, 2019).

O tratamento para pessoas intoxicadas pelos OF/P=O podem ser por meio da terapia antidotal, sintomática e preventiva existente, onde o mesmo é capaz de aumentar a desintoxicação dos OF/P=O no primeiro estágio de entrada do veneno na corrente sanguínea, reduzindo o efeito tóxico na enzima *HssAChE* de sinapses neuromusculares e neuronais (BELINSKAIA *et al.*, 2019). O tratamento por envenenamento pelos OF/P=O podem também ser com o uso de medicamentos baseado na administração de um agente anticolinérgico, um medicamento anticonvulsivante e um reativador da enzima *HssAChE* mono ou bispiridínio (DE PAULA *et al.*, 2018).

Hoje em dia, o uso de armas químicas é uma das maiores ameaças do mundo, pois esses agentes são substâncias com alta toxicidade e capacidade de promover destruição em massa, podendo matar ou causar vários danos às suas vítimas, bem como produzir efeitos ambientais negativos. Os OF/P=O são utilizados como armas químicas com o intuito de assassinar pessoas em todo o mundo devido ao seu custo mais baixo em comparação com outras diferentes armas (FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2021).

Em 1854, foi sintetizado o primeiro OF/P=O, conhecido como TEPP (tetraetilpirofosfato). A fórmula geral dos OF/P=O foi desenvolvida no ano de 1937, e nesse mesmo ano foi sintetizado o sarin (GB), tabun (GA) e outros agentes neurotóxicos (CHAUHAN *et al.*, 2008). Esses agentes são conhecidos como agentes da série G, onde essa letra provém de Germany (Alemanha), onde foi neste país que desenvolveram estes agentes. E a segunda letra após o G, corresponde à sequência na qual estes compostos surgiram (TUCKER, 2006).

Em 1950, após a síntese de O-etil S- [2- (diisopropil amina) etil] metil fosforotioato (batizado como VX), na Inglaterra, realizada por Ranajit e Newman que estavam em busca de um novo pesticida, foi descoberta uma família mais tóxica de OF/P=O, conhecida como a série V (de venenosos). Essa série, passou a ser considerada como a mais tóxica e ambientalmente persistente quando comparado com a série G, e por isso, se tornou a arma química mais tóxica conhecida até a década de 1970, ou seja, até quando os neurotóxicos da série A foram sintetizados pela primeira vez por cientistas russos no programa foliant e, em seguida, foram usados no desenvolvimento das armas químicas russa conhecida como novichok, segundo o cientista dissidente russo Vil Mirzayanov (FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2021; TORRES; COLASSO, 2018).

Mesmo os OF/P=O terem sido sintetizados pela primeira vez antes da Segunda Guerra Mundial, eles não foram usados até a década de 1980. Após isso, Saddam Hussein lançou GA e GB contra o exército iraniano e também contra os rebeldes curdos, durante a guerra Irã-Iraque, ocasionando muitas mortes de militares e civis, incluindo muitas crianças. Devido a isso, em 1993, a maioria dos países do mundo aceitou e assinou a Convenção sobre as Armas Químicas, um acordo internacional que proíbe o uso, desenvolvimento e manutenção de armas químicas, sendo preparado pela OPCW (em inglês, Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons). A atuação da OPCW na implantação e fiscalização das armas químicas, contribuiu significativamente na eliminação da produção e estocagem no mundo todo, rendendo a essa organização o prêmio Nobel da paz em 2014 (BUSTANI, 2000; FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2021).

Posteriormente, os agentes neurotóxicos OF/P=O foram novamente usados em guerras terroristas, como no atentado ocorrido no metrô de Tóquio, em 1995, sendo utilizado o gás Sarin (MUNRO *et al.*, 1999; SHIH; KAN; MCDONOUGH, 2005). Esse mesmo gás foi utilizado em 2013, em ataques terroristas ocorrido nos arredores de Damasco na Síria (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016).

O principal problema relacionado aos OF/P=O quando são utilizados como armas químicas, são devido aos baixos custos de fabricação e a facilidade de sua produção. Isso faz com que essas armas sejam intensamente utilizadas em ações terroristas, guerras periféricas e assassinatos políticos (FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2021).

Como os OF/P=O possuem elevada lipossolubilidade, eles podem ser absorvidos pelo organismo humano por diversas vias, como oral, nasal, cutânea e pela via ocular (RADOSTITIS *et al.*, 2000). Após a absorção, os OF/P=O se depositam no tecido adiposo, fígado, rins, glândulas salivares, pâncreas, pulmões, sistema nervoso central, músculos, paredes do estômago e do intestino. Eles se tornam mais tóxicos quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativa, ou seja, quando são transformados de OF/P=S para OF/P=O (ALMEIDA, 2010).

Os OF/P=O são ésteres fosfóricos, são compostos por um átomo de fósforo polarizável, pentavalente, o R1 e R2 (FIGURA 3) podem ser metil ou etil, e o X pode ser diferentes grupos, como halogênios, alifáticos, aromáticos, entre outros, ligados diretamente ao átomo de fósforo central. Esse X é liberado do átomo de fósforo quando o pesticida OF/P=O é hidrolisado. O átomo central de fósforo está ligado a um átomo de oxigênio mediante dupla ligação (KANEKAR *et al.*, 2004).

Figura 3 - Estrutura geral dos OF/P=S e dos OF/P=O.



Fonte: Adaptado de Stoddart (1979).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Conselho das Comunidades promovem periodicamente reuniões para mostrar a gravidade das intoxicações por pesticidas e assim propor ações para encontrar soluções para esse grande desafio. E essa preocupação abrange as autoridades de diversos países e as organizações internacionais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

No mundo, aproximadamente milhões de agricultores são intoxicados anualmente e devido à falta de estatísticas oficiais, são responsabilizadas as pessoas que não cumprirem medidas eficazes de controle da produção, distribuição e a venda dos pesticidas. Ainda não se sabe o número de tentativas de suicídio por ingestão dos OF/P=O (SEMENOV *et al.*, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Os sintomas causados pela intoxicação pelos OF/P=O podem ser dores de cabeça, tremores, náuseas, câimbras abdominais, diarreias, suores, falta de clareza e escurecimento da visão, confusão, tensão no tórax e tosse, podendo ocorrer também edema pulmonar. Quando os sintomas incluem descontrole, falta de consciência e convulsões, são indícios de grave envenenamento (COUTINHO *et al.*, 2005).

#### 2. 4 Enzima citocromo P450 humano

O citocromo P450 é uma enzima que pertence à família das monooxigenases envolvida no metabolismo de medicamentos (DOAN *et al.*, 2013). O citocromo P450 está envolvido nas biotransformações de diversos compostos de origem endógena e exógena. Essa enzima modifica quimicamente diferentes moléculas exógenas lipofílicas, tornando-se mais solúveis e de fácil excreção pelo organismo humano. Porém, várias moléculas que foram modificadas pela enzima citocromo P450, ou seja, sofreram a biotransformação, tornam-se muito reativas, que podem causar danos teciduais (LEMOS; TRINDADE, 2014).

## 2. 5 Enzima *HssAChE*

A acetilcolinesterase humana (*HssAChE*) é uma enzima essencial para o funcionamento básico do ser humano e dos animais. É uma enzima importante no processo de hidrólise catalítica de neurotransmissores colinérgicos. E ainda essa enzima apresenta alguns novos papéis não-colinérgicos, como seu envolvimento na adesão, diferenciação e proliferação celular (LAZAREVIC-PASTI *et al.*, 2017).

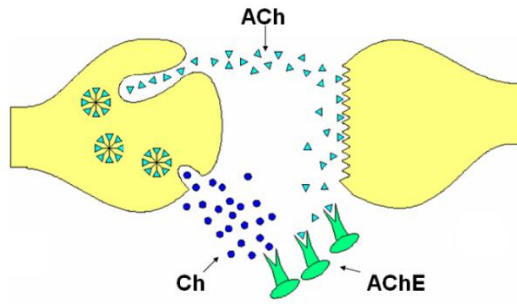
A acetilcolinesterase (AChE) pertence à família das colinesterases, e é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE encontra-se no sistema nervoso central e periférico (RANG; DALE; RITTER, 2001). No sistema nervoso central, a AChE atua no controle motor, na cognição e na memória. Já no sistema nervoso periférico, a AChE modula os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos através da dilatação dos vasos sanguíneos e na contração dos músculos lisos (PATRICK, 2001; PETRONILHO *et al.*, 2011).

A ACh é um neurotransmissor, encontrada no axônio terminal, região terminal dos neurônios. A ACh é armazenada em vesículas sinápticas, mas quando um impulso nervoso chega no axônio terminal, a ACh é liberada pelo neurônio para a região sináptica, sendo atraída pelos receptores colinérgicos que encontram-se no próximo neurônio. Quando a interação da ACh ocorre com os receptores, o impulso nervoso no neurônio é regenerado, dando continuidade à transmissão (PATRICK, 2001; PETRONILHO *et al.*, 2011; RANG; DALE; RITTER, 2001; VENTURA, 2010).

Após a transmissão do impulso nervoso, o processo de interação da ACh com o receptor precisa ser interrompido, evitando assim, o excesso de transmissão nervosa, que pode causar problemas de funcionamento do corpo (PATRICK, 2001).

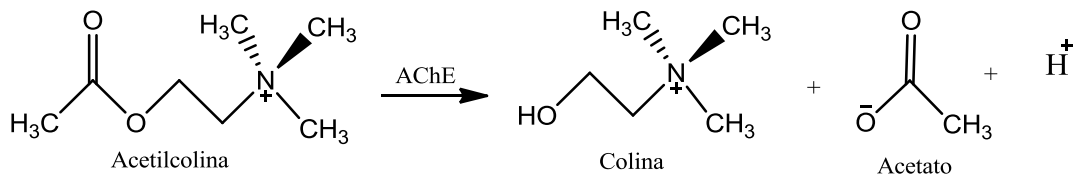
A enzima AChE está presente no nosso organismo, ela recolhe o neurotransmissor ACh, modificando sua estrutura molecular e transformando em colina (Ch), sendo reabsorvida pelo primeiro neurônio para ser reconvertida em ACh, para ser reutilizada na transmissão de impulsos nervosos. Na figura 4, tem-se a transmissão neuronal da ACh pela AChE (PETRONILHO *et al.*, 2011). Na Figura 5, encontra-se a modificação da ACh, que é considerado um processo de hidrólise (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Figura 4 - Transmissão neuronal da ACh pela AChE.



Fonte: Petronilho *et al.* (2011).

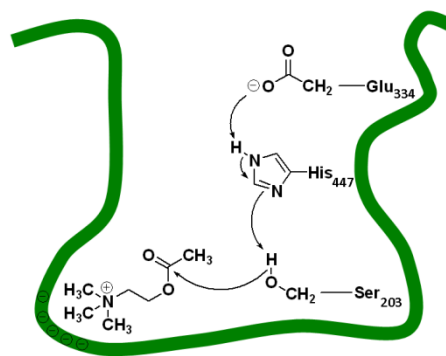
Figura 5 - Hidrólise da ACh pela AChE.



Fonte: Adaptado de Dos Santos *et al.* (2007).

O principal resíduo de aminoácido do sítio ativo da AChE envolvido no processo de hidrólise da ACh é a Serina203, na qual sua ação é ajudada pelos aminoácidos histidina 447 e ácido glutâmico 334 (FIGURA 6) (KWONG, 2002; PETRONILHO *et al.*, 2011).

Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da ACh no sítio ativo da *HssAChE*.



Fonte: Petronilho *et al.* (2011).

Como podemos observar, o produto importante da hidrólise da ACh é a Ch, que é reabsorvida pelo terminal do axônio para reagir com o Acetilcoenzima para regenerar a ACh, a qual é transportada para a vesícula sináptica e então reutilizada como neurotransmissor. Quando a AChE interage com os organofosforados (OF/P=O), sua inibição é basicamente permanente, levando à morte. Esta inibição ocorre por fosforilação do aminoácido serina do sítio ativo,



processo que dificulta a hidrólise da ACh, tornando a enzima inativa. Em seguida, o grupo fosfato é hidrolisado pela água, levando à sua forma aniônica após algum tempo (variando de minutos a dia), dependendo do tipo de OF/P=O utilizado (FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2021).

Há também um segundo sítio aniônico periférico, o qual pode estar presente na ação de alguns inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato (NUNES- TAVARES, 2002; SILMAN, 2005). A conformação do sítio ativo, a afinidade ou configuração dos compostos ligados ao centro ativo é influenciada pela ocupação do sítio ativo periférico. Outro sítio ativo que existe e que pode ser alvo de inibidores, é o sítio de ligação à Ch, o qual possui resíduos de triptofano hidrofóbicos e grupos aniônicos (PETRONILHO *et al.*, 2011).

A estrutura cristalina da AChE humana tem um desfiladeiro hidrofóbico estreito e longo de aproximadamente 20 Å de profundidade. No fundo do desfiladeiro, uma tríade catalítica (Ser203, His447 e Glu334) encontra-se no sítio ativo catalítico. O sítio aniônico periférico está localizado próximo à entrada do desfiladeiro. O sítio aniônico periférico pode acelerar a montagem de A $\beta$  nas fibrilas amilóides. Os inibidores de ligação dupla podem interagir simultaneamente com o sítio ativo catalítico e com o sítio aniônico periférico e aliviar o déficit cognitivo em vítimas de doença de Alzheimer. Esta é uma nova forma de retardar o progresso neurodegenerativo, estabelecendo a base para decifrar os mecanismos moleculares de inibição (LIU; YE; CHEN, 2017).

Para entender o grau de toxicidade dos compostos OF/P=S e dos compostos OF/P=O, é necessário utilizar ferramentas computacionais eficientes e capazes de contribuir para a resolução de problemas em química. Nesse trabalho, foi utilizado métodos computacionais para estudar as interações intermoleculares que ocorrem entre os compostos OF/P=S e os OF/P=O e o sítio ativo das enzimas, e a reação inibitória dos OF/P=S e dos OF/P=O e as enzimas.

## 2. 6 Métodos computacionais

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o *design* de novos fármacos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse, especificamente neste trabalho, os compostos organofosforados (OF/P=S) (clorpirifós, diazinon, dimetoato, malation e paration) (FIGURA 1) e os compostos organofosforados (OF/P=O) (clorpirifós oxon, diazoxon, ometoato, malaixon e paraoxon) (FIGURA 2). Os modelos moleculares gerados pelo

computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva. Dentre as inúmeras ferramentas computacionais, destaca-se o *docking* e os cálculos de QM/MM que são métodos bem versáteis para a análise (CARVALHO *et al.*, 2003; MANCINI, 2011).

### 2. 6. 1 Ancoramento molecular

O ancoramento molecular (em inglês, *molecular docking*) é um processo que indica a conformação do ligante e a sua orientação dentro do sítio ativo da enzima. Para compreender o mecanismo de interação dos pesticidas, é preciso saber qual a sua posição tridimensional na interação molecular com a enzima, ou seja, a sua geometria e a energia de interação (IWATA *et al.*, 2000; MANCINI, 2011; MIZUTANI; NIWA; TANAKA, 1994).

A simulação computacional do ancoramento molecular é uma técnica muito utilizada e de grande importância para investigar as interações moleculares entre a enzima e o ligante após a elucidação da estrutura tridimensional da enzima. Por meio dessa simulação, encontra-se a estrutura que apresenta maior estabilidade do complexo enzima-ligante e essa estabilidade relativa é calculada. As conformações estruturais que apresentam maior confiabilidade são obtidas por meio da análise de raios-X de cristais do complexo ou RMN, porém há uma grande dificuldade em obter os dados experimentais de todos os inibidores de interesse (GUIMARÃES, 2010; MANCINI, 2011; SILVEIRA, 2003).

Os valores da função utilizada no ancoramento (*Docking Scoring Function*),  $E_{score}$ , são definidos pela equação 1:

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

O termo  $E_{inter}$ , é a energia de interação ligante-enzima e é definido de acordo com a equação 2:

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

Na equação 2, o primeiro termo  $E_{PLP}$ , é o de energia potencial inibidor por partes que utiliza dois conjuntos diferentes de parâmetros, um para a aproximação do termo estérico (Van de Waals) entre átomos e o outro para o potencial para a ligação de hidrogênio. Já o segundo termo

descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados, ou seja, 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  $\text{Kcal mol}^{-1}$  (MANCINI, 2011; RAMALHO *et al.*, 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O termo  $E_{\text{intra}}$  é a energia interna do ligante e é definido de acordo com a equação 3:

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

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, exceto os pares de átomos conectados por duas ligações. Já o segundo termo refere-se a energia de torção, onde o  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. Para determinar diversas torções, é utilizada a média da contribuição de torção da ligação da energia. O último termo,  $E_{\text{penalizada}}$  (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. Todas essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (enzima) (MANCINI, 2011; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

A técnica de ancoramento molecular encontra a média das estruturas que possuem estabilidade do ligante na enzima e essa estabilidade relativa é calculada. Após analisar todos os modos de interação considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da enzima, encontra-se a estrutura mais estável (MANCINI, 2011; MIZUTANI *et al.*, 1994).

## 2. 6. 2 Cálculos de QM/MM

As técnicas de QM/MM (em inglês, Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) são utilizadas para a modelagem computacional para grandes sistemas, que combinam os graus eletrônicos da química quântica com os métodos da mecânica molecular para aumentar o desempenho e diminuir a demanda computacional (GONCALVES *et al.*, 2014).

QM é uma técnica que permite os rearranjos eletrônicos relacionados com a quebra e formação de ligações químicas. Nos mecanismos de reação enzimática, a região QM consiste no sítio ativo da enzima, onde são envolvidos átomos da enzima, substratos e cofatores da reação. A maior parte do sistema, que não está envolvida na reação, é tratada por meio das técnicas empíricas MM, o qual um campo de força previamente escolhido deve ser utilizado.

Uma característica importante é que existem várias formas de acoplamento das regiões QM/MM. A forma mais simples de acoplamento faz uso de cargas pontuais na região QM que interagem com o restante da região MM (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010). No desempenho desse cálculo, a energia QM/MM do sistema total é calculado como mostrado na equação 4:

$$E_{TOTAL}^{QM/MM} = E_{TOTAL}^{MM} + E_{QM\ região}^{QM} - E_{QM\ região}^{MM} \quad (4)$$

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

A energia total do sistema não pode ser escrita apenas como a soma das energias calculadas para cada subsistema (SENN; THIEL, 2009). As condições de acoplamento no limite QM/MM deve ser também considerado. De acordo com o tipo de QM/MM, é necessário uma região de fronteira (parte entre regiões QM e MM), átomos adicionais que fazem somente parte do subsistema QM ou ligações de átomos com características que apresentam nos cálculos QM e MM (HEYDEN; LIN; TRUHLAR, 2007; SENN; THIEL, 2009).

Os métodos QM de alto nível são utilizados no estudo de reações enzimáticas, que permitem o cálculo das barreiras energéticas para o processo da reação, e os efeitos de grandes sistemas em uma região QM podem ser estimados, devido ao uso da técnica de empregar métodos híbridos QM/MM (BRAUN-SAND *et al.*, 2005; MULHOLLAND, 2007). A abordagem QM/MM é constantemente utilizada, pois proporciona conhecimento dos mecanismos envolvidos em uma catálise enzimática (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010).

A abordagem QM/MM é considerada como uma ferramenta de grande valia, pois além de ser utilizada para a modelagem de sistemas biomoleculares, é também usados na investigação de sistemas inorgânicos/organometálicos, de estado sólido e no estudo de processos em solvente explícito (SENN; THIEL, 2009).

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E. X. *et al.* **Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2006. 103 p. 13220.
- ALMEIDA, T. N. **Contaminação por agrotóxicos carbamatos e organofosforados em água para consumo humano de Dourados, MS, 2008 a 2009.** 22.ed. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Campo Grande, 2010. 628.16.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES, A. A. **Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico.** Revista Virtual de Química, 2016. 8 (6), 1818-1834.
- BELINSKAIA, D. A. *et al.* **Rational in silico design of aptamers for organophosphates based on the example of paraoxon.** Computational Biology and Chemistry, 2019. v. 80, p. 452-462.
- BELLO-RAMIREZ, A.M.; CARREON-GARABITO, B.Y.; NAVA-OCAMPO, A. A. **A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides.** Toxicology, 2000. 149 (2–3), 63–68.
- BERTOLUZZI, E. C. *et al.* **Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, R. S.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 2006. v.10, p.881-887.
- BIBI, Z. **Role of cytochrome P450 in drug interactions.** Nutrition & Metabolism, 2008. 5(1), 1-10.
- BRAUN-SAND, S.; OLSSON, M. H. M.; WARSHEL, A. **Computer modeling of enzyme catalysis and its relationship to concepts in physical organic chemistry.** In RICHARD, J. P. Advances in physical organic chemistry: volume 40. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 201-245.
- BUMBACILA, B.; PUTZ, M. V. **Neurotoxicity of Pesticides: The Roadmap for the Cubic Mode of Action.** Current Medicinal Chemistry, 2020. v. 27, n. 1, p. 54-77. ISSN 0929-8673.
- BURATTI, F. M.; TESTAI, E. **Evidence for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver.** Toxicology, 2007. 241 (1-2), 33-46.
- BUSTANI, J. M. **A Convenção sobre a Proibição de Armas Químicas: Trajetória Futura.** Parcerias Estratégicas, 2000. 5(9).
- CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. **Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS.** Química Nova, 2008. v. 31, n. 8, 1982-1986.

- CARVALHO, I. *et al.* **Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica**. São Paulo: Química Nova, 2003. v. 26, n. 3, p. 428-438.
- CHAUHAN, S. *et al.* **Chemical warfare agents**. Amsterdam: Environmental Toxicology and Pharmacology, 2008. v. 26, n. 2, p. 113-122.
- COCKER, J. *et al.* **Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides**. Toxicology Letters, 2002, 134, 97-103.
- COSTA, L.G. **Current issues in organophosphate toxicology**. Clinica Chimica Acta, 2006, 366, 1 – 13.
- COUTINHO, C. F. B. *et al.* **Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez**. Curitiba: Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2005. v. 15, p. 65-72.
- CUNHA, L. N. D.; SOARES, W. L. **Os incentivos fiscais aos agrotóxicos como política contrária à saúde e ao meio ambiente**. Cadernos de Saúde Pública, 2020. v. 36, n. 10.
- DA CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C.; REYNOLDS, R. C. **Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with Mycobacterium tuberculosis and human dihydrofolate reductases**. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2008, 25(4), 377–385.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 2014. v.18, n.12, p.1296–1301.
- DE PAULA, R. L. *et al.* **Molecular modeling and in vitro studies of a neutral oxime as a potential reactivator for acetylcholinesterase inhibited by paraoxon**. Molecules, 2018. v. 23, n. 11, 2018.
- DIKSHIT, P. C. **Textbook of Forensic Medicine and Toxicology**. 2nd Edition. New Delhi: Pee Pee Publishers, 2007.
- DE MEDEIROS, J. F.; ACAYABA, R. D'ANNA; MONTAGNER, C. C. **A química na avaliação do impacto à saúde humana diante da exposição aos pesticidas**. Química nova, 2021. v. 44, n. 5, p.584-598.
- DVIR, H. *et al.* **Acetylcholinesterase: from 3D structure to function**. Chemico-Biological Interactions, 2010, 187(1-3), 10-22.
- DOAN J. *et al.* **Prevalence and risk of potential cytochrome P450-mediated drug-drug interactions in older hospitalized patients with polypharmacy**. Ann Pharmacother, 2013. 47: 324-332.
- DOS SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. **Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais**. Química Nova, 2007. 30(1), 159-170.

ECOBICHON, D. J. **Toxic effects of pesticides**. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, 2001. 6, 763– 810.

FIGUEROA-VILLAR, J. D. *et al.* **Review about structure and evaluation of reactivators of acetylcho-linesterase inhibited with neurotoxic organophosphorus compounds**. Current Medicinal Chemistry, 2021. v. 28, n. 7, p. 1422-1442.

FONSECA, B.; ROHDEN, J. **14 mil pessoas foram intoxicadas por agrotóxicos durante governo Bolsonaro**. Repórter Brasil/ Agência Pública, 2022.

GIACOPPO, J. O. S. *et al.* **Guerra química: perspectivas no estudo de reativadores da enzima acetilcolinesterase inibida por organofosforados**. Revista Virtual de Química, 2014. 6 (3), 653-670.

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

GUENGERICH, F. P. **Characterization of human cytochrome P450 enzymes**. The FASEB Journal, 1992. 6(2), 745-8.

GUIMARÃES, A. P. **Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de bacillus anthracis**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010. 170 p.

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

HERNANDEZ, J. *et al.* **Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides**. Pesticide Biochemistry Physiology, 1998. 61, 87–94.

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 trigonal bipyramidal transition state**. Biochemistry, 2007. 46, 4815.

IWATA, Y. *et al.* **Conformational analysis and docking study of potent factor XIII a inhibitors having a cyclopropenone ring**. New York: Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2000. v. 18, n. 6, p. 591-599.

KANEKAR, P. P. *et al.* **Biodegradation of organophosphorus pesticides**. Proceedings of the Indian National Science Academy, 2004. v. 1, p. 57-70.

KWONG, T. C. **Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology**. Ther Drug Monit, 2002. 24, 144-149.

LARSON, S. J.; CAPEL, P. D.; MAJEWSKI, M. S. **Pesticides in surface waters distribution, trends, and governing factors**. Chelsea: Ann Arbor Press, 2002. 373p.

LAZAREVIC-PASTI, T. *et al.* **Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs.** *Current Medicinal Chemistry*, 2017. v. 24, n. 30, p. 3283-3309.

LEMOS, A. J. G.; TRINDADE, E. J. **Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos P450.** *Revista Científica do ITPAC*, 2014. 7(2).

LIMA, P. DE; JUNIOR, P. **Possíveis doenças físicas e mentais relacionadas ao manuseio de agrotóxicos em atividades rurais, na região de Atibaia, SP/Brasil.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008.

LIU, H.; YE, W.; CHEN, H. F. **Positive cooperative regulation of double binding sites for human acetylcholinesterase.** *Chemical Biology & Drug Design*, 2017. v. 89, n. 5, p. 694-704.

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

LOURENÇATO, L. F. **Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre, Colombo, PR.** Curitiba: UFPR, 2010. 48p.

MANCINI, D. T. **Estudos Computacionais de Potenciais Inibidores da Enzima Nucleosídeo Hidrolase de *Brucella Suis*.** Dissertação (mestrado) Lavras : UFPA, 2011.

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

MLADENOVIC, M. *et al.* **The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors: Comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans in vitro.** *Molecules*, 2018. v. 23, n. 9.

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

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

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. **A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde.** *Revista Mangia Acadêmico*, 2016. 1 (1), 2525-2801.

NUNES-TAVARES, N. *et al.* **A Inhibition of Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by Tricyclic Antidepressants.** *The Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002. 34, 1071.

PATOCKA, J. *et al.* **Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics.** *Journal of Applied Biomedicine*, 2005. 3, 91.



- PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2th ed. Ed. Oxford, 2001. 432.
- PETRONILHO, E. da C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. **Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química**. Revista Militar de Ciência e Tecnologia, 2011.
- PUBCHEM. **National Library of Medicine**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 30 de maio de 2022.
- RADOSTITIS, E. M. *et al.* **Veterinary medicine**. 9. ed. London: W. B. Saunders, 2000. 1881 p.
- RAMALHO, T. C. *et al.* **Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations**. New York: Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2009. v. 27, n. 2, p. 195-208.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Drogas que inibem a colinesterase**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RIBEIRO, M. L. *et al.* **Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente**. Holos Environment, 2008. v. 8, n. 1, p. 54.
- SALVO, L. M.; SANTIAGO, M. R.; DE ASSIS, H. C. S. **Biomarkers as a tool to evaluate environmental quality of aquatic ecosystems susceptible to pesticide contamination**. Periodico Tche Quimica, 2018. v. 15, n. 30, p. 56-64.
- SANCHES, S. M. *et al.* **Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2003. v. 13.
- SANTIAGO, L. M. **A metabolização no sistema do citocromo P450 e a sua importância em clínica geral**. Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar, 2003. 19, 121-129.
- SCHÄFER, R. B. *et al.* **Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems**. Environmental Science Technology, 2012. 46, 5134–5142.
- SEMENOV, V. E. *et al.* **6-Methyluracil derivatives as peripheral site ligand-hydroxamic acid conjugates: Reactivation for paraoxon-inhibited acetylcholinesterase**. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020. v. 185, p. 111787.
- SENN, H. M.; THIEL, W. **QM/MM methods for biomolecular systems**. New York: Angewandte Chemie International Edition, 2009. v. 48, n. 7, p. 1198-1229.
- SENTHILKUMAR, K. *et al.* **Analysis of polarization in QM/MM modelling of biologically relevant hydrogen bonds**. Oxford: Journal of the Royal Society Interface, 2008. v. 5, n. 3, p. 207-216.
- SHIH, T.; KAN, R. K.; MCDONOUGH, J. H. **In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents**. Limerick: Chemico-Biological Interactions, 2005. v. 157, n. 8, p. 293-303.

SILVA, D. R. O. *et al.* **Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado.** Química Nova, 2011. v.34, p.748-752.

SOREQ, H. *et al.* **Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1990. 87, 9688.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. **Acetylcholinesterase – new roles for an old actor.** Nature, 2001. 2, 294-302.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. **Acetylcholinesterase: "Classical" and "Non-classical" Functions and Pharmacology.** Current Opinion in Pharmacology, 2005. 5, 293.

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

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

SUAREZ-LOPEZ, J. R. *et al.* **Associations of acetylcholinesterase activity with depression and anxiety symptoms among adolescents growing up near pesticide spray sites.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2019. v. 222, n. 7, p. 981-990.

TAYLOR, P. **Anticholinesterase agents.** In Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman, J.G., Limbird, L.E., and Gilman, A.G., Eds), McGraw-Hill, 2001. 175-192.

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

TORRES, F. O.; COLASSO, C. **Armas químicas- Agentes neurotóxicos: toxicologia e desenvolvimento de novos tratamentos.** Revista Brasileira de Estudos de Defesa, 2018. v.5, n.2, p.37-59

TUCKER, J. B. **War of nerves: Chemical warfare from World War I to AlQaeda.** Nova Iorque: Anchor Books, 2006.

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

VASCONCELLOS, P. R. O. *et al.* **Exposição a agrotóxicos na agricultura e doença de Parkinson em usuários de um serviço público de saúde do Paraná, Brasil.** Cadernos Saúde Coletiva, 2020. 28(4): 567-578.

VENTURA, A. L. M. **Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo.** Revista Psiquiatria Clínica,

2010. 37(2): 66-72.

VIANNA, A. M. **Poluição ambiental, um problema de urbanização e crescimento desordenado das cidades.** Revista Sustinere, 2015. v.3, n. 1, p. 22-42.

VINHAL, D. C.; SOARES, V. H. C. **Intoxicação por organofosforados:** uma revisão da literatura organophosphates intoxication: a literature review. Revista Científica FacMais, 2018. v. 14. n.3. p. 2238-8427.

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

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

YERA, A. M. B. *et al.* **Occurrence of Pesticides Associated to Atmospheric Aerosols: Hazard and Cancer Risk Assessments.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 2020. v. 31, n. 6, p. 1317-1326.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGO****Oxidative biotransformation of organophosphotioate pesticides and acetylcholinesterase inhibition**

(Artigo elaborado de acordo com o periódico científico Letters in Drug Design & Discovery)

**Abstract: Background:** Pesticides have lethal properties, capable of controlling or eliminating a living organism, that is, they block the organisms' vital metabolic processes. They cause serious problems for human health, as they are highly toxic. The most used pesticides that are considered toxic are known as organophosphothioates (OP/P=S) in their commercialized form and organophosphates (OP/P=O) in their active form. These compounds have been the subject of studies on their metabolism and toxicology. According to research carried out, the toxicity of these pesticides is increased when oxidative metabolic desulfurization reactions occur, with the P=S bond being transformed into a P=O bond. This toxicity is due to the ability of OP/P=O species to inhibit the human acetylcholinesterase enzyme (HssAChE).

**Methods:** To study the oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides and the inhibition of the HssAChE enzyme by OP/P=S and OP/P=O using the molecular docking technique and QM/MM calculations.

**Results:** The theoretical results obtained showed that in the oxidative biotransformation process, parathion is the compound with the greatest capacity to transform its P=S bonds into P=O bonds, thus forming the active paraoxon metabolite. In the HssAChE inhibition by OP/P=S and OP/P=O, our results showed that of all the compounds investigated, those with the highest inhibitory activities are parathion, paraoxon, malathion, diazoxon, chlorpyrifos and omethoate.

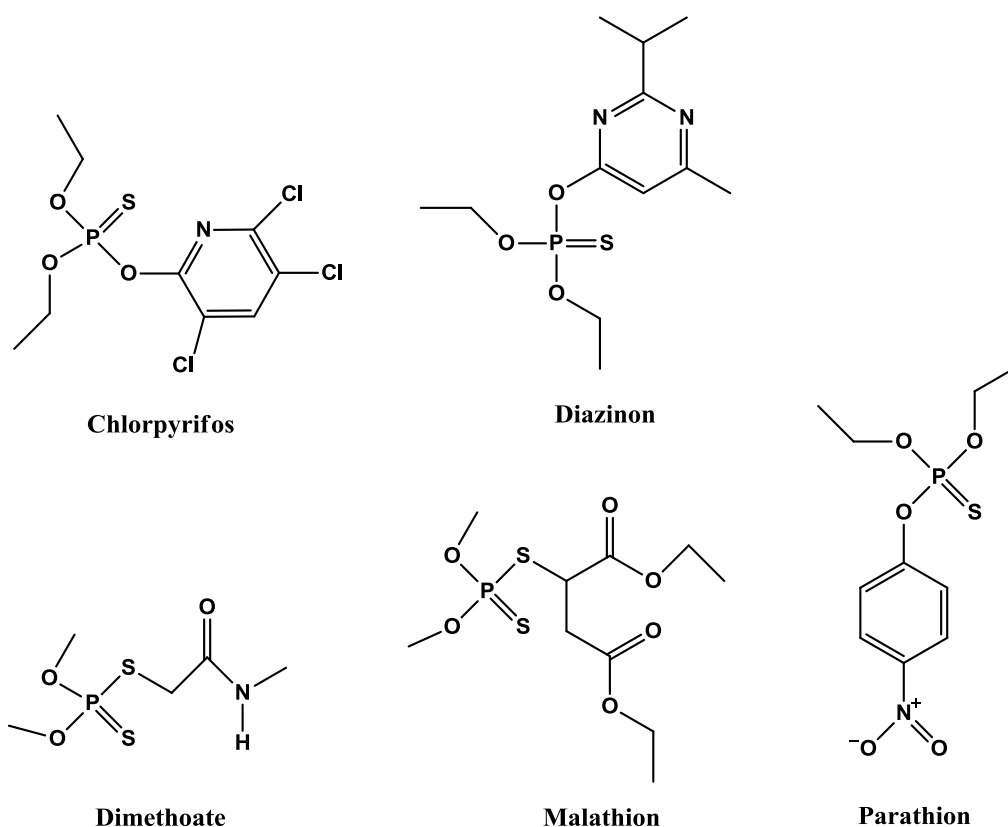
**Conclusion:** This study was essential due to the lack of information in the literature about the oxidative biotransformation process of OP/P=S pesticides, as well as the ability of these compounds to inhibit HssAChE. With this study, it was possible to observe that, in the oxidative biotransformation, chlorpyrifos and parathion have greater capacities to transform into their active metabolites and in the inhibition of the HssAChE enzyme, it was possible to observe that not all OP/P=O are the ones with the highest abilities to inhibit the HssAChE enzyme.

**Keywords:** Computational chemistry, Pesticides, Oxidative biotransformation, HssAChE inhibition, Molecular docking, QM/MM.

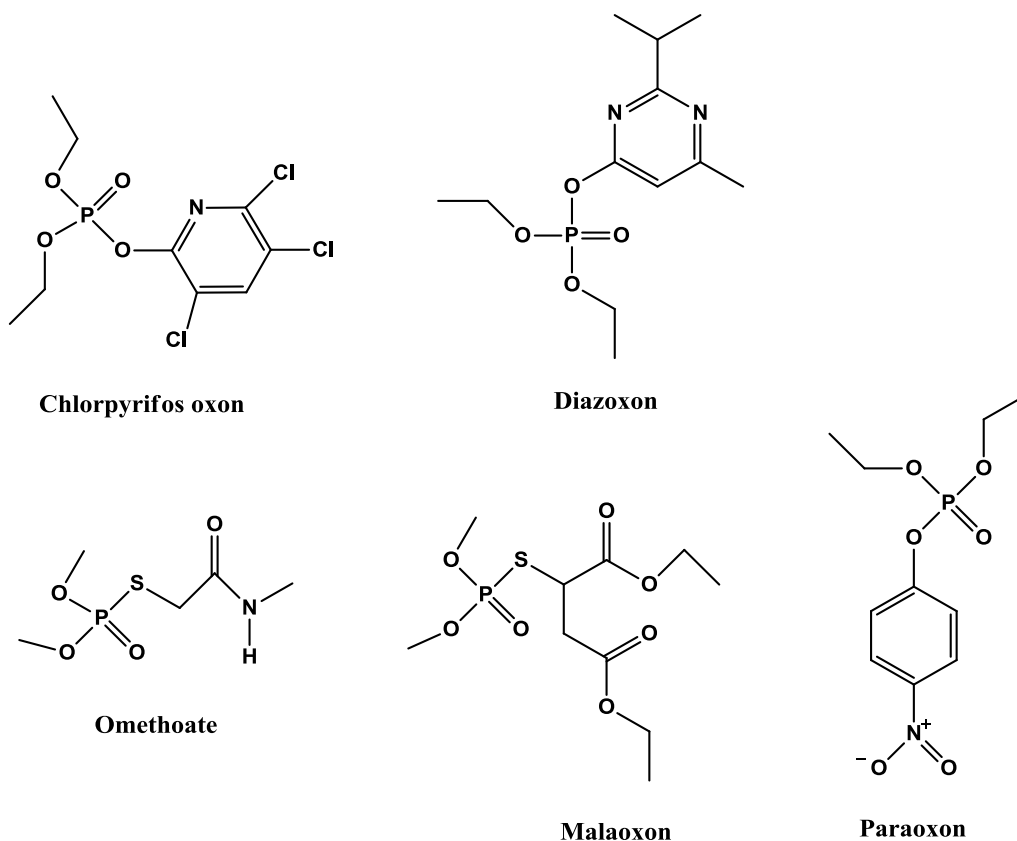
## 1. INTRODUCTION

Pesticides are highly toxic to living organisms [1]. The most used pesticides that are considered toxic are known as organophosphothioates (OP/with P=S bonds) in their commercialized form and organophosphates (OP/with P=O bonds) in their active form [2].

When pesticides are absorbed by the human body, they can act as potent inhibitors of the human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme, causing hyperstimulation of acetylcholine (ACh) receptors, preventing normal muscle contraction [3]. The toxicity of these pesticides occurs due to their ability to bind to HssAChE, through the serine amino acid (Ser203) [4]. The HssAChE inhibition leads to an uncontrolled increase in the ACh neurotransmitter rate, causing synapse problems [5, 6]. Fig. 1 shows the OP/P=S structures and Fig. 2 shows the OP/P=O structures, which will be the subject of studies on their metabolism and toxicology.



**Fig. (1).** OP/P=S structures: Chlorpyrifos, Diazinon, Dimethoate, Malathion and Parathion.  
Source: Adapted from PubChem (2022).



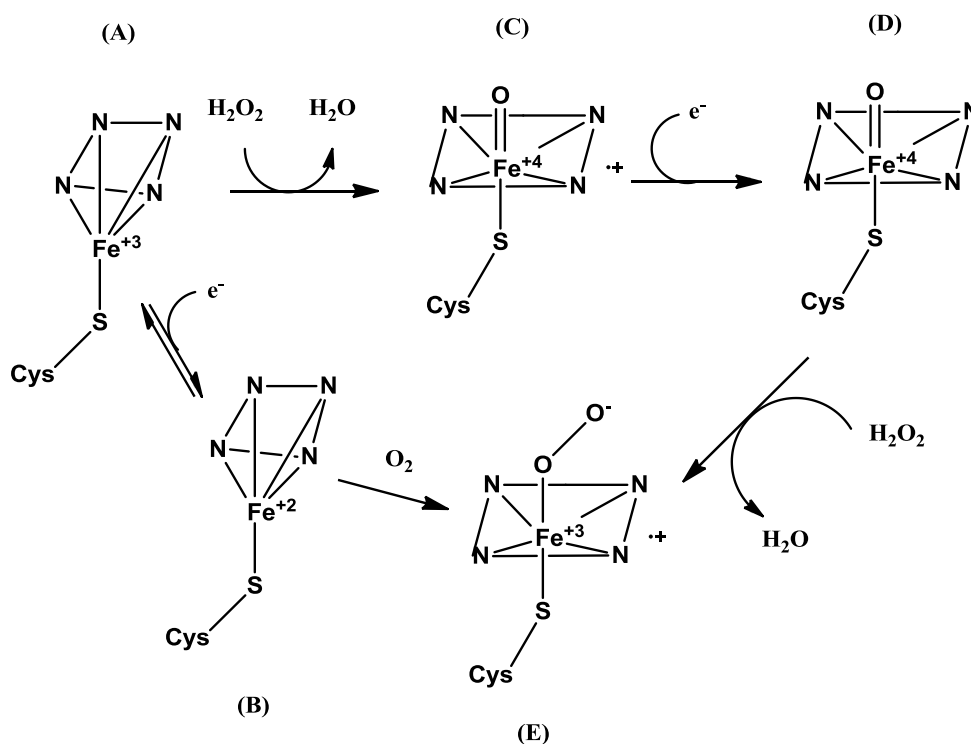
**Fig. (2).** OP/P=O structures: Chlorpyrifos oxon, Diazoxon, Omethoate, Malaoxon, Paraoxon. Source: Adapted from PubChem (2022).

According to previous studies, the toxicity of these pesticides is increased when oxidative metabolic desulfurization reactions occur, with the P=S bond being transformed into a P=O bond [7, 8]. The P=O bond, in relation to the P=S bond, allows more electron transfer from phosphorus to oxygen due to the electronegativity difference. Thus, more intense charges are generated in the two elements, resulting in stronger interactions of OP/P=O with the esterase center of the HssAChE enzyme. The OP/P=S compounds need to undergo a metabolic bioactivation, that is, an oxidative desulfurization through the human cytochrome P450, resulting in the formation of an “oxon”, so that its biological activity (HssAChE inhibition) is carried out [9]. In spite of the great importance, surprisingly little detailed computational work on the subject of oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides has appeared. In addition, the interpretation of this data is not straightforward, as finding a motional model to describe this data is challenging.

The human cytochrome P450 is found in the lipid bilayer of the smooth endoplasmic reticulum of hepatocytes. The liver is the main site of pharmacological biotransformation in the human body, due to the presence of the main xenobiotic-processing cytochromes. This enzyme

has the function of promoting the monooxygenation of different chemical compounds [10, 11, 12, 13].

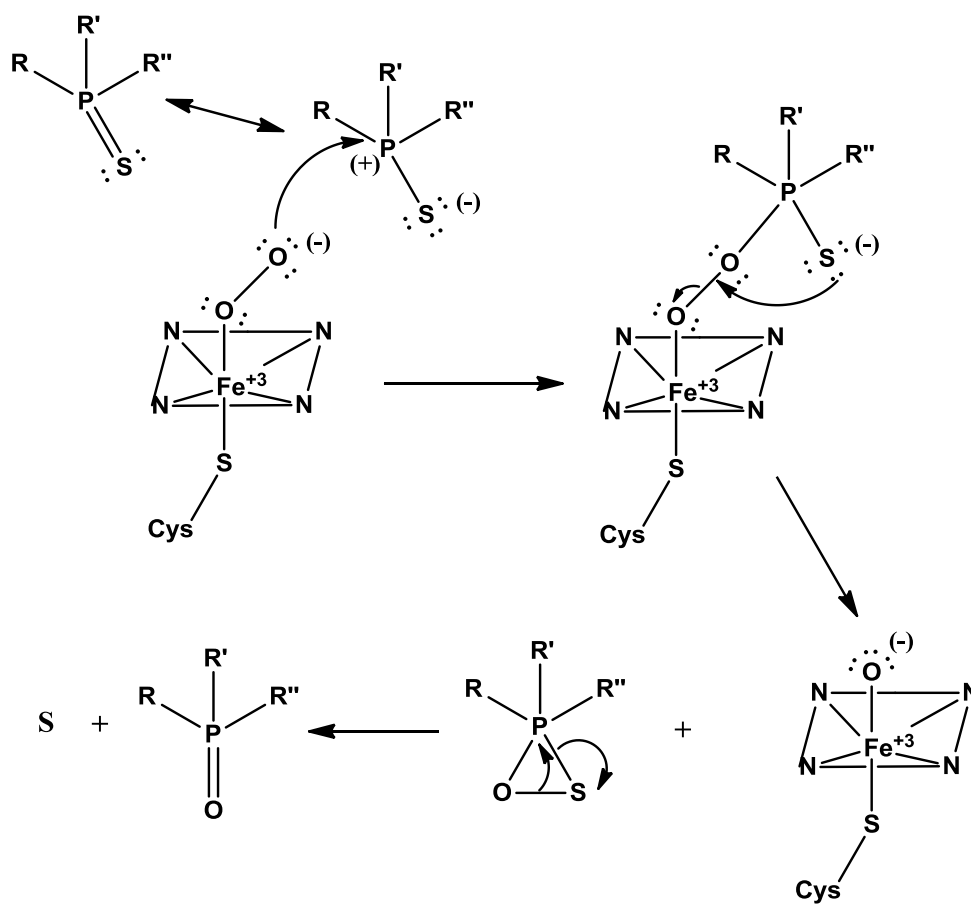
To study the oxidative biotransformation reaction, it is necessary to activate the human cytochrome P450 binding site. This activation takes place in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and electrons (Fig. 3) [2, 14].



**Fig. (3).** Activation of the cytochrome P450 active site in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and electrons. Source: Adapted from Bello-Ramirez; Carreon-Garabito; Nava-Ocampo (2000).

Fig. 4 shows the oxidative biotransformation reaction of OP/P=S pesticides after the human cytochrome P450 binding site activation. The activated site of cytochrome P450 attacks the phosphorus of the OP/P=S, performing the oxidative biotransformation, wherein the P=S bond is transformed into a P=O bond.





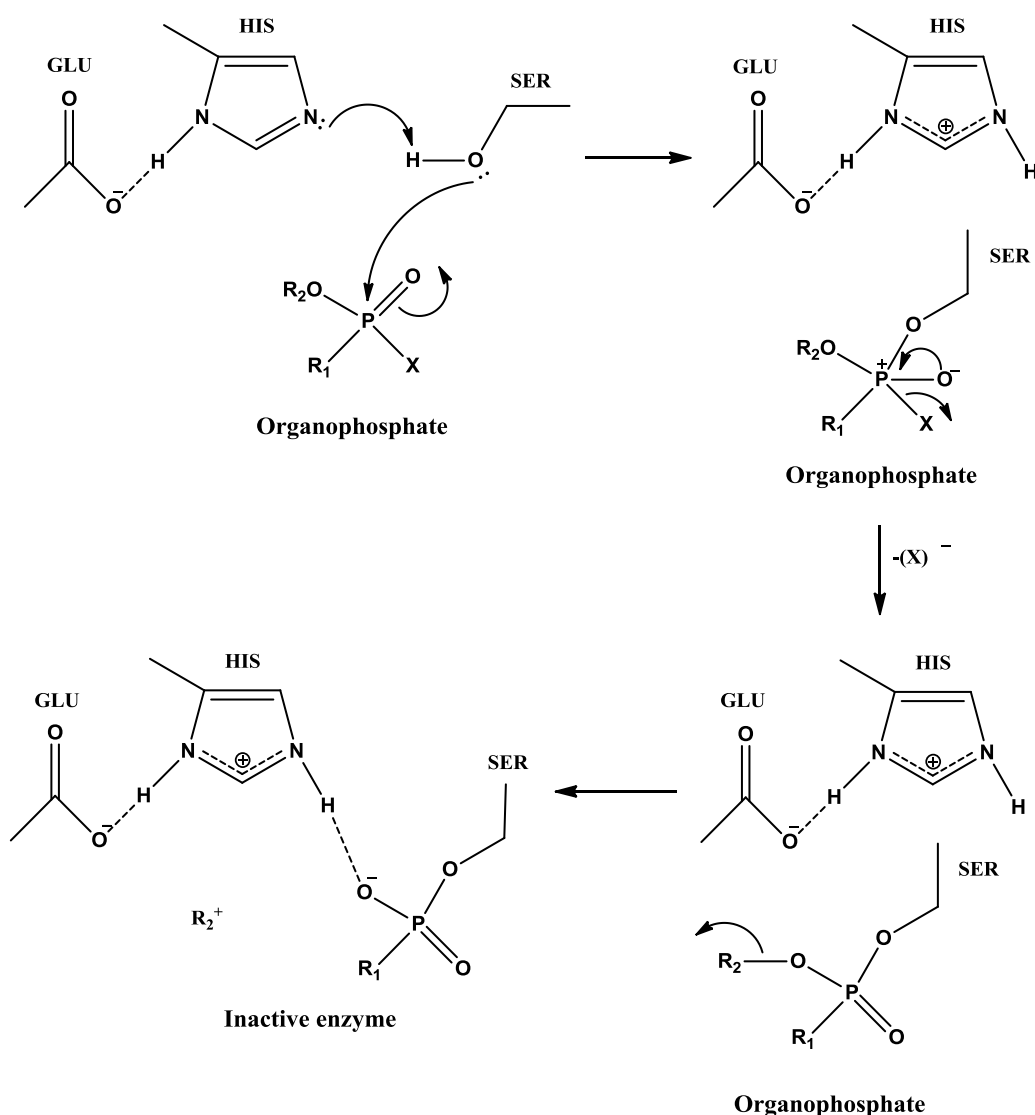
**Fig. (4).** Oxidative biotransformation reaction of OP/P=S pesticides. Source: Adapted from Bello-Ramirez; Carreon-Garabito; Nava-Ocampo (2000).

According to the literature, OP/P=O pesticides are more effective inhibitors of the HssAChE enzyme. Note that this enzyme regulates the neurotransmission of nerve impulses in the synapses through the ACh hydrolysis. The HssAChE inhibition can lead to serious health problems arising from the cholinergic syndrome, even leading to death. [15, 16, 17]. In the literature, a few studies have addressed the role of OP/P=S pesticides are also capable of inhibiting the HssAChE enzyme.

The HssAChE enzyme is found in the central and peripheral nervous systems, and it is considered to be one of the most efficient hydrolases, which is able to rapidly hydrolyze ACh at the neuromuscular junctions and control the cholinergic synapses in the brain [16, 18, 19]. Each HssAChE monomer has a catalytic center that is composed of the catalytic subsite, catalytic triad and anionic subsite, which accommodates the positively charged nitrogen of ACh [16, 17]. The HssAChE active site is found in a “throat”, and it is divided into two different and important regions. The first region is the “steratic” site, where the catalytic triad is located. In addition, the second region is the anionic site, where it occurs the binding of ACh by the choline

part (Ch). The catalytic triad is composed of serine, histidine and glutamate residues (Ser203, Glu334 and His447), found at the bottom of the “throat” of the active site [18, 20, 21].

To understand the HssAChE inhibition by OP/P=S and OP/P=O, it is necessary to evaluate  $S_N2$  reactions (bimolecular nucleophilic substitution). Fig. 5 shows the HssAChE inhibition reaction by OP/P=O. This inhibition takes place when the oxygen of the Ser203 amino acid (nucleophile) attacks the phosphorus of OP/P=O, expelling the leaving group represented by X [22].



**Fig. (5).** HssAChE enzyme inhibition reaction. Source: Adapted from Dos Santos *et al.* (2007).

This study is very important due to the lack in the literature of works produced at the molecular level on the oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides by the human cytochrome P450 enzyme, as well as the inhibition of the HssAChE enzyme by OP/P=S

pesticides. A detailed study of interactions and reactions is necessary to assess the degree of toxicity of OP/P=S and OP/P=O, so that in the future new compounds with a lower degree of toxicity can be developed and also serve as a warning of the harm that these compounds can cause.

The objective of this work was to use computational chemistry techniques, such as molecular docking, to obtain important information on the interaction modes of OP/P=S compounds (chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, malathion and parathion) in the cytochrome P450 active site and the interaction of OP/P=S and OP/P=O compounds (chlorpyrifos oxon, diazoxon, omethoate, malaoxon and paraoxon) in the HssAChE active site. Also, through the QM/MM calculation approach, it was possible to evaluate the reaction mechanism for the oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides by the human cytochrome P450, and for the inhibition of the HssAChE enzyme by the OP/P=S and OP/P=O pesticides.

## 2. METHODS

### 2.1. Molecular docking

To obtain the initial conformation of organophosphothioates (OP/P=S) and organophosphates (OP/P=O), the three-dimensional structures of these compounds were constructed using the GaussView program and their atomic partial charges were calculated in Gaussian program [23] at the Density Functional Theory (DFT) level, with 6-31G (d, p) basis set and B3LYP density functional [24, 25]. This procedure was necessary to obtain the initial conformation of the OP/P=S and OP/P=O compounds, which were important to perform the molecular docking calculations.

After the construction of the 3D structures of the OP/P=S and OP/P=O species, they were transferred to the Molegro Virtual Docker (MVD) program [26], where the OP/P=S compounds were docked into the human cytochrome P450 active site (PBD code 1OG5; resolution = 2.55 Å; active ligand = warfarin) [27]. On the other hand, the OP/P=S and OP/P=O compounds were docked into the human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme active site (PBD code 4EY7; resolution = 2.35 Å; active ligand = donepezil) [27], taking into account the same procedures performed in previous works [25, 28, 29, 30]. In this step, the identification of the ligand interaction modes is interactive by evaluating a number of solutions (ligand conformation and orientation) and estimating the energy of their interactions with the protein. The best solutions are returned for further analysis [31]. For better results, we considered the residues at a 12 Å radius centered on the active ligand as flexible. The conformation of the OP/P=S and OP/P=O compounds was selected using their highest degree of spatial similarity

to the active ligand. The human cytochrome P450 underwent an active site activation process before using the MVD program. For this, the Discovery Studio program [32] was used to build the active species from the original structure obtained in the PDB [27].

The most stable conformation of the OP/P=S compounds in the human cytochrome P450 active site and of the OP/P=S and OP/P=O compounds in the HssAChE active site were selected for the QM/MM calculations.

## 2.2 QM/MM Calculations

Large systems, such as proteins, cannot be treated exclusively by QM methods with high electronic correlation due to high computational demands. Thus, in this work, we used the QM/MM approach, which combines quantum mechanics (QM) with molecular mechanics (MM) techniques to study the oxidative biotransformation reaction of organophosphothioates (OP/P=S) compounds in the human cytochrome P450 active site and the human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme inhibition by OP/P=S and organophosphates (OP/P=O) compounds. In an attempt to obtain more accurate results and evaluate electronic effects, QM calculations were performed at the density functional theory (DFT) level with the Gaussian 09 package [25, 33]. DFT methods have been widespread, showing good performance for large systems such as biomolecules [25, 33, 34].

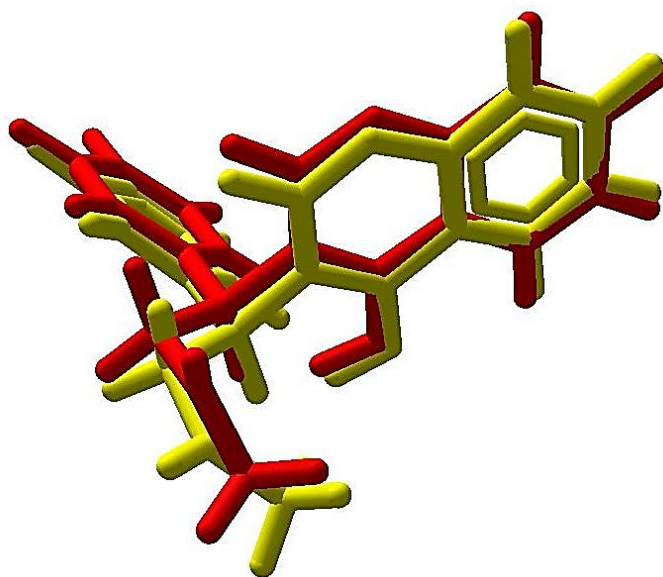
The calculations were performed based on the generalized gradient approximation [29, 36]. The final geometries were obtained using DFT, Becke's three-parameter method and Lee, Yang and Paar's gradient-corrected functional (B3LYP) [24], with 6-31G (d, p) basis set. The QM system of oxidative biotransformation consisted of the HEME group of the cytochrome P450 enzyme, OP/P=S and amino acid residues within a radius of 5 Å, while the QM systems of HssAChE enzymatic inhibition consisted of Ser203 of the catalytic triad, OP/P=S or OP/P=O and amino acid residues within a radius of 5 Å. These systems were considered within a sphere of 5 Å in the active site. This radius covers a region capable of simulating the mechanism pathway with the essential species that directly participate in the reaction.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Docking study between OP/P=S compounds and cytochrome P450

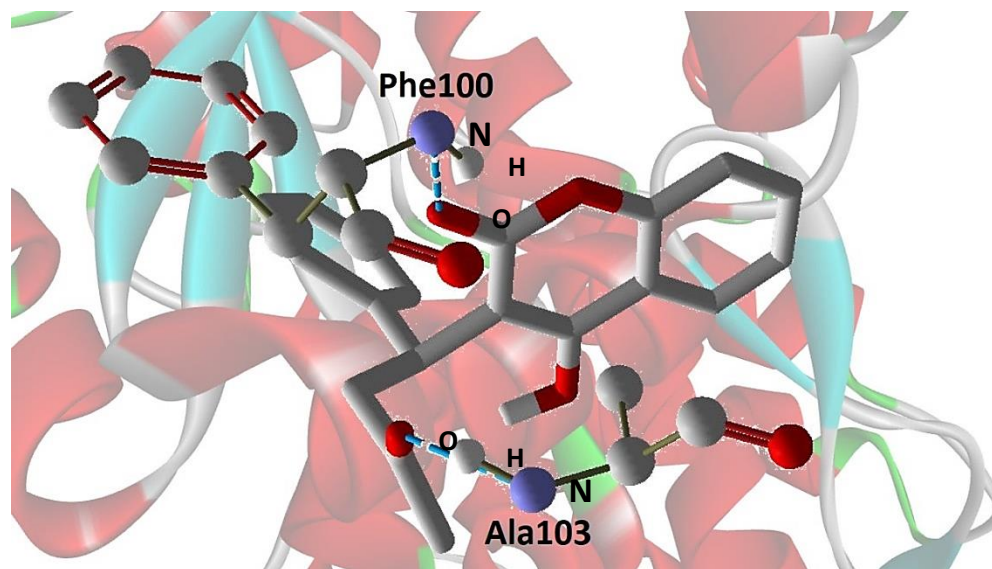
The cytochrome P450 binding site was generated in the Molegro Virtual Docker (MVD) program [26], using a cavity prediction algorithm based on a three-dimensional box, with a cavity volume of 640 Å.

Fig. 6 shows the result of re-docking for the structure of the warfarin inhibitor (active ligand) at the cytochrome P450 active site. It is important to notice that the RMSD (Root Mean Square Deviation) for the overlap was 0.563 Å. According to the literature, an RMSD value lower than 2.00 Å is considered satisfactory [37, 38], thus validating the theoretical methodology used for the molecular docking calculations.



**Fig. (6).** Re-docking of the warfarin inhibitor within cytochrome P450. Crystal structure is shown in yellow and re-docking conformation in red. For better visualization, the protein was omitted. Source: MVD Program.

The intermolecular interaction energy obtained in the re-docking was  $-141.52 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The active ligand presented two hydrogen bonds with amino acid residues in the active site (Fig. 7), being one interaction with the Ala103 residue, which occurred between NH of the amino acid and the oxygen of the active ligand and one interaction with the Phe100 residue, which occurred between NH of the amino acid and the oxygen of the active ligand.



**Fig. (7).** Hydrogen bonds (blue dashed) between the active ligand and the active site residues. Source: MVD Program.

Once the molecular docking method was validated, the organophosphothioates (OP/P=S) compounds shown in Table 1 were docked into the human cytochrome P450 active site. The intermolecular interactions, such as the ligand-protein hydrogen bonds, were calculated to understand the variations between the interaction modes of the compounds in the enzyme active site, and to verify the factors that are responsible for the compound's activity.

**Table 1.** Intermolecular interaction energy values (kcal mol<sup>-1</sup>) and hydrogen bond (kcal mol<sup>-1</sup>) between the human cytochrome P450 and the OP/P=S compounds obtained from molecular docking.

	P=S Bond	
	Interaction Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	Hydrogen Bond Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
Paration	-102.93	0.00
Malathion	-100.72	-5.00
Diazinon	-97.11	-2.50
Chlorpyrifos	-94.19	-1.83
Dimethoate	-68.95	-0.35

As can be seen in Table 1, parathion was the compound that thermodynamically presented a more stabilizing value of intermolecular interaction energy (-102.93 kcal mol<sup>-1</sup>), that is, it has a greater interaction within the human cytochrome P450 active site. Such

interaction occurred between the oxygen of the active ligand and the phosphorus of the OP/P=S. Another important aspect analyzed in the molecular docking study was the hydrogen bonds that each compound performed within the enzyme. Thus, it became easier to visualize which amino acid residues are interacting more strongly with the OP/P=S pesticides considered in the present work. Regarding the hydrogen bonds, the parathion showed no hydrogen bond with the amino acid residues in the enzyme active site.

The second compound with the best interaction energy is malathion, with an energy value of  $-100.72 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The energy difference from malathion to parathion was  $2.21 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Malathion showed two hydrogen bonds with the amino acid residues in the active site. One with the Ser209 residue and one with Thr301. The third compound with the most stabilizing energy is diazinon, with an energy value of  $-97.11 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The energy difference between diazinon and malathion was  $3.61 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Diazinon showed a hydrogen bond with the Thr301 residue. The fourth most stable compound is chlorpyrifos, which presented an energy value of  $-94.19 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The energy difference between chlorpyrifos and diazinon was  $2.92 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Chlorpyrifos had one hydrogen bond with the Thr301 residue. Finally, dimethoate had an energy value of  $-68.95 \text{ kcal mol}^{-1}$ , that is, the least stable compound in relation to the others. A greater energy difference occurred between dimethoate and chlorpyrifos, being this difference equal to  $25.24 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dimethoate did not show any hydrogen bond interactions.

When parathion is absorbed by the human organism, it undergoes oxidative biotransformation, originating the active metabolite called paraoxon, which is the most potent inhibitor of the human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme, due to its high toxicity [39, 40].

There are few works in the literature that investigated the oxidative biotransformation of OP/P=S pesticides, and this work shows the interaction modes of these pesticides in the human cytochrome P450 enzyme. According to the National Library of Medicine [41], all pesticides studied in this work already have their active metabolites (oxon form), showing that OP/P=S compounds undergo oxidative biotransformation. With the molecular docking studies for the OP/P=S compounds, it was possible to observe that among the compounds investigated, parathion is the one that had the greatest stability in the active site of the human cytochrome P450 enzyme, that is, this result suggests that this compound presents a more favorable conformation for the oxidative biotransformation process to occur, wherein the P=S bond is transformed into a P=O bond.

### 3.2 QM/MM study between OP/P=S compounds and cytochrome P450 enzyme

Hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) is an efficient simulation method due to its performance, which combines the strengths of *ab initio* QM (accuracy) and MM (speed) calculations, allowing for the study of chemical processes in solution and in proteins [42]. In the quantum system, during the simulation, calculations of electronic structure, energy and their derivatives are performed.

The reaction mechanism is evaluated through the most important factor for the reaction to occur, the activation energy. Activation energy is the minimum energy required for the reactants to start a chemical reaction [43]. Table 2 presents the values of relative activation energies ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for the organophosphothioates (OP/P=S) in the active site of the human cytochrome P450 enzyme.

**Table 2.** Values of the relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for the OP/P=S in the active site of the human cytochrome P450 enzyme.

Compounds	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
Chlorpyrifos	0.00
Paration	7.20
Dimethoate	9.15
Diazinon	11.50
Malathion	11.51

The results of the reaction mechanism of the oxidative biotransformation of the human cytochrome P450 enzyme by OP/P=S (Table 2) show that chlorpyrifos was the compound that presented a lower relative activation energy, that is, the reaction intermediates are better stabilized.

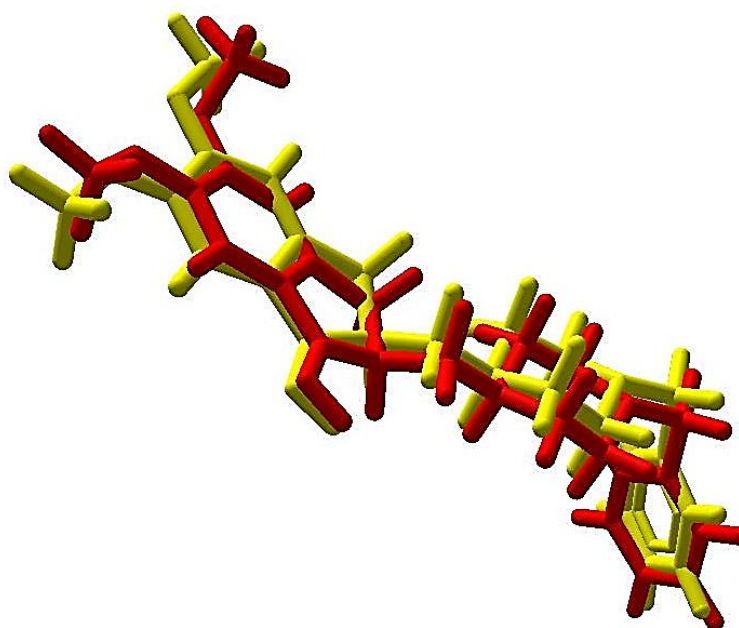
Parathion showed a greater relative activation energy compared to chlorpyrifos, with a value of 7.20 kcal mol<sup>-1</sup>. Thus, parathion was the second compound with the lowest relative activation energy. Dimethoate, on the other hand, presented a lower relative activation energy of 1.95 kcal mol<sup>-1</sup> in relation to parathion, with dimethoate being the third compound with the lowest relative activation energy (9.15 kcal mol<sup>-1</sup>). Diazinon showed a lower relative activation energy of 2.35 kcal mol<sup>-1</sup> in relation to dimethoate. Diazinon was the fourth compound with the lowest relative activation energy (11.50 kcal mol<sup>-1</sup>). In turn, malathion showed a minimum difference in relative activation energy in relation to diazinon, being the discrete value of 0.01



kcal mol<sup>-1</sup>. Malathion was the compound that had the highest relative activation energy (11.51 kcal mol<sup>-1</sup>) in comparison with the other compounds. This suggests that malathion is less stabilized in the human cytochrome P450 active site, disfavoring the oxidative biotransformation reaction.

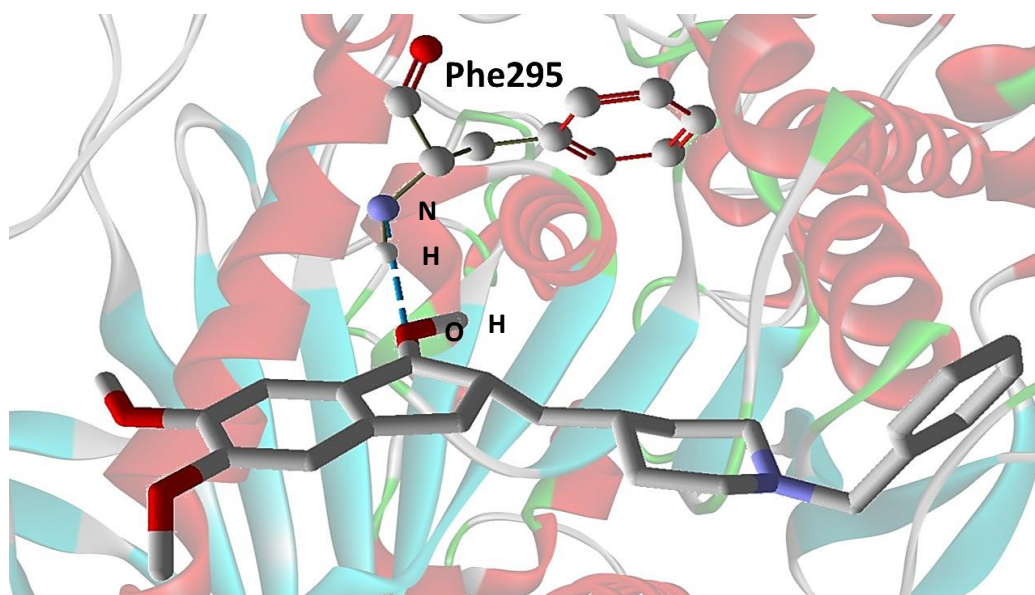
### 3.3 Docking study between the compounds OP/P=S and OP/P=O and the HssAChE enzyme

The human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme binding site was also generated in the Molegro Virtual Docker (MVD) program [26], using a cavity prediction algorithm based on a three-dimensional box, with a cavity volume of 182.27 Å. Re-docking calculations were performed (Fig. 8) for the donepezil inhibitor within the HssAChE active site. The RMSD (Root Mean Square Deviation) for the overlap was 0.627 Å, and this value is less than 2.00 Å, being considered satisfactory according to the literature [37, 38]. The intermolecular interaction energy obtained in the re-docking technique was -180.91 kcal mol<sup>-1</sup>.



**Fig. (8).** Re-docking of the donepezil inhibitor within the HssAChE active site. Crystal structure is shown in yellow and re-docking conformation in red. For better visualization, the protein was omitted. Source: MVD Program.

Regarding the hydrogen bonds (Fig. 9) that the active ligand performed, there was one interaction with the Phe295 residue. This interaction occurred between NH of the amino acid and the hydroxyl group of the active ligand.



**Fig. (9).** Hydrogen bond (blue dashed) between the active ligand and the active site residue.  
Source: MVD Program.

Once the docking method was validated, the organophosphothioates (OP/P=S) and organophosphates (OP/P=O) compounds were docked at the HssAChE active site. We know that the active metabolites are OP/P=O compounds; however, studies with OP/P=S in the literature are scarce. Addition, according to the National Library of Medicine [41], OP/P=S compounds can interact at the HssAChE active site. In this aspect, theoretical chemistry contributes significantly to a better understanding, at the molecular level, of the OP/P=S behavior, and this study is essential from a pharmacokinetic point of view [4]. For this purpose, docking calculations were performed for the OP/P=S and their active metabolites OP/P=O, in order to compare the interaction modes of these compounds with HssAChE.

The OP/P=S compounds shown in Table 3 were docked into the HssAChE active site. The intermolecular interaction and ligand-protein hydrogen bond energies were calculated to understand the variations between the interaction modes of the compounds in the enzyme active site, so that it is possible to verify the factors that are responsible for the activity of the compounds.

Table 3. Intermolecular interaction energy values (kcal mol<sup>-1</sup>) and hydrogen bond (kcal mol<sup>-1</sup>) between the HssAChE enzyme and the OP/P=S compounds obtained from molecular docking.

P=S Bond		
	Intermolecular Interaction Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	Hydrogen Bond Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
Paration	-133.41	-6.79
Malathion	-128.02	-7.50
Diazinon	-124.08	-3.02
Chlorpyrifos	-116.99	-3.07
Dimethoate	-84.15	-2.01

As can be seen in Table 3, the interaction energy is in decreasing order of stability, and from the compounds studied, parathion presented a more stable value of intermolecular interaction energy (-133.41 kcal mol<sup>-1</sup>), that is, it has a greater interaction within the HssAChE active site. Parathion showed three hydrogen bonds with the amino acid residues of the enzyme active site, being one interaction with the Glu202 residue, which occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the nitrogen of parathion; one interaction with the Tyr133 residue, which occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the nitrogen of parathion; and one interaction with the Gly120 residue, being this interaction between NH of the amino acid and the oxygen of parathion.

The second compound with the best interaction energy is malathion, with an energy value of -128.02 kcal mol<sup>-1</sup>. Malathion compared with parathion had an intermolecular interaction energy difference of 5.39 kcal mol<sup>-1</sup>. Malathion showed three hydrogen bond interactions with the amino acid residues of the active site, being one interaction with Tyr337, one interaction with Tyr341 and one interaction with Tyr124. The third most stable compound is diazinon, with an interaction energy value of -124.08 kcal mol<sup>-1</sup>. The intermolecular interaction energy difference between diazinon and malathion was 3.94 kcal mol<sup>-1</sup>. Diazinon showed two hydrogen bond interactions with amino acid residues, being one interaction with Tyr337 and one interaction with Tyr341. The fourth most stable compound is chlorpyrifos, which presented an interaction energy value of -116.99 kcal mol<sup>-1</sup>. The intermolecular interaction energy difference between chlorpyrifos and diazinon was 7.09 kcal mol<sup>-1</sup>. Chlorpyrifos had two hydrogen bond interactions, being one interaction with Glu202 and one interaction with Gly121. Finally, dimethoate presented an interaction energy value of -84.15

kcal mol<sup>-1</sup>, showing to present the least stabilizing interaction. The greatest intermolecular interaction energy difference was between dimethoate and chlorpyrifos, with a value of 32.84 kcal mol<sup>-1</sup>. The dimethoate showed a hydrogen bond with the Ser203 residue.

As mentioned previously, according to the National Library of Medicine [41], OP/P=S can also be HssAChE inhibitors. Based on the results obtained, regarding the OP/P=S compounds studied, parathion was the one with the highest inhibitory activity of the HssAChE enzyme, which is due to its high toxicity in relation to the other compounds.

In this work, the way in which OP/P=O compounds interact in the HssAChE active site was also investigated. This study will raise perspectives to help understand the inhibition process of the HssAChE enzyme from a pharmacodynamic point of view [4]. Table 4 shows the values of intermolecular interaction energy and hydrogen bond obtained from the molecular docking calculations between the OP/P=O compounds and HssAChE.

Table 4. Values of the intermolecular interaction energy (kcal mol<sup>-1</sup>) and hydrogen bond (kcal mol<sup>-1</sup>) between the HssAChE enzyme and the OP/P=O compounds obtained from molecular docking.

P=O Bond		
	Intermolecular Interaction Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	Hydrogen Bond Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
Paraoxon	-129.74	-12.47
Diazoxon	-128.30	-4.30
Malaoxon	-121.11	-6.71
Chlorpyrifos oxon	-115.46	-2.62
Omethoate	-87.69	-11.43

As we can see in Table 4, the interaction energy is also in decreasing order of stability, and regarding the compounds analyzed, paraoxon presented a more stable value of intermolecular interaction energy within the HssAChE active site.

Concerning the hydrogen bonds, paraoxon showed six hydrogen bond interactions with amino acid residues in the enzyme active site, being one interaction with the Ser203 residue, which occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the oxygen of paraoxon; one interaction with Tyr124, which also occurred between the hydroxyl group of the amino acid and

the oxygen of paraoxon; two interactions with Tyr341, in which the first one occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the oxygen of paraoxon, and the second one occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the nitrogen of paraoxon; and two interactions with the Tyr337 residue, in which the first one occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the oxygen of paraoxon, and the second one occurred between the hydroxyl group of the amino acid and the nitrogen of paraoxon.

The second compound with the best interaction energy is diazoxon, with an interaction energy value of  $-128.30 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The intermolecular interaction energy difference between diazoxon and paraoxon was  $1.44 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Diazoxon showed two hydrogen bond interactions with amino acid residues in the enzyme active site, being one interaction with the Glu202 residue and one interaction with Tyr341. The third most stable compound is malaoxon, with an interaction energy value of  $-121.11 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The intermolecular interaction energy difference between malaoxon and diazoxon was  $7.19 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Malaoxon showed seven hydrogen bond interactions with amino acid residues, being one interaction with Glu202, one interaction with Gly121, two interactions with Ser203, one interaction with Ser125, one interaction with Tyr337 and one interaction with Tyr124. The fourth most stable compound was chlorpyrifos oxon, which presented an interaction energy value of  $-115.46 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The intermolecular interaction energy difference between chlorpyrifos oxon and malaoxon was  $5.65 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Chlorpyrifos oxon had a hydrogen bond interaction with the Glu202 residue. The least stable compound was omethoate, which presented an interaction energy value of  $-87.69 \text{ kcal mol}^{-1}$ , showing to be the least stable compound among them. The greatest difference in intermolecular interaction energy occurred between omethoate and chlorpyrifos oxon, whose difference was of  $27.77 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Omethoate showed seven hydrogen bond interactions, being one interaction with the Glu202 residue, two interactions with Gly121, one interaction with Gly122, one interaction with His447 and one interaction with Ser203.

Table 5 shows the experimental  $LD_{50}$  values for the OP/P=O compounds in the HssAChE enzyme, according to the IPCS INCHEM home page, whose website link is shown next [44].

**Table 5.** Experimental LD<sub>50</sub> values for the HssAChE enzyme.

P=O Bond	
	Experimental LD <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
Paraoxon	13
Chlorpyrifos oxon	135
Omethoate	150
Diazoxon	300
Malaoxon	2100

Source: IPCS INCHEM.

The LD<sub>50</sub> is often used as an indicator of the acute toxicity of a substance. It indicates the amount of active ingredient in pesticides needed to kill 50% of tested animals. Note that the lower the LD<sub>50</sub> value, the more toxic the substance is [45].

According to the experimental LD<sub>50</sub> values, paraoxon is the most toxic compound and is classified as extremely dangerous [44]. When comparing the docking results with the LD<sub>50</sub> experimental results, we can observe that paraoxon is the most stable and toxic compound and has a greater inhibitory activity for the HssAChE enzyme, thus validating the calculation methods used in this work.

Table 6 shows a comparison between the docking results of OP/P=S and OP/P=O compounds. We can observe that all compounds with P=S and P=O bonds, that is, parathion, malathion, diazoxon, chlorpyrifos and omethoate, were the compounds that presented the most stable interaction energies, and therefore, they are the ones with the highest toxicity and consequently possess greater ability to inhibit the HssAChE enzyme. The greater stability of some OP/P=O compounds in the enzyme active site can also be explained by the fact that oxygen increases the number of hydrogen bonds in the active site. These results suggest that not all OP/P=O compounds are more toxic than OP/P=S compounds. Furthermore, these results show that OP/P=S compounds are also capable of inhibiting the HssAChE enzyme.

**Table 6.** Values of the intermolecular interaction energy (kcal mol<sup>-1</sup>) between the HssAChE enzyme and the OP/P=S and OP/P=O compounds obtained from molecular docking.

P=S	Intermolecular Interaction Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	P=O	Intermolecular Interaction Energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
Paration	-133.41	Paraoxon	-129.74
Malathion	-128.02	Malaoxon	-121.11
Diazinon	-124.08	Diazoxon	-128.30
Chlorpyrifos	-116.99	Chlorpyrifos oxon	-115.46
Dimethoate	-84.15	Omethoate	-87.69

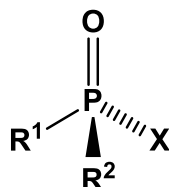
### 3.4 QM/MM study between the OP/P=S and OP/P=O compounds and the HssAChE enzyme

The reaction mechanism of organophosphothioates (OP/P=S) and organophosphates (OP/P=O) with the human acetylcholinesterase (HssAChE) enzyme was also evaluated, that is, the minimum energy necessary for the reaction to have caused between them. Table 7 presents the values of relative activation energies ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for the OP/P=S compounds and for the OP/P=O compounds in the HssAChE active site.

**Table 7.** Values of the relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) for OP/P=S and OP/P=O in the active site of the HssAChE enzyme.

Compounds	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
Malathion(OP/P=S)	0.00
Malaoxon (OP/P=O)	41.42
Paraoxon (OP/P=O)	42.04
Diazoxon (OP/P=O)	42.67
Chlorpyrifos (OP/P=S)	42.67
Chlorpyrifos oxon (OP/P=O)	43.92
Omethoate (OP/P=O)	45.18
Dimethoate (OP/P=S)	46.43
Paration (OP/P=S)	65.89
Diazinon (OP/P=S)	77.81

Some parameters to explain the results obtained in the HssAChE inhibition reaction by OP/P=S and OP/P=O may be due to the size of the substrate substituents represented by R1 and R2, due to the leaving group represented by X and due to the difference in reactivity between the OP/P=S and OP/P=O (Fig. 10).



**Fig. (10).** General structure of OP/P=O compounds. Source: Adapted from Stoddart (1979).

Regarding the heights of the activation barrier, that is, the relative activation energy ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) of the HssAChE inhibition reaction by the OP/P=S compounds, malathion presented the lowest activation energy, that is, the most stabilizing energy for the HssAChE inhibition reaction to take place. This trend can be explained by the fact that the substituents of this inhibitor are smaller than the substituents of chlorpyrifos, parathion and diazinon. Note that, although dimethoate has smaller substituents compared to chlorpyrifos, this compound presents a higher energetic barrier, and this fact can be explained by the structural differences of the leaving groups.

The results of the inhibition reaction mechanism of the HssAChE enzyme by the OP/P=O ligands show that, from the analyzed compounds, malaoxon was the one that obtained the most favorable activation energy for the reaction to take place. This trend can be explained due to the fact of its substituents being less bulky compared to paraoxon, diazoxon and chlorpyrifos oxon. Omethoate has minor substituents, but its high energetic barrier can be explained by the structural difference in the leaving groups.

Malathion showed the lowest relative activation energy. In addition, malaoxon presented a greater relative activation energy difference compared to malathion, with an energy value of 41.42 kcal mol<sup>-1</sup>. In this study, malaoxon was the second compound with the lowest relative activation energy. On the other hand, paraoxon presented a relative activation energy difference of 0.62 kcal mol<sup>-1</sup> compared to malaoxon, thus being paraoxon the third compound with the lowest relative activation energy (42.04 kcal mol<sup>-1</sup>). Diazoxon showed a relative activation energy difference of 0.63 kcal mol<sup>-1</sup> compared to paraoxon. It is interesting to notice that



diazoxon has the same value of relative activation energy as chlorpyrifos ( $42.67 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Chlorpyrifos oxon showed a relative activation energy difference of  $1.25 \text{ kcal mol}^{-1}$  compared to diazoxon and chlorpyrifos. Regarding chlorpyrifos oxon, this was the sixth compound with the lowest relative activation energy ( $43.92 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Omethoate showed a relative activation energy difference of  $1.26 \text{ kcal mol}^{-1}$  compared to chlorpyrifos oxon. We can realize that omethoate was the fourth compound with the highest relative activation energy ( $45.18 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Dimethoate showed a relative activation energy difference of  $1.25 \text{ kcal mol}^{-1}$  compared to omethoate. Dimethoate was also the third compound with the highest relative activation energy ( $46.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Now about parathion, this pesticide showed a relative activation energy difference of  $19.46 \text{ kcal mol}^{-1}$  compared to dimethoate. Parathion was the second compound with the highest relative activation energy ( $65.89 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Diazinon showed a relative activation energy difference of  $11.92 \text{ kcal mol}^{-1}$  compared to parathion. At last, diazinon was the compound with the highest relative activation energy ( $77.81 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

Comparing the values of the relative activation energies of the OP/P=S and OP/P=O compounds (Table 7), we can observe that the compounds that have the lowest relative activation energy are malathion, paraoxon, diazoxon, chlorpyrifos and omethoate. Among these compounds, malathion has the lowest activation energy, the lowest energy barrier, the fastest the reaction occurs and the highest inhibitory activity. The reactivity of some OP/P=O can be explained by the electronegativity difference between oxygen and sulfur, because the more electronegative, the greater reactivity. The greater reactivity of some OP/P=S in the active site of the enzyme can be explained by the fact that the structures of OP/P=O have a certain rigidity in the chemical bonds in relation to OP/P=S, expending a greater energy to reach the transition state.

## CONCLUSION

With the study of the oxidative biotransformation of OP/P=S, parathion was the compound that has the greatest interaction with the human cytochrome P450 enzyme, that is, the greatest ability to undergo oxidative biotransformation among the compounds studied. In the reaction mechanism, chlorpyrifos is the compound that has the lowest activation energy, and therefore, the highest reaction rate. As the process of oxidative biotransformation has been little explored in the literature, this study was necessary to identify which of the compounds studied are more prone to oxidation. Regarding the study of the interaction of pesticides in the active site of the HssAChE enzyme, it was possible to observe that for the enzymatic inhibition,

not all OP/P=O presented more stable energy values of intermolecular interactions than the compounds OP/P=S at the active site of the HssAChE enzyme. Of the compounds OP/P=S and OP/P=O studied in molecular anchoring, parathion showed the greatest stability, showing a good interaction with the active site of the HssAChE enzyme. Parathion was the one that was better positioned inside the active site, it is the compound with the highest degree of toxicity and that easily inhibits the HssAChE enzyme. The active metabolite of parathion, paraoxon, showed great stability, in agreement with the experimental results. Regarding the reaction mechanism of the inhibition of the HssAChE enzyme, of the compound OP/P=S, malathion has the lowest activation energy and of the compounds, OP/P=O, malaoxon has the lowest energy barrier. Comparing the OP/P=S with the OP/P=O, malathion is the compound with the lowest activation energy, the lowest energy barrier, and consequently, has a higher reaction rate. Regarding the docking and reaction mechanism studies, the compounds with the greatest inhibitory capacity are parathion, paraoxon, malathion, diazoxon, chlorpyrifos and omethoate. This study is of paramount relevance, as there are few reports in the literature on oxidative biotransformation, showing which pesticides have the greatest ability to transform from OP/P=S to OP/P=O. And there are still few studies on the inhibition of the HssAChE enzyme by the OP/P=S compounds, because what is known is that the OP/P=O are the most effective inhibitors of the HssAChE enzyme. With this study, at the molecular level, it was possible to observe that OP/P=S can also inhibit the HssAChE enzyme.

#### **LIST OF ABBREVIATIONS**

OP/P=S	=	Organophosphothioates
OP/P=O	=	Organophosphates
HssAChE	=	Human acetylcholinesterase
Ach	=	Acetylcholine
Ch	=	Choline

#### **CONSENT FOR PUBLICATION**

Not applicable.

#### **AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS**

Cytochrome P450 and HssAChE enzymes were taken from the Database under the access code 1OG5 and 4EY7, respectively. (<https://www.rcsb.org/>).

## FUNDING

This work was supported by research fundings received from FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais). We thank the Federal University of Lavras (UFLA) for their support. The authors are grateful to all of them.

## REFERENCES

- [1] Nascimento, L.; Melnyk, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. *Revista Mangaio Acadêmico*, **2016**, 1 (1), 2525-2801.
- [2] Bello-Ramirez, A.M.; Carreon-Garabito, B.Y.; Nava-Ocampo, A. A. A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides. *Toxicology*, **2000**, 149 (2–3), 63–68.
- [3] Dikshit, P. C. Textbook of Forensic Medicine and Toxicology. 2nd Edition. New Delhi: Pee Pee Publishers, **2007**.
- [4] Araújo, C. R. M.; Santos, V. L. dos A.; Gonsalves, A. A. Acetilcolinesterase- AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*, **2016**, 8 (6), 1818-1834.
- [5] Ecobichon, D. J. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill*, **2001**, 6, 763– 810.
- [6] Taylor, P. Anticholinesterase agents. In Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman, J.G., Limbird, L.E., and Gilman, A.G., Eds), *McGraw-Hill*, **2001**, 175-192.
- [7] Cocker, J.; Mason, H.J.; Garfitt, S.J.; Jones, K. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters*, **2002**, 134, 97-103.
- [8] Costa, L.G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, **2006**, 366, 1 – 13.
- [9] Buratti, F.M.; Testai, E. Evidence for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver. *Toxicology*, **2007**, 241 (1-2), 33-46.
- [10] Bibi, Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism*, **2008**, 5(1), 1-10.
- [11] Guengerich, F. P. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *The FASEB Journal*, **1992**, 6(2), 745-8.
- [12] Lemos, A. J. G.; Trindade, E. J. Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos P450. *Revista Científica do ITPAC*, **2014**, 7(2).
- [13] Santiago, L. M. A metabolização no sistema do citocromo P450 e a sua importância em clínica geral. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, **2003**, 19, 121-129.

- [14] Hernandez, J., Robledo, N.R., Velasco, L., Quintero, R., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **1998**, 61, 87–94.
- [15] Albuquerque, E.X.; Pereira, E.F.R.; Aracava, Y.; Fawcett, W.P.; Oliveira, M.; Randall, W.R.; Hamilton, T.A.; Kan, R.K.; Romano, J.A.; Jr; Adler, M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2006**, 103, 13220.
- [16] Giacoppo, J. O. S.; Lima, W. E. A.; Kamil, K.; França, T. C. C.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C. Guerra química: perspectivas no estudo de reativadores da enzima acetilcolinesterase inibida por organofosforados. *Revista Virtual de Química*, **2014**, 6 (3), 653-670.
- [17] Patocka, J.; Cabal, J.; Kuca, K.; Jun, D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine*, **2005**, 3, 91.
- [18] 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 trigonal bipyramidal transition state. *Biochemistry*, **2007**, 46, 4815.
- [19] Soreq, H.; Ben-Aziz, R.; Prody, C.A.; Seidman, S.; Gnat, A.; Neville, L.; LiemanHurwitz, J.; Lev-Lehman, E.; Ginzberg, D.; Lipidot-Lifson, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **1990**, 87, 9688.
- [20] Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, **2010**, 187(1-3), 10-22.
- [21] Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature*, **2001**, 2, 294-302.
- [22] Dos Santos, V. M. R; Donnici, C. L.; Da Costa, J. B. N; Caixeiro, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, **2007**, 30(1), 159-170.
- [23] FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09. Wallingford CT: Gaussian Inc, **2004**.
- [24] Da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; Reynolds, R. C. Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with Mycobacterium tuberculosis and human dihydrofolate reductases. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **2008**, 25(4), 377–385.
- [25] De Castro, A. A.; Soares, F. V.; Pereira, A. F.; Silva, T. C.; Silva, D. R.; Mancini, D. T.; Caetano, M. S.; Da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C. Asymmetric biodegradation of the nerve agents Sarin and VX by human dUTPase: Chemometrics, Molecular Docking and Hybrid QM/MM calculations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **2019**, 37(8), 2154-2164.
- [26] Thomsen, r.; Christensen, M. H. *MolDock*: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49(11), 3315-3332.
- [27] BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 28, n. 1, p. 235-242, Jan. 2000.
- [28] Da Cunha, E. F. F.; Barbosa, E. F.; Oliveira, A. A.; Ramalho, T. C. Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **2010**, 27(5), 619–625.
- [29] Da Cunha, E. F. F.; Mancini, D. T.; Ramalho, T. C. Molecular modeling of the Toxoplasma gondii adenosine kinase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, **2012**, 21, 590-600.
- [30] Ramalho, T. C.; Caetano, M. S.; Da Cunha, E. F. F.; Souza, T. C. S.; Rocha, M. V. J. Construction and Assessment of Reaction Models of Class I EPSP Synthase: Molecular

Docking and Density Functional Theoretical Calculations. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **2009**, 27(2), 195–207.

[31] Mancini, D. T. Estudos Computacionais de Potenciais Inibidores da Enzima Nucleosídeo Hidrolase de *Brucella Suis*. 2011. 155 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, **2011**. Disponível em: [http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1912/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Estudos%20computacionais%20de%20potenciais%20inibidores%20da%20enzima%20nucleos%C3%ADdeo%20hidrolase%20de%20Brucella%20suis.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1912/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Estudos%20computacionais%20de%20potenciais%20inibidores%20da%20enzima%20nucleos%C3%ADdeo%20hidrolase%20de%20Brucella%20suis.pdf). Acesso em 20 de maio de 2022.

[32] Accelrys Software. Discovery Studio Modeling Environment. **2012**.

[33] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G.A.; Ayala, P.Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.

[34] Besler, B. H.; Merz, K. M.; Kollman, P. A. Atomic charges derived from semiempirical methods. *Journal of Computational Chemistry*, **1990**, 11(4), 431–439.

[35] Singh, U. C., Kollman, P. A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, **1984**, 5(2), 129–145.

[36] Gustin, D. J.; Mattei, P.; Kast, P.; Wiest, O.; Lee, L.; Cleland, W. W.; Hilvert, D. Heavy atom isotope effects reveal a highly polarized transition state for chorismate mutase. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121(8), 1756–1757.

[37] Guimarães, A. P. Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de *Bacillus anthracis*. 2010. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, **2010**. Disponível em: [http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1866/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Estudos%20por%20ancoramento%20e%20din%C3%A2mica%20molecular%20de%20potenciais%20inibidores%20da%20Nucleos%C3%ADdeo%20Hidrolase%20de%20Bacillus%20anthracis.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1866/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Estudos%20por%20ancoramento%20e%20din%C3%A2mica%20molecular%20de%20potenciais%20inibidores%20da%20Nucleos%C3%ADdeo%20Hidrolase%20de%20Bacillus%20anthracis.pdf). Acesso em: 14 de abril de 2022.

[38] Warren D. K.; Guth, R. M.; Coopersmith, C. M.; Merz, L. R.; Zack, J. E.; Fraser, V. J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a surgical intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **2006**, 27(10), 1137-1139.

[39] Deshpande, L. S.; Carter, D. S.; Phillips, K. F.; Blair, R. E.; De Lorenzo, R. J. Development of status epilepticus, sustained calcium elevations and neuronal injury in a rat survival model of lethal paraoxon intoxication. *Neurotoxicology*, **2014**, 44, 17-26.

[40] Deshpande, L. S.; Phillips, K.; Huang, B.; De Lorenzo, R. J. Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. *Neurotoxicology*, **2014**, 44, 352-357.

[41] PubChem. National Library of Medicine. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > . Accessed on: May 30, 2022.

[42] Borman, S.A. Much to do about enzyme mechanism. *Chemical and Engineering News*, **2004**, 8, 35-39.

[43] Lima, L. S. Energia de ativação. *Revista de Ciência Elementar*, **2015**, 3(2), 035.

[44] IPCS INCHEM. Available at: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg001.htm#PartTitle:1.%20%20NAME> >. Accessed on August 13, 2022.

[45] Moreira, E. L. T.; Sales, L. A.; Bautista, A. R. P. L. Avaliação da toxicidade aguda (DL50): proposta para harmonização dos protocolos adotados no Brasil. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **1993**, 3(3).