



Daniel Angelo Polisel

***In Silico* Study on the Influence of Isomeric Oximes for
Reactivation of Organophosphorus-Inhibited AChE**

LAVRAS – MG

2018

DANIEL ANGELO POLISEL

***In Silico* Study on the Influence of Isomeric Oximes for Reactivation of
Organophosphorus-Inhibited AChE**

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 obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Orientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Polisel, Daniel Angelo.

In Silico Study on the Influence of Isomeric Oximes for
Reactivation of Organophosphorus-Inhibited AChE / Daniel Angelo
Polisel. - 2018.

68 p. : il.

Orientador(a): Elaine Fontes Ferreira da Cunha.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Química Computacional. 2. Oximas. 3. Reativação da AChE.
I. Cunha, Elaine Fontes Ferreira da. . II. Título.

DANIEL ANGELO POLISEL

***In Silico* Study on the Influence of Isomeric Oximes for Reactivation of
Organophosphorus-Inhibited AChE**

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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 08 de maio de 2018.
Dr. Teodorico de Castro Ramalho UFPA
Dr. Daniel Henrique Soares Leal UFES
Dr. Felipe de Almeida La Porta UTFPR

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

**LAVRAS - MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antonio e Aparecida, pela pelo apoio e amparo emocional em momentos de dificuldades. Ao meu irmão Rafael pelas conversas e conselhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade de realização do mestrado, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento da pesquisa e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado. À CAPES e à FAPEMIG.

Aos meus orientadores, professora Elaine Fontes Ferreira da Cunha e professor Teodorico de Castro Ramalho, pela orientação, paciência e todos os ensinamentos que me passaram.

Aos companheiros da República Manguaça, pela convivência e amizade, desde a graduação até o encerramento do mestrado.

Aos colegas de laboratório, pela amizade, colaboração em momentos de dúvidas e ideias construtivas quando necessário.

À minha namorada Tatiana, pelo carinho, apoio e compreensão durante fases boas e ruins da pós-graduação.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

Compostos organofosforados (OP) vêm sendo utilizados como armas químicas desde a década de 1930 pelos Alemães, quando pesquisavam novas substâncias pesticidas. Esses compostos têm a capacidade de inibir a enzima Acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina. Com a inibição, ocorre o acúmulo do neurotransmissor na terminação nervosa, resultando em uma crise colinérgica, que pode levar à morte. Diversas substâncias vêm sendo estudadas no intuito de reativar a atividade catalítica da AChE e dentre elas destacam-se as oximas. Oximas são uma classe de compostos que através do ataque de uma extremidade (grupo oxima) ao átomo de fósforo do inibidor, têm mostrado bons resultados no processo de reativação da AChE inibida. Até o momento, não existe um reativador universal e pequenas alterações estruturais nas oximas resultam em diferentes resultados experimentais. Com isso, o objetivo desse estudo é a comparação de duas oximas isômeras, K203 e K206, cuja diferença é a posição do grupo carbamoil no anél piridínico (posições 4 e 3 para a K203 e K206, respectivamente). Para isso, cálculos teóricos de ancoramento molecular e cálculos QM/MM de mecanismo de reação foram realizados. Os resultados mostraram que a pequena diferença de cadeia entre as oximas gera diferentes taxas de reativação frente aos diferentes inibidores estudados, além de influenciar significativamente na energia de interação intermolecular e na barreira energética de ativação em relação à AChE inibida pelos diferentes agentes dos nervos.

Palavras-chave: K203. K206. Ancoramento molecular. Estudo de mecanismo. Agentes dos nervos.

GENERAL ABSTRACT

Organophosphorus compounds (OP) have been used as chemical weapons since the 1930s by the Germans, when researching new pesticides. These compounds have the ability to inhibit the enzyme Acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter Acetylcholine. With inhibition, neurotransmitter accumulation occurs at nerve endings, resulting in a cholinergic crisis, which can lead to death. Several substances have been studied in order to reactivate the catalytic activity of AChE, among them the oximes. Oximes are a class of compounds which, through an attack of one extremity (oxime group) to the phosphorus atom of the inhibitor, have shown good results in the reactivation process of inhibited-AChE. So far, there is no universal reactivator and small structural changes in oximes result in different experimental outcomes. Therefore, the objective of this study is to compare two isomeric oximes, K203 and K206, whose difference is the position of the carbamoyl group in the pyridinium ring (positions 4 and 3 for K203 and K206, respectively). For this, theoretical molecular docking calculations and QM/MM calculations of reaction mechanism were performed. The results showed that the slight difference between the oximes generate different reactivation rates in relation to the different inhibitors studied, as well, as significantly influence on intermolecular interaction energy and on activation barrier energy in relation to AChE inhibited by different nerve agents.

Keywords: K203. K206. Molecular docking. Mechanistic study. Nerve agents.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Armas Químicas de Guerra	11
2.2 Compostos Organofosforados	13
2.2.1 Agentes dos Nervos de Guerra	17
2.3 Acetilcolina (ACh)	20
2.4 Acetilcolinesterase (AChE)	20
2.5 Reativação da AChE	23
2.5.1 Oximas	25
2.6 Química Computacional	28
2.6.1 Modelagem Molecular	29
2.6.2 Ancoramento Molecular (<i>Docking</i>)	31
2.6.3 Métodos Quânticos	33
2.6.4 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)	34
2.6.5 Métodos Híbridos QM/MM	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	47
ARTIGO - <i>SLIGHT DIFFERENCE IN THE ISOMERIC OXIMES K206 AND K203 MAKES HUGE DIFFERENCE FOR THE REACTIVATION OF ORGANOPHOSPHORUS-INHIBITED ACHE: THEORETICAL AND EXPERIMENTAL ASPECTS</i>	47

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Armas químicas de guerra são definidas como substâncias capazes de matar, causar danos à saúde e incapacitar inimigos em situações de guerra ou operações militares. Existem relatos do uso de armas químicas desde a antiguidade, como por exemplo na China antiga, batalhas de Tróia, na guerra do Peloponeso dentre outros exemplos. Alguns exemplos da utilização dessas substâncias variam desde contaminação de suplementos de água e comida, até o envenenamento de projéteis utilizados nas batalhas (SPIERS, 2000).

As armas químicas de guerra se dividem basicamente em 5 grupos: agentes dos nervos, sanguíneos, sufocantes, urticantes e vesicantes. Dentre eles destaca-se o grupo dos agentes dos nervos de guerra, cujos componentes são os compostos organofosforados (OP), basicamente ésteres de ácidos com Fósforo. Esses compostos foram descobertos entre a Primeira e Segunda Guerra Mundial, na década de 1930, com resultados de pesquisa para o desenvolvimento de pesticidas (CHAUHAN et al., 2008).

Os agentes dos nervos de guerra agem inibindo a enzima Acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina (ACh) na terminação nervosa, causando uma crise colinérgica. A inibição da AChE, conseqüentemente com a interrupção das sinapses, resulta em vários problemas ao organismo, tais como perda da coordenação das contrações musculares, náusea, diarreia, vômito, cólicas intestinais e crises respiratórias (SMART, 1997).

Devido à rápida ação dos agentes dos nervos de guerra, o tratamento deve ser iniciado rapidamente. Um dos tratamentos contemporâneos consiste na aplicação de um antagonista, como por exemplo a Atropina, juntamente com a ministração de oximas. As oximas são uma classe de compostos químicos capazes de realizar um ataque nucleofílico ao Fósforo dos OPs, num processo chamado de reativação, no qual a AChE inibida é recuperada (WOREK et al., 2004).

A classe das oximas é muito grande, podendo ter uma grande gama de estruturas, por exemplo mono-piridínicas, biperidínicas, sem anéis piridínicos, dentre outras variações estruturais. Com isso surgem várias possibilidades para aplicação de oximas como antídotos para o envenenamento por OPs. Apesar do grande número de pesquisas a respeito do assunto e o grande número de oximas desenvolvidas, já presentes no mercado, não existe um

reativador universal, capaz de ter uma boa eficiência com amplo espectro entre os OPs, demandando assim novas pesquisas buscando reativadores mais eficientes com maior espectro de ação.

Com isso, o objetivo deste trabalho é modelar e comparar a interação e reatividades de duas Oximas de estruturas isoméricas, a K203 e a K206, reativando a AChE inibida por diferentes agentes químicos de guerra.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Armas Químicas de Guerra

Armas químicas de guerra são definidas como qualquer substância química cujas propriedades tóxicas são utilizadas com a finalidade de matar, ferir ou incapacitar algum inimigo na guerra ou associada a operações militares (SMART, 1997).

O uso de substâncias químicas com fins militares tem registros desde a antiguidade. Em 600 a.C., os atenienses envenenaram as águas de um rio com raiz de Heléboro, e os inimigos consumiam essa água e apresentavam intensa diarreia, pois a raiz é um drástico laxante. Em 429 a.C., os espartanos queimaram enxofre para produzir fumos tóxicos durante a Guerra do Peloponeso. Em 200 a.C., Cartago derrotou os inimigos após contaminar tonéis de vinho com Mandrágora, uma raiz que provoca sono narcótico. Depois do consumo do vinho pelos soldados inimigos, os cartagineses voltaram e os mataram. Aníbal, em uma batalha Naval contra Eumenes II de Pérgamo, lançou cobras venenosas nos conveses de navios inimigos para derrotar os inimigos pergamenos. Outra forma de utilização de substâncias foi através de flechas impregnadas com substâncias venenosas nas pontas e arcos para dispará-las contra os inimigos (ECKERT, 1991; SMART, 1997; SCHECTER; FRY, 2005; CHAUHAN, et al. 2008).

Ao longo dos anos, acordos foram feitos para a não utilização de armas químicas em conflitos. Em 1675, ocorre em Estrasburgo a assinatura do acordo Franco-Germânico proibindo a utilização de balas envenenadas. Depois de alguns anos, é realizada a Convenção de Bruxelas, em 1874, numa tentativa de estancar o uso de armas envenenadas. Em 1899, a Conferência Internacional da Paz, em Haia, promove um acordo mundial em que declara ilegal o uso de projéteis com gases venenosos. Com os acordos espera-se uma diminuição de pesquisas e desenvolvimentos de novos agentes químicos de guerra, porém, o contrário ocorreu: o grande potencial das armas químicas em conflitos militares acabou acelerando o desenvolvimento de novas substâncias (ECKERT, 1991; GOLISZEK, 2004; SCHECTER; FRY, 2005; SZINICZ, 2005).

Os agentes químicos ficaram famosos principalmente após seu uso na 1ª Guerra Mundial, porém muitos desses agentes já foram descobertos nos séculos XVIII e XIX. Carl Scheele descobriu o cloro em 1774 e em 1782 estudou o cianeto de hidrogênio. Claude Louis Berthollet sintetizou o cloreto de cianogênio em 1802. Humphry Davy foi responsável pela

síntese do fosgênio em 1812. O gás mostarda foi sintetizado em 1822 e identificado por Victor Meyer em 1886. Em 1848, a cloropicrina foi sintetizada por John Stenhouse (SMART, 1997).

Na 1ª Guerra Mundial, tanto franceses, ingleses como alemães investigavam substâncias para uso como armas químicas. O conceito de criar nuvem de gás tóxico foi creditado a Fritz Haber, do Instituto de Física de Berlim, em 1914. Devido à escassez de granadas, Haber pensou que uma nuvem de gás químico poderia incapacitar os combatentes inimigos sem a utilização de explosivos, além do que, a liberação do gás se dispersaria por uma área muito mais ampla do que ataques de artilharia, e selecionou o gás cloro, devido à sua abundância na indústria alemã (SMART, 1997; HILMAS et al. 2008).

Em abril de 1915, ocorreram os primeiros ataques alemães utilizando gás cloro, em Ypres. Após cerca de 10 minutos 1000 soldados franceses haviam morrido e outros 4000 foram incapacitados. O uso dessa tecnologia foi considerado um grande marco nas guerras, talvez o mais importante desde a invenção da pólvora (FITZGERALD, 2008).

No período entre guerras também houve grande mobilização, tanto para o desenvolvimento de antídotos como para o desenvolvimento de novos agentes químicos. Em 1936, o químico alemão Dr. Gerhard Schrader obteve o primeiro composto organofosforado, que foi relatado para a Seção de Armas Químicas das forças armadas alemãs. Os militares alemães ficaram impressionados com os efeitos produzidos no sistema nervoso pelo novo composto e o recomendaram para novas pesquisas. Tal composto foi denominado Tabun. Após a Segunda Guerra Mundial, o CWS o designou por GA (SZINICZ, 2005). Em meados de 1938, o Dr. Gerhart Schrader desenvolve um agente similar, o Sarin, cinco vezes mais tóxico que o Tabun, rebatizado mais tarde como GB. Os alemães recrutaram diversos químicos para desenvolverem novos agentes neurotóxicos e começaram a construir uma planta piloto para produzir estes compostos em 1939 (SMART, 1997).

A Segunda Guerra Mundial não foi marcada pela utilização intensa de agentes químicos, nem mesmo pela Alemanha. As razões pelas quais a Alemanha, mesmo com um estoque absurdo de agentes químicos, não os utilizou são várias, entre elas o mais certo é que Hitler havia sido vítima de um ataque com gás cloro durante a Primeira Guerra Mundial e apenas os utilizaria como último recurso. Outra hipótese para a não utilização era que Hitler acreditava que os países inimigos conheciam e produziam os agentes neurotóxicos (PITA, 2008; SMITH, 2008).

Após o término da guerra, houve a descoberta de várias instalações com grandes estoques de agentes químicos e vários cientistas alemães foram capturados. Foi apenas após

essa apreensão, em abril de 1945, que os aliados tiveram conhecimento do Tabun e dos seus efeitos fisiológicos. Outros cientistas foram capturados após o término da guerra e revelaram informações sobre a existência de um antídoto, a atropina, e também sobre a existência do Soman, e que os documentos estavam enterrados em uma mina abandonada em Berlim. Os soviéticos conseguiram capturar esses documentos, e soldados soviéticos também capturaram Tabun e Sarin em fábricas abandonadas. Americanos e britânicos também conseguiram capturar documentos referentes aos agentes neurotóxicos (SMART, 1997; HILMAS et al., 2008; PITA, 2008; SMITH, 2008).

Ao longo dos anos, como muitos países possuíam a tecnologia de armas químicas de guerra, houveram ocasiões em que houve a eminência do uso dos agentes químicos; porém, por medo de retaliações, em poucas ocasiões os compostos foram realmente postos em ação.

Alguns casos que valem a pena ressaltar são os atentados terroristas nos metrô do Japão em 1994 e 1995, de autoria de um grupo religioso conhecido como Aum Shinrikyo (Verdade Suprema), que utilizaram o gás Sarin. O ataque de 1994, ocorrido na cidade de Matsumoto, deixou 8 mortos e 200 feridos. Já o ataque de 1995, ocorrido na capital Tóquio, atingiu 5 vagões de um metrô, resultando em 11 mortes e aproximadamente 5000 feridos (OKUMURA et al., 1996).

Dentre os casos mais recentes que se tem notícia do uso de substâncias consideradas armas químicas, estão o uso de gás sarin na Guerra Civil da Síria em 2013, e o assassinato do irmão do ditador norte-coreano, Kim Jom-nan em 2017 na Malásia (MASSON; NACHON, 2017). Ambas as substâncias citadas nesse parágrafo, Sarin e VX, pertencem à classe dos compostos organofosforados. Sabe-se que estoques de Sarin e VX existem em 6 bases continentais dos EUA, além de outros agentes químicos de guerra. Declaradamente países como Índia, Iraque, Japão, Rússia, Síria, Israel, Coreia do Norte, entre outros possuem estoques de armas químicas.

2.2 Compostos Organofosforados

Compostos organofosforados vem sendo manipulados desde a Idade Média. Ao longo dos anos vieram estudos mais consistentes sobre as propriedades dessa classe de compostos. Em 1820, Lassaigne, estudou a esterificação de ácido fosfórico. Em 1845, Thénard e colaboradores estudaram uma série de derivados de fosfinas, o que deu base para um rápido avanço dos estudos na área. A segunda metade do século XIX teve ícones como Michaelis, A. E. Arbuzov e seu filho B. A. Arbuzov. Futuramente, Shrader e colaboradores descobriram e

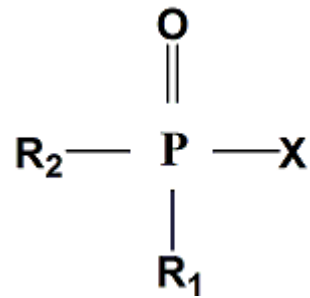
estudaram as propriedades tóxicas desses compostos, precursores de atuais usos industriais e bélicos destes compostos (TOY, 1976).

O átomo de fosforo é polarizável, com baixa eletronegatividade, geralmente com valência igual a três e, quando pentavalente, normalmente faz três ligações simples e uma ligação dupla com Oxigênio ou outro átomo bivalente. Os compostos trivalentes de fósforo são bons redutores, devido ao par de elétrons não ligantes e a facilidade da formação da ligação P=O. Os compostos fosforados são facilmente oxidados por Oxigênio, Ozônio, Peróxidos e outros oxidantes. A ligação C-P é muito resistente à hidrólise e oxidação (FISHER; WAZER, 1961). Os compostos de fósforo são precursores de moléculas essenciais à vida, sendo constituintes do protoplasma, além de estarem presentes em ácidos nucleicos, coenzimas, nucleotídeos, intermediários metabólicos e fosfatídeos (DOS SANTOS et al., 2007).

Compostos organofosforados vêm sendo amplamente utilizados na sociedade em diversas áreas como indústria, veterinária, medicina, agricultura e usos militares (MACILWAIN, 1993). Porém o uso inadequado desses compostos é altamente nocivo à saúde, além de serem potenciais contaminantes ambientais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), todo ano ocorrem cerca de 3 milhões de casos de intoxicação por OPs, além de aproximadamente 200.000 mortes (SOGORB *et al.*, 2004). Além do uso na agricultura, OPs são a estrutura base para diversos agentes químicos de guerra. Tais agentes químicos de guerra, como Sarin, Tabun e VX, foram empregados ao longo da história em conflitos armados, por exemplo na Síria em 2013 e em alguns atentados terroristas, como no Japão em 1995 e o recente assassinato do irmão do ditador Norte-Coreano Kim Jong-nam (NAGAO et al., 1997; OKUMURA et al., 2005; MASSON; NACHON, 2017).

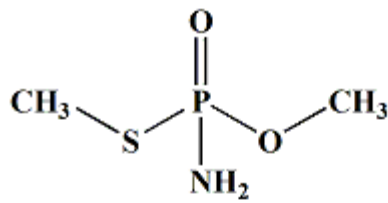
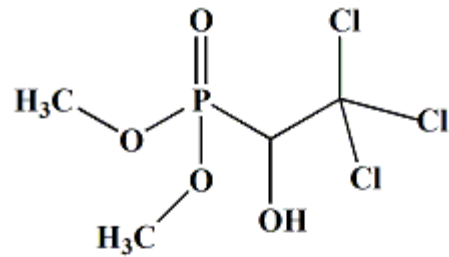
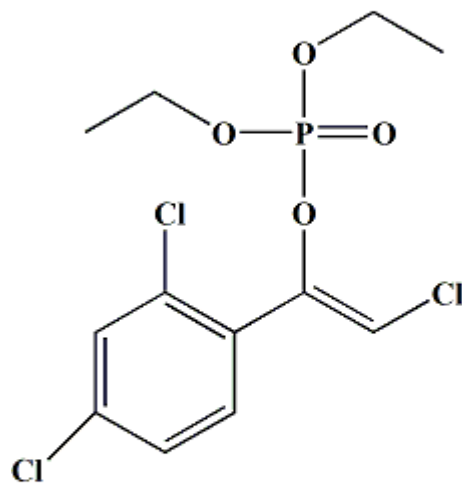
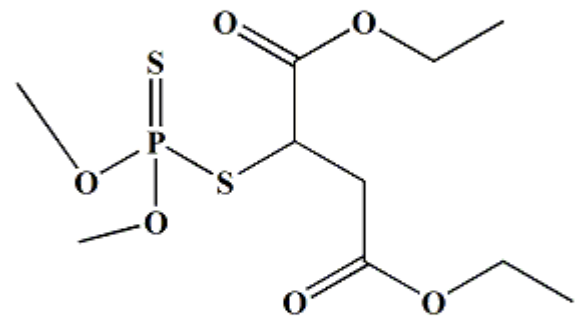
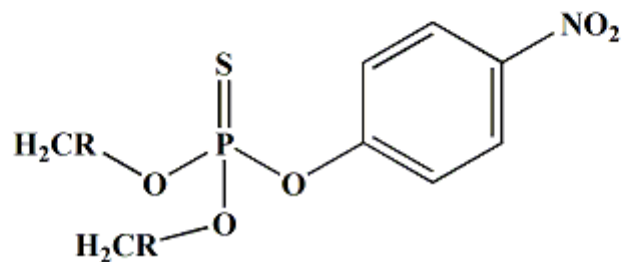
A estrutura geral dos OPs está representada na figura 1, em que R1 e R2 são radicais arila, alquila, ariloxila ou alcoxila e X grupos variados, como halogênios, alifáticos, aromáticos, etc. As diferentes atividades de OP estão relacionadas, evidentemente, com características estruturais, tais como o tipo de heteroátomo ou grupo funcional ligado ao átomo de fósforo e a seu estado de oxidação (STODDART, 1979).

Figura 1 - Estrutura geral dos OPs.



Compostos OP também fazem parte de um grupo de substâncias amplamente utilizadas como inseticidas na agricultura, como anti-helmínticos ou no controle de ectoparasitas em algumas espécies domésticas. Dentre os OP disponíveis no mercado, encontram-se o metamidofós, triclorfon, clorfenvinfós, malation e paration, representados na figura 2 (BARBOSA et al., 2005; OSWEILER, 1998). Segundo Elhalwagy e Zaki (2009), cerca de 40% do mercado de pesticidas são de produtos derivados de OPs.

Figura 2 - Principais representantes dos OPs pesticidas.

**Metamidofós****Triclorfon****Clorfenvinfós****Malation****Paration**

A exposição humana a OPs pode ocorrer em vários segmentos, por exemplo, agricultores que manuseiam esses produtos, população em geral no controle doméstico de pestes, em resíduos em alimentos e no uso preventivo de vetores de doenças. A atividade biológica dos OPs vai depender do tempo de exposição, concentração e tipo de OP. O tipo mais perigoso de OP é o utilizado como agente químico de guerra, sendo que sua toxicidade

está relacionada à sua estrutura e aos grupos ligantes ao átomo de fósforo (ELHALWAGY; ZAKI, 2009; CUNHA *et al.*, 2013).

2.2.1 Agentes dos Nervos de Guerra

Uma importante classe dos agentes químicos de guerra são os agentes dos nervos de guerra. Esses compostos organofosforados são os mais mortais dentre os agentes químicos de guerra (CHAUHAN *et al.*, 2008).

Na década de 1930, foi desenvolvida a fórmula geral dos OPs e sintetizado o Sarin (GB) e Tabun (GA), bem como houve o desenvolvimento de outros agentes neurotóxicos (CHAUHAN *et al.*, 2008). Há a estimativa que a Alemanha tenha fabricado cerca de 12 mil toneladas desses agentes na 2ª Guerra Mundial. Além disso, grandes estoques de armas químicas baseados em organofosforados ainda estão disponíveis em diversos países e são uma ameaça real à população mundial (MACILWAIN, 1993).

Os agentes químicos de guerra apresentam dois nomes, o nome químico, e duas letras do código OTAN. As principais séries de agentes dos nervos são a série G, devido ao país de origem do composto (Germany), e a série V, que acredita-se que venha da palavra “Venonous” que significa “venenoso”. Os principais representantes da série G são: GA (Tabun), GB (Sarin), GD (Soman) e GF (Ciclosarin) (Figura 3). Já a série V tem como principais representantes o VX e o (VR) VX Russo (Figura 4) (SMART, 1997).

Figura 3 - Estruturas dos principais agentes nervosos da série G.

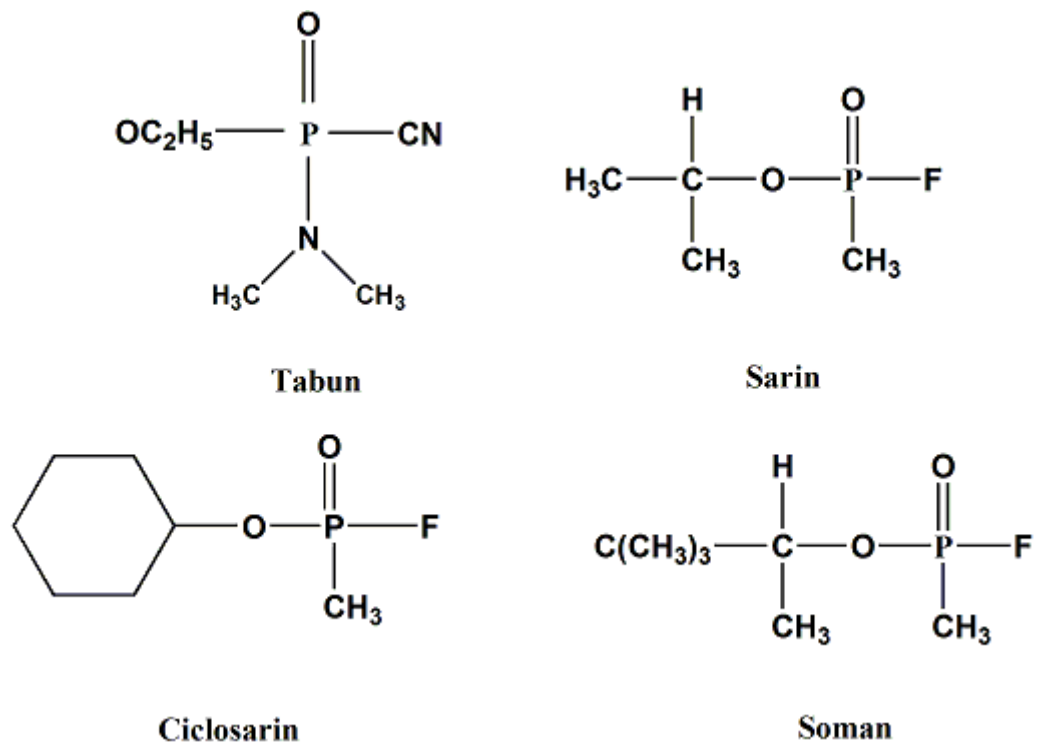
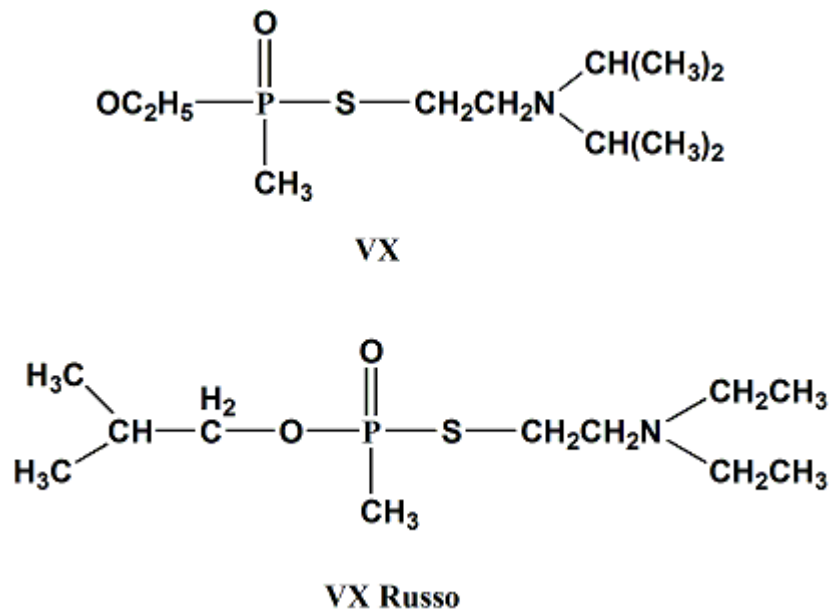


Figura 4 - Estruturas dos principais agentes nervosos da série V

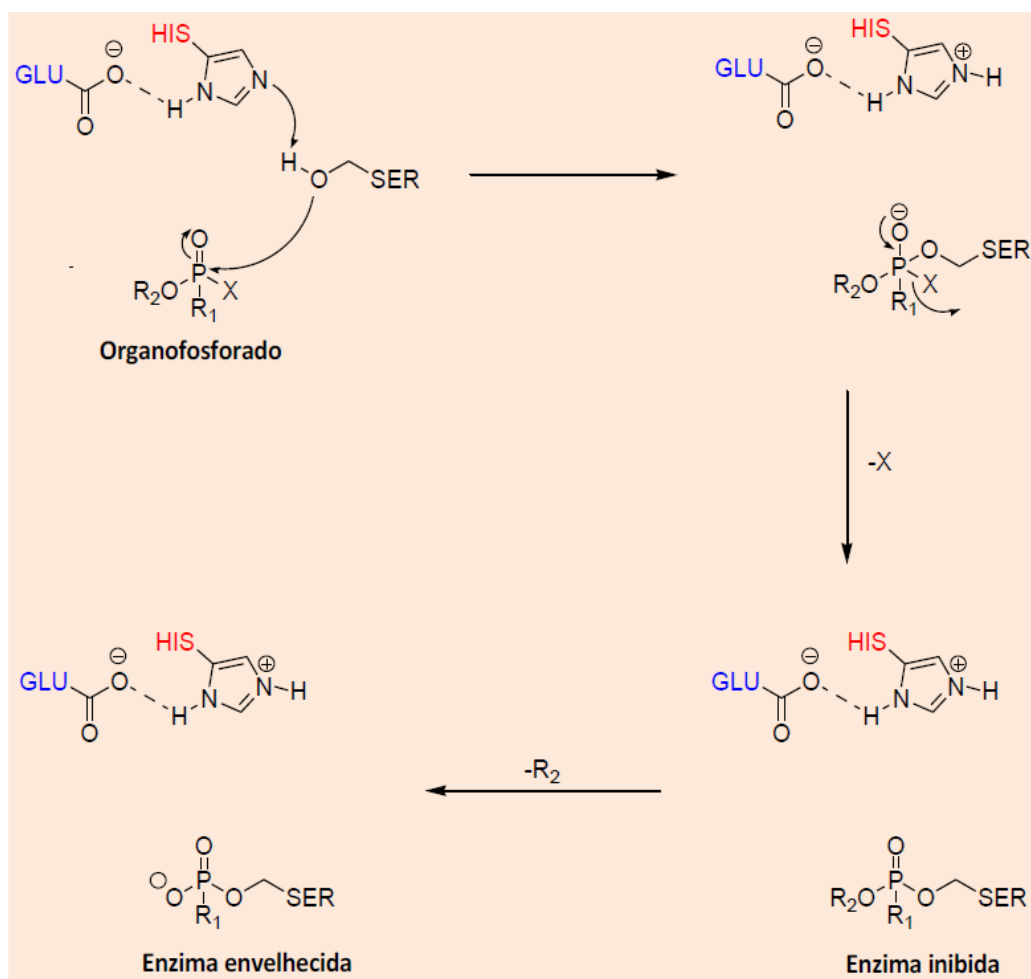


Os agentes dos nervos de guerra são comumente armazenados na forma líquida e, dependendo de sua volatilidade, podem ser descarregados como nuvens de vapor ou aerossol,

praticamente sem cheiro e incolor e intoxicam via inalação ou penetração cutânea, reagindo assim, com várias enzimas no corpo (ALCANTARA; VANIN, 1992; ALVIM et al., 2014).

O mecanismo de ação desses compostos é a fosforilação de alguns grupos funcionais. Esse processo ocorre principalmente em proteínas, sendo a reação mais comum com resíduos de serina, o que acontece fortemente nas enzimas colinesterases, como a Acetilcolinesterase (AChE) (Figura 5) (KIBONG et al., 2011; PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014). O processo de intoxicação por neurotóxicos ocorre no sistema nervoso central e periférico, onde esses compostos atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), que é fundamental para nosso sistema de controle de transmissão nervosa (MATOS, 2012; PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

Figura 5 - Esquema geral de inibição da AChE, onde X é o grupo de saída do composto organofosforado.



Fonte: (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014)

2.3 Acetilcolina (ACh)

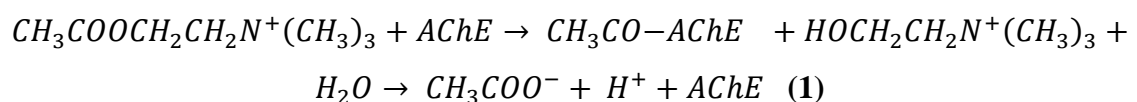
Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor encontrado em vertebrados e artrópodes, e é um dos principais compostos responsáveis pela sinalização do nervo para o músculo nas sinapses, designadas junções neuromusculares (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). No entanto, além da sua função no sistema nervoso periférico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

Existem dois receptores neuronais sensíveis a ACh, muscarínicos e nicotínicos, que estão distribuídos no SNC e no SNP. Os receptores muscarínicos estão, principalmente, associados com o SNP e com músculos lisos e cardíacos. O efeito da ligação com ACh está geralmente associado com a estimulação do sistema nervoso parassimpático (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). Os receptores nicotínicos encontram-se no SNC e na placa motora terminal (EPP), que são as sinapses entre os nervos e músculos esqueléticos. Com o avanço do Mal de Alzheimer, há a perda de receptores nicotínicos, constituindo evidências de um papel desses receptores na deficiência de cognição e memória (SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003; SILMAN; SUSSMAN, 2005).

Quimicamente, a ACh é um éster de colina, sendo sintetizada no terminal pré-sináptico, a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), sendo a reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). Quando um estímulo ocorre, desencadeia-se a liberação da ACh na fenda sináptica por exocitose. ACh liga-se aos seus receptores, sendo, posteriormente, hidrolisada em colina (Ch) e acetato, pela AChE. A colina é reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh e posteriormente armazenada em vesículas (SIEGEL; SAPRU, 2006).

2.4 Acetilcolinesterase (AChE)

O principal papel biológico da AChE é a transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica pela rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), através da seguinte reação (Equação 1):



Ela é uma enzima pertencente à família das colinesterases, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas. A AChE está presente no sistema nervoso central e periférico (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Compostos organofosforados têm o poder de inibir a AChE. Eles inibem pela formação de uma ligação covalente com um resíduo de serina no sítio ativo (Figura 5). Inibidores de AChE, além de OPs, tais como carbamatos e haletos de sulfonila, são usados em tratamentos de várias desordens como miastenia e glaucoma, além de terem sido propostos como possibilidade terapêutica para a manutenção do Mal de Alzheimer (HALLAK; GIACOBINI, 1989).

No sistema nervoso periférico, AChE é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos, enquanto que, no sistema nervoso central, ela está envolvida no controle motor, na cognição e na memória. O excesso de impulsos nervosos pode causar problemas, e por isso é importante que o processo de interação da ACh com o receptor seja interrompido, para evitar o excesso de transmissão da informação elétrica, que pode levar a problemas de funcionamento do corpo (PATRICK, 2001).

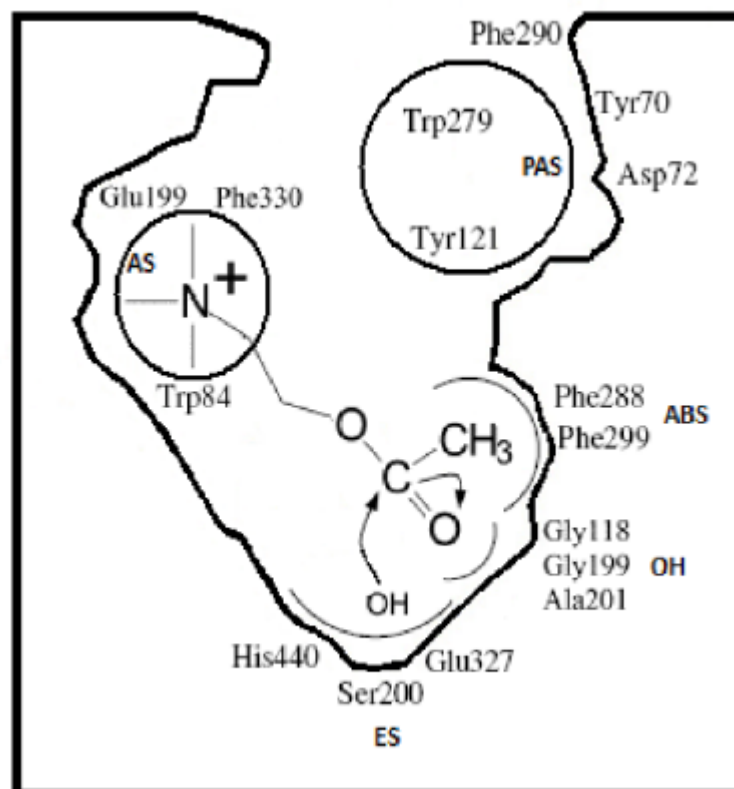
A ACh interage com os sítios aniônicos e esteráticos da AChE, por forças de van der Waals, formando o complexo enzima-substrato. Então, a colina é liberada, restando a enzima acetilada. A água então reage com essa enzima acetilada, formando acetato e regenerando a AChE. Os compostos organofosforados agem se ligando ao sítio esterático. Dessa forma, a AChE não consegue se ligar à ACh, que, por sua vez, acumula-se nas fendas sinápticas, promovendo os vários sinais característicos da intoxicação (LARINI, 1999). Os sintomas da intoxicação dependem da dose à qual o indivíduo sofreu exposição e o tipo de organofosforado, resultando em distúrbios de numerosas funções, tais como a paralisia das funções neuromusculares e, finalmente, parada respiratória e morte (EYER; WOREK, 2007; WOREK et al., 2005).

Além do sítio “aniônico” catalítico, existe um segundo sítio aniônico, conhecido como sítio “aniônico” periférico (Figura 6). Esse sítio, identificado com base na ligação de compostos bis-quaternários, pode estar envolvido na ação de alguns inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato. Sendo assim, a ocupação do sítio aniônico periférico influenciaria a conformação do sítio ativo, assim como a afinidade ou conformação dos compostos ligados a esse sítio. Esse sítio ativo é caracterizado por possuir resíduos de triptofano hidrofóbicos, além de grupos aniônicos. Consequentemente, esse sítio pode ser alvo

de inibidores, que impediriam a saída do produto de reação (NUNES-TAVARES et al., 2002; SILMAN; SUSSMAN, 2005).

Em humanos, o sítio oxianiônico consiste em glicina e alanina (Gly116, Gly117 e Ala199). Esses três resíduos peptídicos formam ligações de hidrogênio com o intermediário acil-AChE, que é formado durante o processo catalítico, estabilizando-o. O sítio aniônico de ligação ao substrato (AS) é geralmente composto por resíduos aromáticos, como triptofano e fenilalanina (Trp82 e Phe339), que possuem uma pequena carga negativa por meio da qual se ligam os amônios quaternários por interações π -cátion. O local de ligação à acila (ABS) é composto por Leu286 e Val288, desempenhando um papel importante na limitação da dimensão de substratos que são capazes de entrar no sítio ativo. (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ZHOU et al., 2008).

Figura 6 - Esquema do sítio aniônico periférico da AChE com numeração da *Torpedo Californica*.



Fonte: HOUGHTON et al (2006).

O sítio catalítico (ES) contém a tríade catalítica Ser198-His438-Glu325. As colinesterases utilizam essa tríade para reforçar a nucleofilicidade da Serina catalítica, uma vez que a forte ligação de hidrogênio entre histidina (His) e serina (Ser) melhora a capacidade da Ser atacar nucleofilicamente o substrato, enquanto o glutamato (Glu) estabiliza o cátion de histidina no complexo ligante-enzima (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ZHOU et al., 2008).

A supressão do sistema nervoso central resulta em perturbações que vão desde tensão e ansiedade, com labilidade emocional e dificuldade na concentração, até confusão, ataxia, astenia generalizada, com abolição de reflexos, respiração de Cheyne-Stokes, convulsões, depressão do centro respiratório e circulatório, taquicardia e tensão arterial. A morte no caso de envenenamento por OP é causada pela paralisia dos músculos respiratórios, provocando uma parada respiratória, em razão da insuficiência do sistema (KISS; FAZEKAS, 1970; LUDMIRSKY; KLEIN, 1982).

A principal dificuldade em combater as armas químicas de guerra é a baixa eficiência dos antídotos disponíveis, sendo que atualmente não existem antídotos universais de amplo espectro de ação. Atualmente, o tratamento para envenenamento por OPs inclui três estratégias: primeiro, a administração de um receptor antagonista muscarínico da ACh como por exemplo a atropina, para boquear a superestimulação do receptores colinérgicos pela ACh; segundo, aplicação de uma oxima com a função de reativar a enzima inibida; e terceiro, uma droga anticonvulsivante (ACHARYA et al., 2011). Um passo que desperta muito interesse para novos estudos é a descoberta de novos reativadores, com maior eficiência e com maior espectro de atividade.

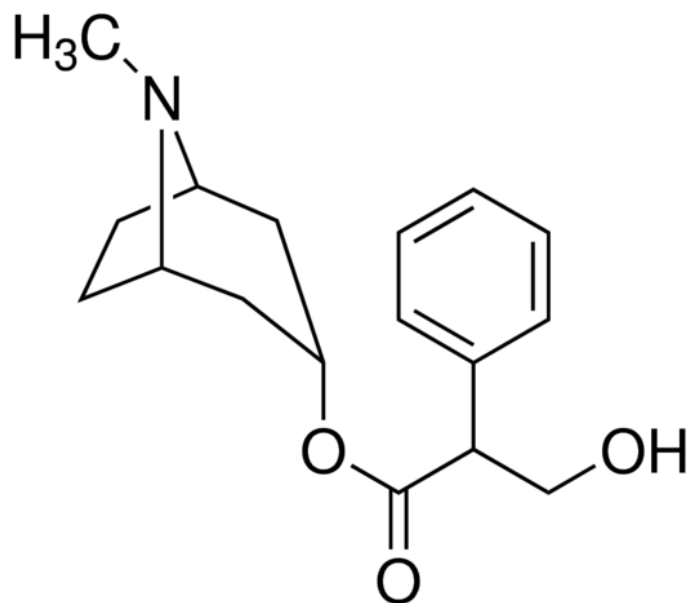
2.5 Reativação da AChE

Os OPs inibem a AChE pelo processo de fosforilação. Ao ocorrer esta inibição, o local esterásico fosforilado sofre regeneração hidrolítica com uma velocidade muito lenta. Pesquisas mostraram que grupos nucleofílicos como as oximas, hidroxilaminas e os ácidos hidroxâmicos são capazes de reativar a enzima com maior velocidade do que a hidrólise espontânea. Também foi constatado que a AChE, com sua capacidade de esterase perdida, poderia ser restaurada por compostos que deslocassem o grupo fosforil da enzima. A reativação seletiva da AChE poderia ser alcançada por um nucleófilo, contendo um nitrogênio quaternário que interagisse com o subsítio negativo do centro ativo, deixando este nucleófilo em posição oposta ao átomo de fósforo (SILMAN, 2005).

O principal tratamento para o envenenamento por OPs é a combinação de alguns fármacos, com o intuito de diminuir os efeitos do acúmulo do neurotransmissor nas terminações nervosas e reativar a enzima fosforilada (KASSA; CABAL, 1999). Geralmente, indivíduos que apresentam uma sintomatologia característica de síndrome colinérgica são submetidos à combinação de drogas anticolinérgicas, tais como o sulfato de atropina, e um reativador da enzima AChE, usualmente um composto da classe das oximas (KUCA et al., 2005; PETROIANU et al., 2006).

A atropina (Figura 7) age competindo pelo sítio ativo da AChE, inibindo a ação da ACh sobre o órgão efetor. Esta competição ocorre preferencialmente nos receptores colinérgicos muscarínicos. Desta forma, a atropina reverte apenas sintomas muscarínicos e deve ser administrada assim que se suspeitar o diagnóstico de intoxicação por compostos OPs.

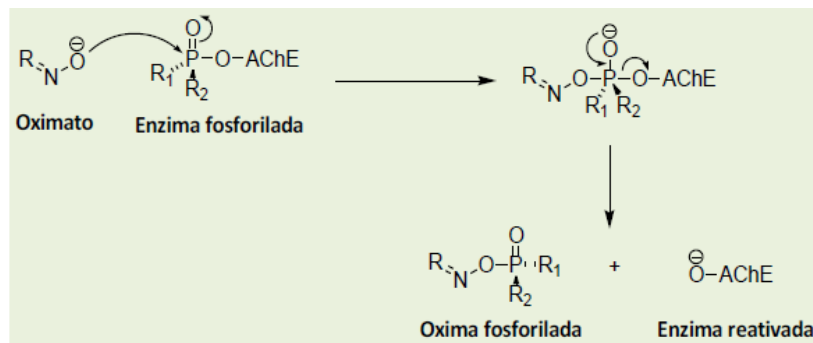
Figura 7 – Fórmula estrutural da Atropina.



Já as oximas têm a propriedade de reativar a AChE através de um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do OP, através do mecanismo apresentado na figura 8. Algumas oximas possuem um nitrogênio quaternário que se liga diretamente ao sítio aniônico da AChE, deslocando a ligação dos OPs junto ao sítio esterásico por serem doadores de próton H^+ , estabelecendo ligação oxima-OP e reativando a enzima (KUSHIK; CHANDRABHAN, 2003; RUSYNIAK; NAÑAGAS, 2004). A eficiência das oximas varia de acordo com a estrutura química dos OPs, com a estrutura química da oxima e com a taxa de desalquilação pós-

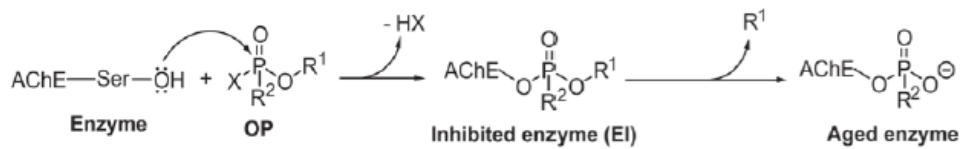
inibitória conhecida como “envelhecimento”. O envelhecimento é o processo de quebra da ligação P-O, a qual resulta na formação de um complexo estável fosfonil-colinesterase carregado negativamente que interrompe o ataque nucleofílico pela oxima, como mostrado na figura 9 (ELHANANY et al; 2001).

Figura 8 - Esquema geral de reativação por oximas.



Fonte: (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014)

Figura 9 - Esquema geral do processo de envelhecimento.



Fonte: (RAMALHO et al., 2016)

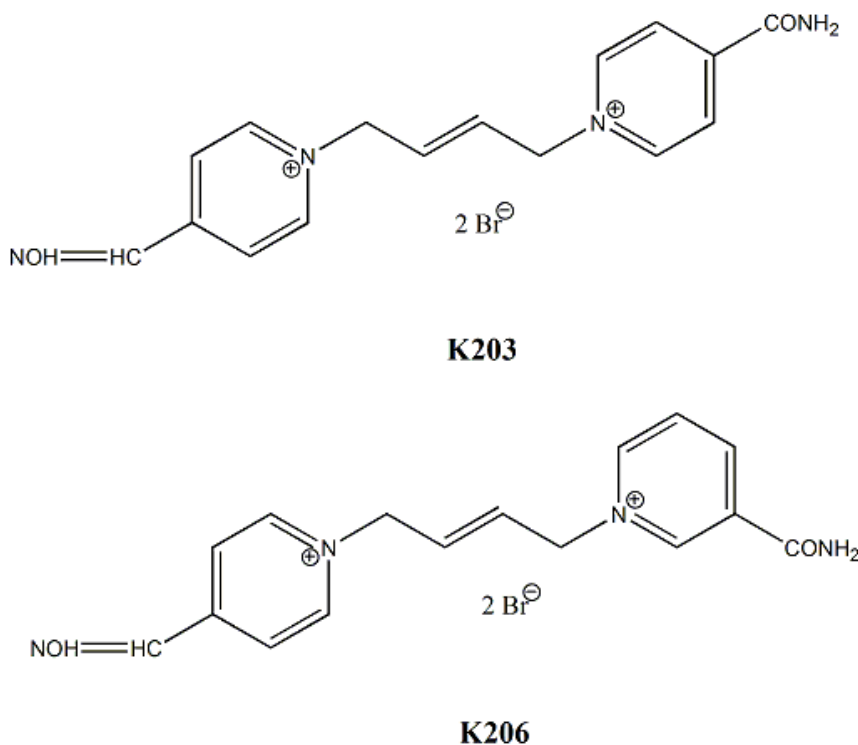
2.5.1 Oximas

Na década de 1950, a atropina era o único antídoto disponível para tratamento por envenenamento por OPs (STOJILJKOVIC; JOKANOVIC, 2006). Descobriu-se um tempo depois que a hidroxilamina serviria como remediação para OPs em experimentos *in vitro*, conseguindo a primeira reação de reativação conhecida da AChE inibida, sendo que até então esse processo era considerado irreversível. Em 1955, as oximas foram identificadas como antídotos específicos mais eficientes que as hidroxilaminas (EYER; WOREK, 2007; STOJILJKOVIC; JOKANOVIC, 2006).

Cada molécula de oxima tem forte carga positiva que interage com os sítios aniônicos, carregados negativamente no sítio ativo da AChE, sendo atraída assim, para mais próximo da enzima. O sítio aniônico da AChE não é afetado pela inibição enzimática e pode contribuir no processo de reativação ligando a enzima à parte catiônica do reativador. Em seguinte, ocorre o ataque nucleofílico no átomo de fósforo do organofosforado, formando o complexo instável enzima-inibidor-oxima. Por fim, há a separação do complexo oxima fosforilada e enzima reativada (WILSON; GINSBURG, 1995; STOJILJKOVIC; JOKANOVIC, 2006).

Atualmente existem cinco oximas piridínicas que são disponibilizadas para uso clínico no tratamento de intoxicação por OPs: pralidoxima, trimedoxima, abidoxima, asoxima e HLo-7 (KAVALCI et al., 2009). No Brasil, a pralidoxima é a única oxima autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ser usada em tratamentos de envenenamento por OPs (ARAUJO et al, 2014). Estudos foram feitos com oximas bis-quaternárias e estas mostraram ser reativadores potentes da AChE, como por exemplo as oximas K203 e K206, objetos de estudo neste trabalho (Figura 10). Ainda não existe uma oxima com espectro de ação satisfatório para todos os agentes neurotóxicos, sendo esta a principal motivação para novos estudos (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014). Dentre as abordagens dos estudos mais recentes para o desenvolvimento de novos antídotos e fármacos, está a modelagem molecular, que relaciona métodos de estrutura eletrônica e simulações computacionais, sendo muito útil para entendimento do comportamento das moléculas e sistemas moleculares (ALENCAR FILHO; SANTOS; OLIVEIRA, 2017; LYAGIN; EFREMENKO, 2018).

Figura 10 - Estruturas das oximas K203 e K206.



2.6 Química Computacional

Grandes avanços têm sido obtidos no desenvolvimento científico em nível elementar, com processos cada vez mais complexos tendo um maior entendimento. Grande parte desses avanços deve-se aos trabalhos de cientistas teóricos, que caracterizam quantitativamente as forças responsáveis pelos processos químicos e seus mecanismos. Os avanços da informática nos últimos tempos possibilitavam o processamento mais rápido e eficaz de grandes quantidades de informação, juntamente com novas ferramentas e metodologias computacionais. É possível obter resultados cada vez mais precisos, que são usados para simular diversos parâmetros químicos e correlações (CARVALHO et al., 2003).

Uma das principais vantagens da química computacional sobre metodologias experimentais, é o baixo custo devido ao preço de equipamentos tecnológicos estarem sempre diminuindo pela constante renovação tecnológica, além de cortar gastos e a não geração de resíduos com repetições de análises. A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas onde a química desempenha um importante papel, direto ou indireto (MATOS, 2012).

Pode-se definir a química computacional como o domínio dos métodos computacionais aplicados à Química. Ela apresenta-se como um domínio interdisciplinar, que se ramifica pelas áreas clássicas divisões da química, como Química Orgânica, Físico-Química, Bioquímica, Química Medicinal, etc., juntamente com a ciência dos computadores (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001).

A química computacional é dividida em 2 áreas: a Mecânica Molecular e a Quântica, sendo que a primeira se utiliza das leis da mecânica clássica enquanto a quântica se utiliza de leis da mecânica quântica e clássica, além de constantes físicas. Os químicos computacionais utilizam-se de softwares e metodologias específicos para o entendimento de determinados problemas. Com isso, é possível entender melhor os processos desde o nível macro até o microscópico (SIEGBAHN; BLOMBERG, 2000). Uma das principais aplicações dessa metodologia é na área de química medicinal.

A química medicinal tem um papel fundamental no planejamento de novos fármacos. Ela é fundamentada no conhecimento prévio dos processos envolvidos e na seleção de alvos terapêuticos. Através de diversas estratégias, que englobam seleção, identificação e otimização de estruturas de moléculas capazes de interagir com o alvo selecionado, a Química Medicinal computacional tem potencial para desenvolver pesquisas tanto na área de desenvolvimento de novos fármacos como na obtenção de antídotos contra armas químicas de guerra, provando ser extremamente versátil e de grande importância e interesse, tanto científico como econômico (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

A oferta de softwares para modelagem molecular, juntamente com bancos de dados, disponíveis nas redes, são fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas visando a obtenção de novos compostos farmacológicos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica e propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (CARVALHO et al., 2003).

2.6.1 Modelagem Molecular

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, pelo uso da química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando a fornecer uma representação tridimensional sob um dado conjunto de dados (CARVALHO et al., 2003; SANT'ANNA, 2002). O estudo das relações entre a estrutura de um composto e sua atividade e seus análogos pode ser a chave para entender quais partes da estrutura são responsáveis por determinada atividade biológica. Tendo-se essa ciência, é

possível utiliza-lá como base para a obtenção de novas estruturas com melhores propriedades e atividade (THOMAS, 2003).

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas que possibilita a compreensão da interação, a nível molecular, de uma substância com seu receptor (COHEN, 1996), por meio de simulação computacional. Isso ocorre através da geração de estruturas realistas. Os métodos teóricos relacionados a essa técnica permitem calcular propriedades de moléculas, tais como conformações estáveis, cargas e interações atômicas, propriedades e energias de moléculas associadas; exibir, sobrepor e comparar modelos moleculares (SILVA, 2006). A modelagem e suas representações gráficas são, portanto, ferramentas utilizadas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (BARREIRO; RODRIGUES, 1997; COHEN et al., 1990).

Os softwares de modelagem são capazes de desenhar estruturas moleculares, realizando cálculos de otimização geométrica e estudos de análise conformacional. Os arquivos de saída desses cálculos podem ser utilizados como arquivos de entrada para outros programas. Sendo assim, o primeiro passo da modelagem molecular é desenhar a estrutura da molécula. Seguido da otimização da molécula, objetivando encontrar parâmetros estruturais, como comprimentos e ângulos de ligação, para posterior comparação com valores próximos aos valores determinados experimentalmente (CARVALHO et al., 2003; RODRIGUES, 2001).

As representações gráficas são, portanto, ferramentas utilizadas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de informações de sistemas moleculares complexos. Estas ferramentas podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos compostos de forma direta e indireta (COHEN, et al. 1988; COHEN et al., 1990). Indiretamente, quando não se dispõe da estrutura do receptor, na tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos que elucidem as relações estrutura-atividade biológica. Diretamente, quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico, na tentativa de compreender as interações do complexo ligante-receptor. Ambos os modos tentam otimizar o encaixe da molécula com o receptor (SILVA, 2006).

Nesse contexto, é importante ressaltar que as moléculas desenhadas tridimensionalmente, não necessariamente estão na conformação mais estável. Durante o processo de obtenção de uma estrutura podem ocorrer distorções na molécula, que envolvem a formação desfavorável de parâmetros estruturais, tais como comprimentos e ângulos de ligações. Repulsões estérica e eletrostática também podem ser provocadas por interação entre átomos não ligados. Portanto, a minimização de energia e a análise conformacional são

utilizadas interativamente, para otimizar a geometria de moléculas e corrigir possíveis distorções (CARVALHO, 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

2.6.2 Ancoramento Molecular (*Docking*)

Dentre os métodos de modelagem molecular, podemos citar o ancoramento molecular (*docking*). A simulação computacional do ancoramento molecular (“*docking*”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e um ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada. Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo, contudo o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI; NIWA; TANAKA, 1994).

LEACH e ZNIJIL (1992) alavancaram a eficiência dos estudos através de ancoramento molecular ao propor que o método consiste em primeiro determinar a posição e a orientação dos fragmentos rígidos do ligante e então pesquisar as conformações da região flexível do ligante de modo sistemático. A energia de interação intermolecular é calculada através da soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas, desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula. Assim, a metodologia utiliza a energia envolvida no processo para identificar a conformação do ligante energeticamente mais favorável quando ligado ao alvo. Valores mais baixos de energia representam melhor as interações entre proteína e ligante, quando comparados com valores mais elevados (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Entender as interações ligante-receptor requerem estudos complexos. Os ligantes precisam mudar sua conformação conforme ocorre o avanço da molécula no sítio ativo da proteína. Conforme o ligante adentra no sítio ativo, também ocorrem mudanças conformacionais na cavidade, induzidas pela presença do ligante, o que pode ser essencial para a atividade catalítica ou inibição de determinada proteína (GONÇALVES, 2008).

De maneira geral, os “softwares” de “*docking*” são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de energia. O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação, e permite explorar os graus de liberdade

translacional, rotacional e conformacional do ligante, bem como o de ligações rotacionáveis na proteína. A função de escore é aplicada para tentar distinguir os modos de ligação teoricamente mais próximos dos obtidos experimentalmente entre os demais modos de ligação, explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, ordenar os diferentes modos de ligação apresentados. As funções de escore podem ser estabelecidas de acordo com campos de força de mecânica molecular, parâmetros empíricos de cálculos de energia livre ou até de acordo com parâmetros denominados “knowledge-based” score (VERDONK et al., 2003; TAYLOR; JEWsbURY; ESSEX, 2002).

Uma das características mais valiosas dos métodos de “docking” é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos. Para realizar um teste desse nível, um ligante é extraído de seu complexo cristalográfico e submetido a simulações com o sítio ligante da proteína. Dessa forma, os modos de ligação obtidos nas simulações são comparados com os respectivos modos de ligação obtidos experimentalmente. Outra possibilidade inerente ao método é a capacidade de sua função de escore de ordenar ligantes de acordo com valores experimentais de atividade (VERDONK et al., 2003).

Os valores da função de desempenho do ancoramento (*Docking Scoring Function*), E_{score} , são definidos pela Equação 2:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (2)$$

Em que:

$$E_{inter} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (3)$$

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

E_{intra} é a energia interna do ligante:

$$E_{intra} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=protein} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{flexiblebonds} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad (4)$$

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

2.6.3 Métodos Quânticos

Em 1900, Max Plack postulou que a troca de energia entre a radiação emitida por um corpo aquecido e os átomos da parede ocorria de forma quantizada, ou seja, a energia se apresentava como pacotes indivisíveis de energia. O físico francês Louis de Broglie formulou a hipótese, futuramente comprovada experimentalmente, de que o elétron teria comportamento ondulatório. Schrödinger, em 1926, desenvolveu a equação de onda da mecânica ondulatória. Essa equação, quando aplicada ao modelo atômico desenvolvido por Bohr, demonstrou que os valores de energias quantizados estavam de acordo com os resultados experimentais obtidos por Heisenberg e Dirac, sendo que ambas abordagens foram desenvolvidas separadamente. Essa equação é conhecida como equação de Schrödinger, base para os cálculos de energia para átomos (NYMAN; YU, 2000; ELIAS, 2007).

O ponto de partida para descrever quanticamente o comportamento da matéria a nível atômico, no caso não relativístico, é através da resolução da equação diferencial linear de Schrödinger independente do tempo (Equação 5), que pode ser escrita em função das três dimensões espaciais da seguinte forma:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \right] \Psi(x, y, z) = E\Psi(x, y, z) \quad (5)$$

Os termos dentro do colchete são um operador matemático chamado hamiltoniano, representado comumente pela letra H. Podemos reescrever a equação simplificada de Schrödinger em função de r (Equação 5), onde r representa as três coordenadas espaciais:

$$\hat{H}\Psi(r) = E\Psi(r) \quad (6)$$

Em química, usa-se essa equação, geralmente, para a obtenção do valor energético de sistemas (ALCÁCER, 2007; REIS, 2009)

Essa equação é usada para descrever as funções de onda das partículas em estados estacionários. Através dela é possível obter, por exemplo, o espectro de energia do átomo de Hidrogênio, o que é base de diversos cálculos quânticos, abrangendo diversos métodos computacionais, dentre eles a Teoria do Funcional de Densidade, que corresponde à sigla do termo na língua inglesa DFT.

2.6.4 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

Prever propriedades moleculares, tendências qualitativas dessas propriedades ou explicar a natureza de uma ligação química são os objetivos da química computacional. Existem vários níveis ou métodos para encarar esses problemas. Alguns tradicionais como os *ab initio*, empíricos e semiempíricos e também outros mais sofisticados como a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Os métodos semiempíricos são baseados no formalismo de Hartree-Fock (campo autoconsistente), contudo, utilizam várias aproximações e dados retirados do experimental. Já o DFT contempla o sistema eletrônico por meio de funcionais, que são funções da função de onda de Schrödinger (Ψ) que espacialmente dependem da densidade eletrônica. Esse método é particularmente importante no estudo de sistemas moleculares, pois os descreve relativisticamente, aumentando a acurácia das informações. Os conceitos modernos desta teoria foram inicialmente formulados para estados não degenerados e encontram-se nos trabalhos de Hohenberg (HOHENBERG; KOHN, 1964) e Kohn (KOHN; SHAM, 1965).

Devido ao grande número de átomos em sistemas biológicos e à complexidade das interações, quebra e formação de ligações, estudar a catálise enzimática é um grande desafio para a química computacional. Métodos quanto-mecânicos de alto nível teórico são limitados a aplicações em sistemas com número relativamente pequeno de átomos. A combinação dos métodos quanto-mecânicos e de mecânica molecular (QM/MM) excede o domínio dos

cálculos QM a macromoléculas. Na região QM, os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície potencial é construída dentro da aproximação de Born-Oppenheimer (BORMAN, 2004).

Um método para se obter os resultados de QM é o de funcional de densidade (Density Functional Theory, DFT), desenvolvido por Hohenberg, Kohn e Sham (KOHN; HOLTHAUSEN, 2001). Segundo Tom Ziegler (1991, p. 651): “A noção básica em DFT, de que a energia de determinado sistema eletrônico possa ser expressa em função de sua densidade, é quase tão antiga quanto a própria mecânica quântica [...]”. Hohenberg e Kohn mostraram também que a energia, função de onda e outras propriedades moleculares são univocamente determinadas por essa densidade de probabilidade eletrônica $\rho [x,y,z]$ (segundo teorema de Hohenberg-Kohn), ou seja, a densidade eletrônica e o Hamiltoniano têm uma relação funcional que permite a computação de todas as propriedades moleculares no estado fundamental sem uma função de onda. Um problema desses teoremas é não mencionar como encontrar a energia do estado fundamental a partir de ρ ou a partir de ψ . Isso foi contornado por Kohn e Sham, na década de 60, quando eles propuseram que a energia puramente eletrônica de uma molécula com muitos elétrons no estado fundamental seria (Equação 7):

$$E_0 = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^n \langle \Psi_i(1) | \nabla_1^2 | \Psi_i(1) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{z_{\alpha\rho(1)}}{r_{1\alpha}} dv_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{xc}[\rho] \quad (7)$$

Em que $\Psi_i(\mathbf{1})$, $i=1, 2, \dots, n$ são os orbitais Kohn-Sham, e $E_{xc}[\rho]$ é a energia de troca e correlação. Kohn e Sham também mostraram que “ ρ ” exato para o estado fundamental pode ser determinado pelos orbitais Ψ_i (Equação 8):

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Psi_i|^2 \quad (8)$$

O terceiro teorema de Hohenberg-Kohn diz que $E_0[\rho] < E_0[\rho']$, onde ρ é a densidade exata e ρ' a densidade aproximada pela expansão (Equação 8) para “ n ” finito. Esse teorema é equivalente ao teorema variacional de Hartree-Fock. Os orbitais Kohn-Sham podem ser determinados pela expressão (Equação 9):

$$\hat{F}_{KS}(1)\Psi_i(1) = \varepsilon_{i,KS}\Psi_i(1) \quad (9)$$

onde F_{KS} é o operador de Kohn-Sham apresentado pela Equação 10:

$$\hat{F}_{KS} \equiv -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \sum_{j=1}^n \hat{J}_j(1) + V_{xc}(1) \quad (10)$$

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

Dessa forma, pode-se minimizar a energia em relação à densidade através das condições de contorno (Equação 11):

$$\frac{\partial E_0}{\partial \tilde{\rho}} = 0 \quad (11)$$

Sendo a integral $\rho' dr = N$, onde N é o número de elétrons do sistema. O principal problema do método é a falta de um processo sistemático para determinar $E_{xc}[\rho]$, assim vários tipos de funcionais já foram propostos. Este funcional é na realidade, dividido em duas partes: um de troca e outro de correlação.

Um dos funcionais de troca mais utilizados é o B3, proposto por Becke, em 1993 (BECKE, 1993), que foi utilizado neste trabalho (Equação 12):

$$E_x = (1 - \alpha_0)E_x^{LSDA} + \alpha_0 E_x^{HF} + \alpha_x \Delta E_x^{B88} \quad (12)$$

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

2.6.5 Métodos Híbridos QM/MM

Como já visto, é de alta complexidade realizar cálculos de Mecânica Quântica (QM) para sistemas macromoleculares devido ao alto custo computacional. Mesmo utilizando a DFT como uma alternativa viável, se nós almejarmos uma convergência de um experimento virtual para uma proposta de sistema real haverá o encarecimento do tempo de cálculo, inviabilizando ainda mais sua realização quando a função de base escolhida for muito extensa.

Logo, uma boa escolha para tratar sistemas mais reais, é contornar as limitações de um cálculo utilizando-se de métodos híbridos, contendo considerações de Mecânica Quântica e Mecânica Molecular (MM), chamados métodos híbridos quanto-mecânicos (QM/MM) (MOROKUMA, 2004).

As bases do método QM/MM são: uma pequena porção é selecionada para o tratamento QM, por exemplo, a um nível *ab initio*, semiempírico, ou Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010; VAN DER KAMP; MULHOLLAND, 2013). O tratamento QM, como trata de formalismo quântico, permite quebra e formação de ligações químicas. No estudo teórico de catálise enzimática, a região delimitada pela teoria QM corresponde ao sítio ativo da enzima, região que abrange resíduos de aminoácidos da enzima, substratos e cofatores. O resto do sistema, que não está diretamente ligado à reação química, é tratado através da teoria de mecânica newtoniana, pela escolha de um campo de forças (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010).

Uma característica distintiva entre os métodos QM/MM é o acoplamento dessas duas regiões, ou seja, como as interações entre os sistemas QM e MM são tratados (BAKOWIES; THIEL, 1996). A estratégia mais simples de acoplamento envolve a utilização de cargas pontuais na região QM que interagem com o resto da região de MM (LONSDALE; RANAGHAN; MULHOILLAND, 2010). No desempenho desse tipo de cálculo, a energia QM/MM de todo o sistema, $E_{TOTAL}^{QM/MM}$, é calculada como mostrado na Equação 13:

$$E_{TOTAL}^{QM/MM} = E_{TOTAL}^{MM} + E_{Região\ QM}^{QM} - E_{Região\ QM}^{MM} \quad (13)$$

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

A energia total do sistema não pode ser calculada apenas pela soma das energias de cada subsistema, pois é muito importante considerar as interações da interface QM com MM. Dependendo do tipo de QM/MM, deve haver na região de fronteira (parte entre regiões QM e MM) átomos adicionais que fazem parte do subsistema QM e que não sejam parte de todo o

sistema, ou pode consistir de ligações de átomos com características especiais que aparecem em ambos os cálculos QM e MM (HEYDEN; LIN; TRUHLAR, 2007; SENN; THIEL, 2009).

Métodos QM de alto nível, combinados com métodos de MM, podem ser utilizados para estudar as reações enzimáticas, permitindo o cálculo das barreiras de energia para o processo da reação (BORMAN, 2004). Anteriormente, devido a restrições por demanda computacional, cálculos QM eram restritos a pequenos sistemas possuindo poucas dezenas de átomos. Os efeitos de grandes sistemas em uma região QM podem agora ser estimados e corroborados a investigações experimentais (BRAUN-SAND et al., 2005; MULHOLLAND, 2007). Warshel e Levitt aplicaram o primeiro QM/MM à lisozima, da clara de ovo, em 1976 (WARSHEL; LEVITT, 1976). Eles apresentaram os conceitos de QM/MM, detalhando situações essenciais, e os aplicaram a reações enzimáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, J.P. Imines, enamines and oximes. *Contemp Org Synth.* 1997. 4(6):517-543.
- ACHARYA, J. et al. In vitro reactivation of sarin-inhibited human acetylcholinesterase (AChE) by bis-pyridinium oximes connected by xylene linkers. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 251–256, 2011.
- ALCÁCER, L. **Introdução à química quântica computacional**. Lisboa: IST Press, 2007. 305 p.
- ALCANTARA, M. R.; VANIN, J. A. Armas Químicas. **Química Nova** 1992, 15, 62.
- ALENCAR FILHO, E. B.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, B. G. A quantum chemical study of molecular properties and QSPR modeling of oximes, amidoximes and hydroxamic acids with nucleophilic activity against toxic organophosphorus agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, p. 338–347, 2017.
- ALVIM, R. S.; VAISS, V. S.; LEITÃO, A. A.; BORGES Jr., I. A Química Teórica a Serviço da Defesa Química: Degradação de Agentes Neurotóxicos em Superfícies de Óxido e Hidróxido de Magnésio. **Revista Virtual de Química**. 2014, 6 (3), 687-723.
- ARAÚJO, C. R. M. ; BASTOS, M. D. M. ; SANTOS, V. L. A. ; GONSALVES, A. A. . SÍNTESE DA OXIMA 3-FENILAMINO-2-OXIMA-3-METILBUTILACETATO, POTENCIAL REATIVADOR DA AChE INIBIDA POR ORGANOFOSFORADO. *Evolvere Scientia* , v. 3, p. 52-59, 2014.
- ARENA, J.M. **Poisoning, Toxicology, Symptoms, Treatments**. 4^aed., Springfield III, Charles C. Tomas, 1979.
- ARTURSSON E, ANDERSSON PO, AKFUR C, LINUSSON A, BORJEGREN S, EKSTROM F. Catalytic-site conformational equilibrium in nerve-agent adducts of acetylcholinesterase: possible implications for the HI-6 antidote substrate specificity. *Biochem Pharmacol* 2013; 85:1389-97.
- BAKOWIES, D.; THIEL, W. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 100 n. 25, p. 10580-10594, June 1996.
- BARBOSA, J. D. et al. Intoxicações com manifestações neurológicas em ruminantes. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Editora da UFPA, 2005. p. 1-10.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 300-310, jun. 1997.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

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

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

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

CHAUHAN, S. et al. Chemical warfare agents. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 113–122, 2008.

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

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

CUNHA X. S. da, S. F. et al. NMR determination of Electrophorus electricus acetylcholinesterase inhibition and reactivation by neutral oximes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 5923-5930, 2013.

DOS SANTOS, V. M. R. et al. COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS PENTAVALENTES: HISTÓRICO, MÉTODOS SINTÉTICOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES COMO INSETICIDAS E AGENTES ANTITUMORAIS. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.

ECKERT, W. Mass deaths by gás or chemical poisoning. A historical perspective. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v. 12, n. 02, p. 119- 125, 1991.

ELHALWAGY, M. E. A.; ZAKI, N. I. Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 219-224, 9// 2009. ISSN 1382-6689.

ELHANANY, E. et al. Resolving pathways of interaction of covalente inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. **Chem Res Toxicol**, v. 14, p. 912-918. 2001.

ELIAS, S. M. S. Introdução Geométrica à Mecânica Quântica: Átomo de Hidrogênio e Oscilador Harmônico. Dissertação (Dissertação em Química) -Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 84p. 2007.

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

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

FISHER, E. B.; van WAZER, R, J. R.; Use of Organic in phosphorus compounds and its compounds, Interscience: New York, 1897, vol. 2, p. 1961.

FITZGERALD. G.J. Chemical Warfare and Medical response during World War I. American Journal of Public Health, v. 98, n. 04, p. 611-625, 2008.

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.; GOMPERS, 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.

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

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

HALLAK, M. and GIACOBINI, E. Neuropharmacology 28, 199 (1989).

HEHRE, W.J.; DEPPMEIER, B.J.; KLUNZINGER, P.E. PC SPARTAN Pro. *Wave function Inc., Irvine, 1999.*

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

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

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

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

KASSA, J.; CABAL, J. A Comparison of the Efficacy of Acetylcholinesterase Reactivators against Cyclohexyl Methylphosphonofluoridate (GF Agent) by in vitro and in vivo Methods.

p. 41–45, 1999.

KASSA, J.; CABAL, J. A Comparison of the Efficacy of Acetylcholinesterase Reactivators against Cyclohexyl Methylphosphonofluoridate (GF Agent) by in vitro and in vivo Methods. p. 41–45, 1999.

KAVALCI, C.; DURUKAN, P.; OZER, M.; CEVIK, Y.; KAVALCI, G. Organophosphate poisoning due to a wheat bagel. *Internal Medicine* **2009**, *48*, 85.

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

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

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

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

KUCA, K; CABAL, J; KASSA, J; 2005. A comparison of the potency of newly developed oximes (K005, K027, K033, K048) and currently used oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* *68*, 677-86.

KUCA, K.; JUNA, D.; MUSILEK, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 269.

KUCA, K.; MUSILEK, K.; JUN, D.; KARASOVA, J.; SOUKUP, O.; PEJCHAL, J.; HRABINOVA, M. Structure-activity relationship for the reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agent VX. *Medicinal Chemistry* **2013**, *9*, 689.

KUCA, K. et al. Universality of oxime K203 for reactivation of nerve agent-inhibited AChE. *Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 7, p. 683–686, 2015.

KUSHIK, J; CHANDRABHAN, D. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica*, v. 14(3), p. 171-185. 2003.

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

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemistry in drug Discovery then and now. *Nature Reviews, Drug Discovery*, London, v. 3, n. 10, p. 853-862, Oct. 2004.

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

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

LYAGIN, I. V.; EFREMENKO, E. N. Biomolecular engineering of biocatalysts hydrolyzing neurotoxic organophosphates. **Biochimie**, v. 144, p. 115–121, 2018.

MACILWAIN, C. Study proves Iraq used nerve gas. *Nature* 363, 3, 1993.

MASSON, P.; NACHON, F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 26–40, 2017.

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

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

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

MOROKUMA, K. Oniom method and its applications to modeling of chemical and biological systems. Abstracts of papers of the american chemical society, v.228, p.266- phys. 2004.

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

NAGAO, M., TAKATORI, T., MATSUDA, Y., NAKAJIMA, M., IWASE, H., IWADATE, K., 1997. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 198–203.

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

OKUMURA, T. et al. Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. **Annals of Emergency Medicine**. v. 28, n. 02, p. 129-135, 1996.

OKUMURA, T., HISAOKA, T., YAMADA, A., NAITO, T., ISONUMA, H., OKUMURA, S., MIURA, K., SAKURADA, M., MAEKAWA, H., Ishimatsu, S., TAKASU, N., SUZUKI, K., 2005. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 471–476.

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

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

PATRICK, D. L.; FLANAGAN, J. Contact mechanics and bond rupture in chemical force microscopy: a study using atomistic molecular dynamics simulation. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, San Diego, v. 221, n. 1, p. U341-U341, Apr. 2001.

PETROIANU, G.A; NURULAIN, S.M; NAGELKERKE, N; SHAFIULLAH, M; KASSA, J; KUCA, K; 2007. Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon. *Journal of Applied Toxicology* 27, 453-7.

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

PITA, R. **Armas Químicas: la ciencia en manos del mal**. México: Plaza y Valdés S.L., 2008.

RAMALHO, T. C. et al. Computational Enzymology and Organophosphorus Degrading Enzymes: Promising Approaches Toward Remediation Technologies of Warfare Agents and Pesticides. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1041–1061, 2016.

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

REIS, C. A. G. Aplicação de uma nova proposta de discretização das equações Griffin-Wheeler-Hartree-Fock na geração de bases Gaussianas para cálculos de átomos e moléculas. Dissertação (Dissertação em Ciências: Físico-Química) – USP. São Carlos-SP, 71p, 2009.

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

RUSYNIAK, D.E.; NAÑAGAS, K.A. Organophosphate poisoning. **Semin Neurol**, v. 24(2), p. 197-204. 2004.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossary of terms in theoretical organic chemistry. *Química Nova*, São Paulo, v 25, n. 3, p. 5005-512, jun. 2002.

SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, H. Treatment of alzheimer's disease: current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, London, v. 2, n. 9, p. 539-547, Sept. 2003.

SCHecter, W.; FRY, D.E. The Surgeon and Acts of Civilian Terrorism: Chemical Agents. American College of Surgeons. v. 200, n. 1, p.128- 135. 2005.

SENN, H. M.; THIEL, W. QM/MM methods for biomolecular systems. **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 48, n. 7, p. 1198-1229, 2009.

SENTHILKUMAR, K. et al. Analysis of polarization in QM/MM modelling of biologically relevant hydrogen bonds. **Journal of the Royal Society Interface**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 207-216, Dec. 2008.

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

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

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

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

SMART, J.M. A History of Chemical and Biological Warfare: An American Perspective. In. SIDELL, F.R.; TAKAFUJI, E.T.; FRANZ, D.R. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC, Borden Institute, 1997. Capter 2.

SMITH, S. Mustard Gas and American Race- Based Human Experimentation in World War II. **Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 36, n. 03, p. 517-521, 2008.

SOGORB M.A., VILANOVA E & CARRERA V. (2004) Future application of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisoning. *Toxicol Lett* 151: 219–233.

SPIERS, J. A. (2000). New perspectives of vulnerability using emic and etic approaches. *Journal of Advanced Nursing*, 31, 715-721.

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

STOJILJKOVIC, M. P.; JOKANOVIC, M. Pyridinium oximes: rationale for their selection as casual antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, Zagreb, v. 57, p. 435-443, 2006.

SZINICZ, L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*. n. 214, p. 167-181, 2005.

TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 16, p. 151-166, 2002.

THOMAS, G. Química medicinal: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p.

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

TOY, D. F.; Phosphorus Chemistry in Everyday Living, American Chemical Society: Washington, D. C., 1976.

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

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: structure, function and genetics*, v. 52, p. 609-603, 2003.

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

WILSON, I. B.; GINSBURG, S. A powerful reactivator of alkylphosphateinhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1955**, 18, 168.

WOREK, F. et al. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 2237-2248, 2004.

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

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

***ARTIGO - SLIGHT DIFFERENCE IN THE ISOMERIC OXIMES K206 AND K203
MAKES HUGE DIFFERENCE FOR THE REACTIVATION OF
ORGANOPHOSPHORUS-INHIBITED ACHE: THEORETICAL AND EXPERIMENTAL
ASPECTS***

Abstract: Experimental and theoretical studies with oximes have been extensively developed to create and identify new molecules, reactivators with better efficiency, and greater spectrum of action among the known nerve agents. In this study, we aimed to analyze the influence of a group position change in the pyridinium ring, at the non - reactant extremity (carbamoyl group), of two isomeric oximes, K203 and K206, in the reactivation rate of *Mus musculus* AChE, inhibited by different nerve agents. Theoretical molecular docking and hybrid QM/MM calculations were performed to assess the difference between oxime activity with inhibited AChE-complexes, in addition to understanding the factors that govern this difference. Comparing experimental with the obtained data, it was possible to observe that this slight modification at the carbamoyl group position results in distinct reactivation rates for the same inhibited enzyme-complex, furthermore, this chain change between the two oximes interferes significantly in both energy interaction enzyme-complex-inhibitor-oxime, such as alteration of the activation energy barrier.

Keywords: K203; K206; nerve agents; reactivator; mechanistic studies

Introduction

Chemical warfare agents (CWA) are defined as any substance which, because of its toxic properties, whether gaseous, liquid or solid, can cause harm to humans, animals and plants. In a military context, they would be substances destined to cause death, damage to the health or incapacity of individuals in wars, military operations, among other scenarios [1–3]. After many armed conflicts and episodes of CWA being used, with intent to stop the use of this kind of mass destruction weapon, administered by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) located in The Hague, Netherlands, the Chemical Weapons Convention (CWC) was created in 1993 and it came to force in 1997, where 170 countries signed the treaty agreeing to destroy existing chemical weapons stocks within a ten-year period [4–6]. Many toxic substances are known, but only a few are classified as CWA by the CWC, due to a number of characteristics such as high toxicity, rapidity of action after dissemination, imperceptibility to senses and persistence. Despite the agreement, many of these substances have great agricultural and industrial importance, being difficult to replace such products for new compounds with the same action and efficiency. [7].

Among these classes, the most dangerous and toxic to humans are the nerve agents. Nerve agents have as their base structure organophosphorus compounds (OP), which is also the structure of several pesticides. Pesticides based on OP are of major agroindustrial importance and among the most used pesticides, especially in third world countries [8]. Poisoning by OP may occur through skin contact, oral use and respiratory tract. The OPs act by inhibiting, in an irreversible form, the enzyme Acetylcholinesterase (AChE), responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in acetate and choline. ACh is responsible for the synapse in the nerve endings of the skeletal muscle, it also plays an important role in central nervous system, still not very clear [9]. The accumulation of the neurotransmitter at the central and peripheral cholinergic site results in an over-stimulation of the cholinergic receptors. The main symptoms of poisoning are excessive salivation, lacrimation, urination, defecation, sweating, broncho-constriction, neuromuscular block, the last one especially affecting the muscles responsible for respiration, leading to death [9–11].

AChE has an active site where the hydrolysis by serine residues occurs at the bottom of a gorge and a peripheral site at the beginning of that gorge which assists in the orientation of charged groups within the site [12]. The active site, in *Mus musculus*, is composed of the triad Ser203, Glu334 and His447, and the hydrolysis of the neurotransmitter ACh occurs by

the addition of this serine residue to the substrate carbonyl. In the presence of OPs, this residue spontaneously reacts with the phosphorus atom forming a phosphorylated complex. The phosphorylated enzyme reacts slowly with water, allowing the dealkylation of phosphorus in a process called aging, that makes AChE inhibition irreversible (Figure 1) [2,13].

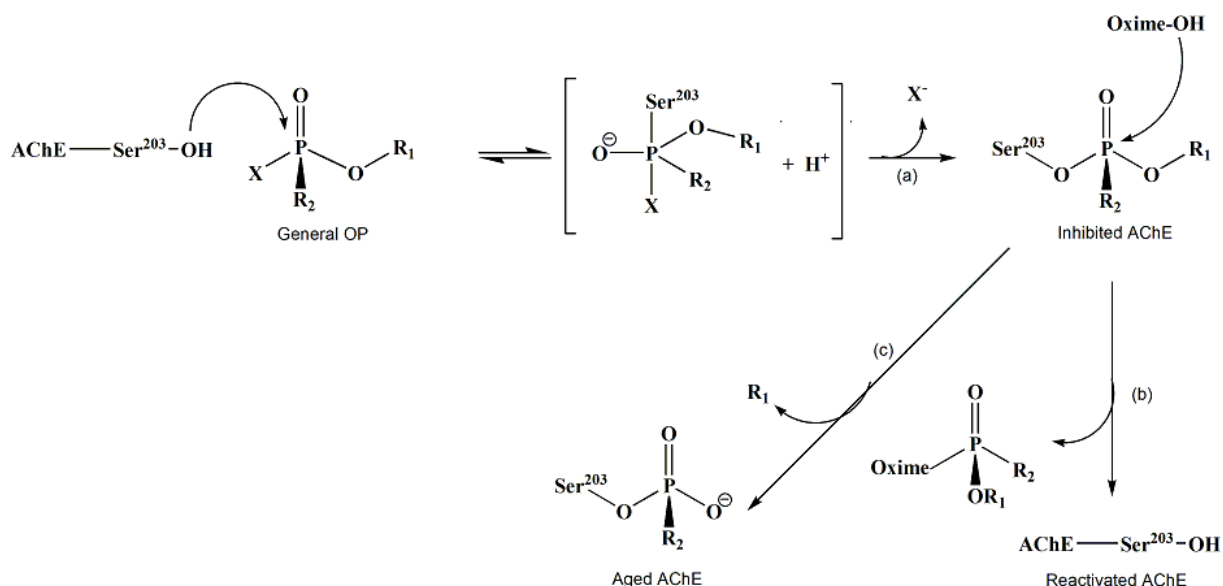


Figure 1. (a) Inhibition process, where the formation of inhibited enzyme complex occurs through the phosphorylation of the residue Ser203; (b) Reactivation process, where the oxime makes a nucleophilic attack to the OP, releasing the reactivated enzyme and the oxime-OP complex; (c) Aging process, where the dealkylation of the OP bound to the enzyme occurs, releasing a radical and forming the aged enzyme, a process that is irreversible.

It is estimated that approximately 3 million cases of OP poisoning, including accidental contamination due to misuse of these substances in agricultural activities and suicide attempts, occur in the world annually, in addition to about 260 000 deaths within the same period of time[14,15]. Nerve agents have been used over the years in armed conflicts and terrorist attacks such as the use of Sarin (GB) and Tabun (GA) in the 1980s in the Iraq war, GB and VX were used in terrorist attacks in Japan in 1994 and 1995. In the Syrian war, in 2013, it was used GB, affecting troops and several civilians and the most recent famous case, in 2017, the murder of Kim Jong-nam in Malaysia with VX[16]. Knowing the large number of cases of pesticide poisoning and large stocks of still available nerve agents, besides possibly leaking inventory found in excavations and constructions that can contaminate humans and environment, poisoning by OP is a global concern[17–20].

The current treatment protocol for OP poisoning is the use of two classes of drugs concurrently: a competitive muscarinic receptor antagonist such as atropine, which blocks the

effects of over-stimulation caused by the ACh accumulation; and the use of a reactivating substance, generally an oxime class compound, which through a nucleophilic attack is able to restore the AChE catalytic activity, attenuating the effects of the poisoning until the OPs are degraded and AChE levels reestablished[21–23]. According to Chakravorty, the name oxime is the contraction of oxy-imine[24]. Oximes possess great intrinsic hydrolytic stability, being an important property for the pharmacological use of these substances. Oximes are usually differentiated by the number of pyridinium rings (monopyridinium and bispyridinium oximes) and by the position of the oxime group on the pyridinium ring[25,26].

Unfortunately, there is no universal antidote, a broad-spectrum oxime capable of reactivating all types of OP-inhibited AChE. In recent years, efforts have been focused on the screening and identifying of better oximes, with high permeabilities in the blood brain barrier, maintaining a high rate of reactivation[21,27,28]. The efficiency of the reactivation is primarily dependent on the nucleophilic displacement rate of the organophosphorus, but other factors also interfere with the efficiency as the organophosphate bound structure, enzyme source, oxime structure, nucleophilic force of the oxime group, reactivator concentration in the tissue and post-inhibitory dealkylation rate[26,29,30]. Thus, knowing the importance of structural parameters for the efficiency of oxime reactivation, the objective of this work is to evaluate and compare the influence of the non-attacking extremities of oximes K203 and K206 (Figure 2) on the rate of AChE reactivation inhibited by different nerve agents.

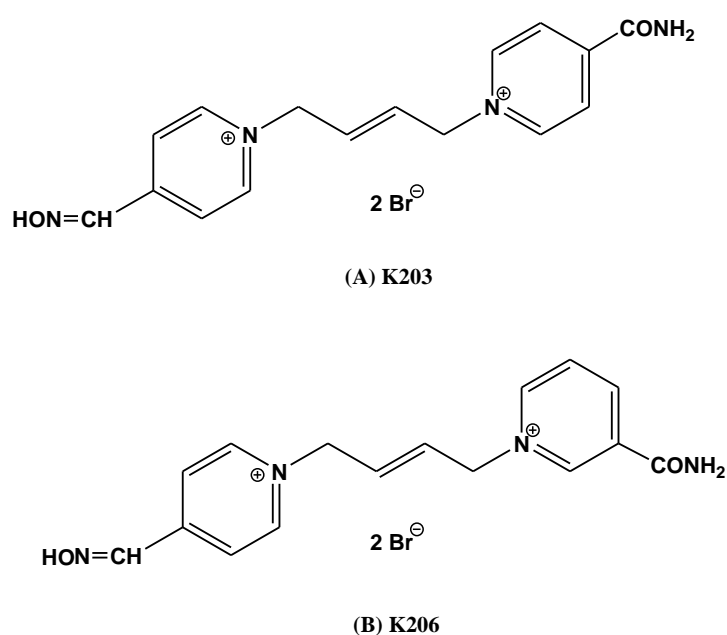


Figure 2. Structures of oximes K203 (A) and K206 (B).

Methods

Experimental Part

Oximes K203 [(*E*)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide] and K206 [(*E*)-1-(3-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide] were prepared at department of Toxicology in Faculty of Military Health Sciences (Czech Republic), according to the synthesis described earlier[31]. The reactivators purity were detected through TLC and HPLC technique and NMR[32]. All nerve agents were obtained from the Military Facility Brno (95% purity and higher).

The animals used in this study were handled under the supervision of the Ethics Committee of the Faculty of Military Health Sciences in Hradec Kralove, Czech Republic. As source of cholinesterases, the 10% rat brains homogenate (w/v) were used. The homogenate was prepared as described: Ether-narcotized rats (n=6) were killed by bleeding from a carotid artery. Brain was removed, washed with saline and homogenized using an Ultra-Turrax homogenizer, in distilled water.

For *in vitro* test, 0.5 mL of brain homogenate was mixed with 20 μ L of isopropanol solution of selected nerve agent and distilled water (0.5 mL). The mixture was incubated for 30 minutes at 25 °C to achieve 95% inhibition of AChE. 2.5 mL of sodium chloride (3 M) and distilled water were added to a volume of 23 mL. Finally was added 2 mL of the substrate – acetylcholine iodide (0.02 M). The enzyme activity (analyzed by potentiometric titration of decomposed acetylcholine iodide) was measured at pH 7.6 and 25 °C on an autotitrator RTS 822 (Radiometer, Denmark). The same procedure was taken with inhibited-enzyme and further treatment for 10 min incubation with an aqueous solution of the reactivator (0.2 mL of 10^{-3} M), which replaced 0.2 mL of water. Activities of intact AChE (a_0), inhibited AChE (a_i) and reactivated AChE (a_r) were deduced from the consumption of NaOH solution (0.01M) with time; NaOH reacted with released acetate from decomposed acetylcholine iodide. The percentage of reactivation (%) was calculated from the measured data according to the formula:

$$X = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i}\right) \cdot 100 \quad [\%]$$

The whole method is described in detail in the work of Kuca and Cabal[33].

Docking procedure

For molecular docking studies, the oximes K203 and K206 and the crystal structure of *Mus musculus* acetylcholinesterase (*MmAChE*), in the non-aged form, inhibited by GB and HI-6 oxime docked into the cavity, obtained from the RCSB Protein Data Bank website (PDB code: 5FPP)[34] were employed. The 3D structures of K203 and K206 oximes were constructed in PC Spartan Pro[®] software[35], followed by DFT level optimization using B3LYP density functional and 6-31G(d,p) basis set, through Gaussian 09 package[36]. The partial charges of the atoms were elucidated through the Chelpg method. AChE structures inhibited by the other nerve agents, GA, Cyclosarin(GF) and VX, were obtained through PC Spartan Pro[®] software, with subsequent minimization of structures. Docking calculations were performed using the software Molegro Virtual Docker[®] (MVD)[37]. Molecular docking softwares uses scoring functions to estimate the binding energy of the ligand-receptor complex. The algorithms evaluate factors such as intra and intermolecular interactions, desolvation and entropic effects. The MVD software uses the MolDock algorithm, which has force-field-based scoring functions, which obtains the score value by summing the contributions of bonded terms (bond stretching, angle bending and dihedral variation) and non-bonded terms (electrostatic and van der Waals interactions) into a major general function. MolDock uses a heuristic search algorithm, which combines cavity prediction and differential evolution algorithms. Its scoring function is derived from piecewise linear potential[38,39]. The molecular docking technique was performed to predict the interaction modes between AChE and the studied oximes, finding this way the best ligands poses in the inhibited enzymes complexes cavity. For the calculations, only one enzyme chain was considered (monomer A) and water molecules were excluded using the MVD software. Residues within a radius of 12 Å were considered flexible, from the cavity center. For each ligand, 100 poses (conformation and orientation) were generated. The best pose of each ligand was chosen based on the best interaction energies with the enzyme, taking into account good overlap of the ligand chain with the crystallographic HI-6 oxime chain.

QM/MM procedure

Due to the large number of atoms present in the studied system, a huge computational demand is associated to these systems, being impossible the treatment of such molecular complexes with quantum mechanics (QM). On the other hand, certain covalent bonds re-

arrangements can not be ignored and treated only with molecular mechanics (MM). Thus, a hybrid method of quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) is used to study the pathway in which the process of the enzyme-OP complex reactivation by oximes occurs.[40]. Basically, the QM/MM approach consists of delimiting a small portion of the system, an essential portion for the chemical reaction, which is treated for example with DFT method, which computes well electronic correlations where bond breaking and formation processes occur, and the rest of the system is treated with molecular mechanics method[41]. From the selected molecular docking calculations, QM/MM calculations were performed to determine the energetic barrier of the reactivation process of each enzyme-OP complex with both target oximes of this work. This theoretical strategy has previously been employed on other occasions[41–45]. The QM part of the calculations were performed through Gaussian 09 package, using density function theory (DFT) level and basis set 6-31G(d,p). DFT methods have been widely used, showing good results for large systems such as biomolecules[46,47]. This relationship of functional and basis sets has been tested for similar systems[48–50]. The delimited QM region includes: the Ser203 residue bound to the respective OP, the residues Tyr124, Glu285, Trp286, Ser298, Tyr337 and Tyr341, in addition to one of the oximes. In the simulation of the reaction mechanism, all precursors, transition states and intermediates were calculated and characterized identifying imaginary frequencies[49,51,52]. Each system was fully optimized at DFT level with conjugate gradient and quasi-Newton-Raphson algorithms. The final geometries were obtained with the density functional Becke's three-parameter exchange functional and the gradient-corrected functional of Lee, Yang and Paar (B3LYP)[50,53], using 6-31g (d, p) basis set.

Results and Discussion

***In vitro* test: experimental results**

The results obtained obtained through the experimental part of this study, are summarized in Table 1.

Table 1. Reactivation activity of oximes K203 and K206.

	K203	K206
System	React. (%) Conc. 10⁻³ M	React. (%) Conc. 10⁻³ M
AChE-GA	55	10
AChE-GB	36	40
AChE-GF	4	0
AChE-VX	62	24

As described in the literature, the minimum rate of reactivation of an oxime is considered at least 10% to it be able to save an intoxicated organism[54]. Thus, it is possible to observe that both oximes have the potential to reactivate the studied enzymes, with the exception of GF. It is well known that reactivators with the oxime group at the position 4 do not have good activity in the reactivation of GF-inhibited AChE[55,56]. Opposite to this, the oxime group at the position 4 has been shown to be preferential for reactivation of GA-inhibited AChE[57]. In addition, the literature states that AChE inhibited by GB and VX has no preferred position for the oxime group in the reactivation process[58,59]. This information is in agreement with the obtained results, as it can be seen from Table 1, because both K203 and K206 had almost no activity for GF-inhibited AChE reactivation, whereas in at least one of the inhibitors were significant reactivation rates by the oximes.

At the concentration tested, K203 had impressive results for GA-inhibited AChE, showing a reactivation rate of 55%, corroborating with the trend of previous studies, showing to be currently, one of the most promising reactivators for this inhibitor[44]. As mentioned in the previous paragraph, the results presented in Table 1 show that both inhibitors, GB and VX, have no preference for position of the oxime group in the selectivity of the reactivation process. Both reactivators presented good results in the reactivation of these inhibitors, highlighting the reactivation of VX-inhibited AChE by K203, presenting the highest reactivation value among the studied systems. This difference in the activity rates of the oximes in the reactivation gives indications that the slight structural difference strongly influences the performance of these reactivators, observed as an example the values of 62 and 24% AChE reactivation inhibited by VX, respectively for K203 and K206. Forward,

thermodynamic and kinetic parameters that influence the experimental results observed, will be studied theoretically.

Investigating thermodynamics parameters for biological activity: Docking results

At first, molecular docking calculations were performed in order to investigate the affinity between oximes and inhibited-AChE. For this, a cavity prediction algorithm, based on a 3D box was used to find binding sites in the active site of the inhibited enzyme. Among the cavities found, there was a small volume variation between the systems, from 113.1 to 126.4 Å³. In figure 3, it is possible to observe that the studied cavity supported the oximes to dock into two different orientations. Despite the two possibilities, in general, all systems had a lower ligand interaction energies for the red orientation in Figure 3. In addition, this orientation is the same as the crystallographic HI-6 oxime, that was docked in the starting structure of this study. Thereby, all the systems were studied using the orientation represented in red in the figure, due to their better interaction with the ligands.

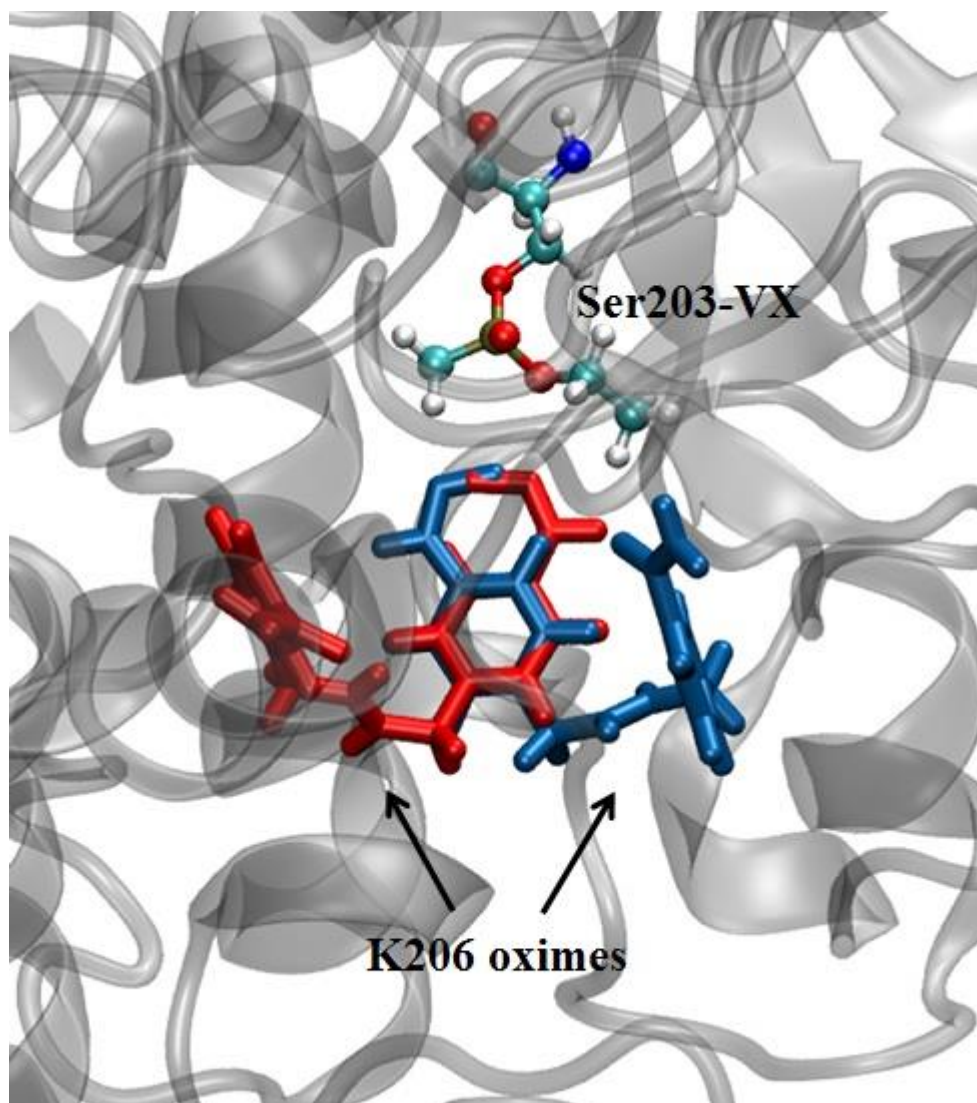


Figure 3. The calculated cavity with crystallographic orientation of the oxime on the left, and an alternative orientation on the right.

After the docking calculations, there were generated several poses of the oximes within the cavities of the inhibited complexes and their respective intermolecular interaction energies. Generally, the lowest energy conformers are chosen for subsequent quantum-mechanical calculations, however, the lower energy structures are not always the representative conformations of the system [60]. Thus, from the docking results, the best conformer of each system was chosen, based on only in the lower energies of intermolecular interaction, but considering also orientation and overlapping of the K203 and K206 structures with the HI-6 crystallographic structure. Table 2 and Table 3 show the obtained values from the docking calculation of the most appropriated K203 and K206 poses with the different inhibited complexes.

Table 2. Docking results for K203 inside different AChE-OP complexes.

System	Residue	Strength Bond (kcal.mol⁻¹)	ΔE^* (kcal.mol⁻¹)
AChE-GA	Ser298	-2,5	-74,68
	Ser298	-1,27	
	Tyr124	-0,53	
AChE-GB	Tyr124	-0,70	-40,94
	Gly121	-0,08	
AChE-GF	Ser298	-1,47	-84,74
	Tyr124	-1,07	
	Glu285	-0,05	
AChE-VX	Ser298	-2,48	-78,25
	Tyr124	-1,08	

* ΔE =Energy of intermolecular interaction.

Table 3. Docking results for K206 inside different AChE-OP complexes.

System	Residue	Strength Bond (kcal.mol⁻¹)	ΔE (kcal.mol⁻¹)
AChE-GA	Arg296	-2,21	-66,88
	Tyr124	-1,47	
	Tyr124	-0,59	
AChE-GB	Phe295	-2,5	-55,53
	Tyr124	-1,39	
AChE-GF	Arg296	-2,5	-71,99
	Tyr124	-0,69	
AChE-VX	Tyr124	-1,18	-73,29
	Glu285	-0,58	

Data reported in Tables 2 and 3 show that both oximes have good interaction with the complex inhibited-enzyme's site, for all OPs. This feature can be checked by the negative ΔE values for all systems. In addition, it is possible to notice a certain trend in the interaction of oximes with the different systems, for example AChE-VX and AChE-GF, which presented the lowest intermolecular interaction energy values for both K203 and K206. Likewise, we can observe a tendency of the AChE-GB system to have higher interaction values, especially with K203, which also has weak interactions with amino acid residues of the active site of the enzyme, thus being able to explain its higher interaction energy in relation to the same system with the K206. Intermolecular interactions are responsible for the stabilization of the ligand within the enzyme site. Hydrogen interactions are generally the most important in studies of biological systems, but other factors such as electrostatic and hydrophobic interactions have contributed to the final value of interaction energy. It is worth mentioning that in all systems, both oximes perform interactions with the residue Tyr124. The literature describes this interaction as a possible π - π stacking, occurring between Tyr124 residue and the pyridine ring, and it is described as an important interaction for the stabilization of the transition state[2,49,61].

Different inhibitors result in different cavities for the ligand docking. In order to evaluate the influence of the position change of the carbamoyl group, the structure and energy parameters of the docking of the oximes with the same inhibitor (Figure 4) were compared.

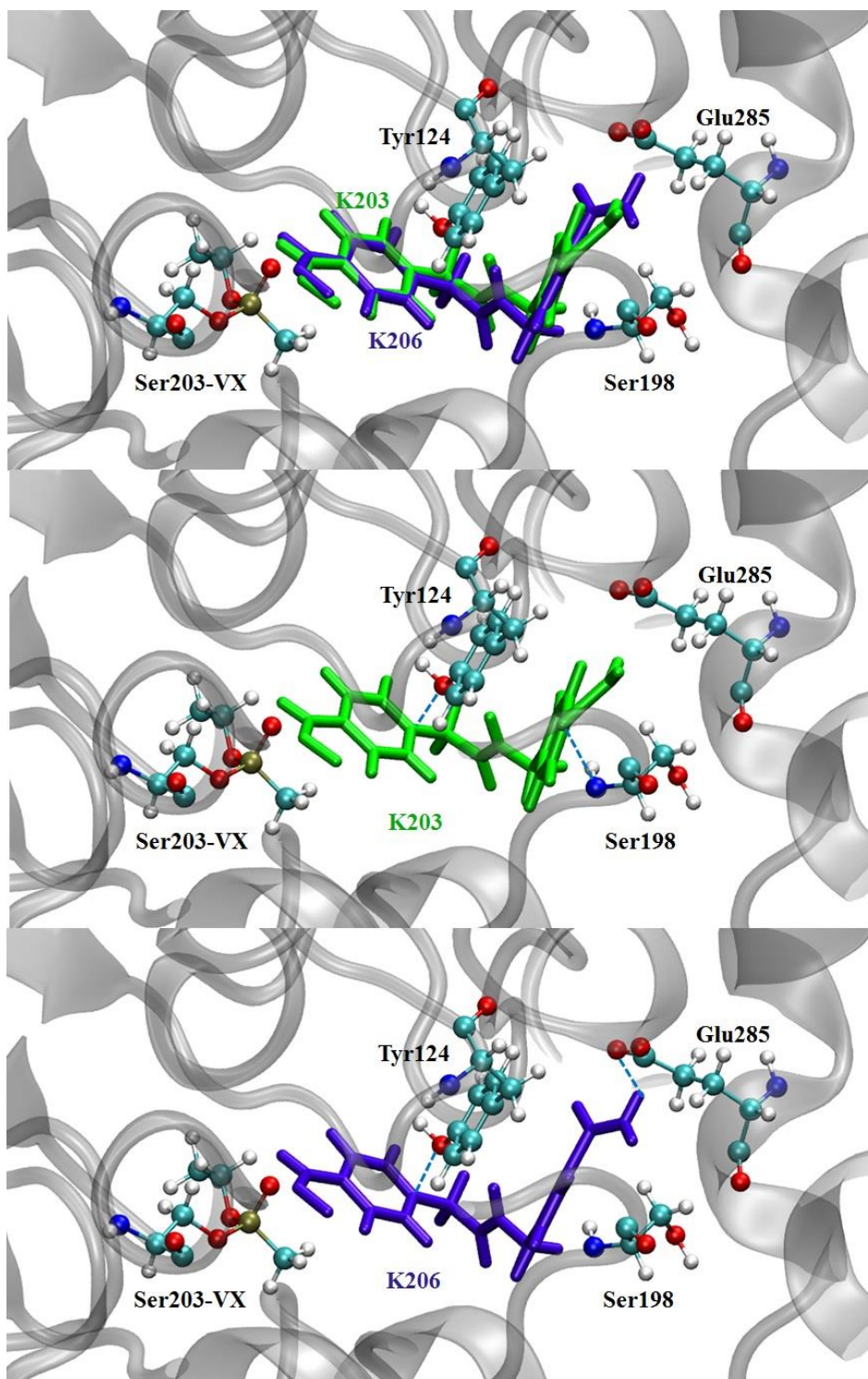


Figure 4. Structures of docked oximes and important residues of AChE-VX. (A) K203 (red) and K206 (yellow) overlapped; (B) K203 and residues interaction; (C) K206 and residues interaction.

In Figure 4, it is possible to observe the spatial coordinates of K203 (red) and K206 (yellow), docked at the AChE-VX active site. Both have roughly the same coordinates, with a

main difference in the carbamoyl group. In spite of the great similarity between the two structures and the way they fit in the cavity, they have different interactions with amino acid residues with different intensities and slightly different intermolecular interaction energy values are observed, being the smaller one for the system with the K206, whose contribution of the residues to stabilization is higher, as observed in Tables 2 and 3.

Table 4 and Table 5 display the experimental values of the reactivation rate of oximes for the different inhibitors [62]. It is important to note that the interaction energy results do not explain the experimental results satisfactorily. By performing a linear regression with the reactivation rate by the interaction energy, correlation values (r^2) equal to 0.01 and 0.51 are obtained for K203 and k206, respectively.

Investigating kinetics parameters for biological activity: Relative activation energy

In this context, theoretical calculations were carried out to determine the relative activation energy $\Delta\Delta E^\ddagger$ related to each system studied, where ΔE^\ddagger values were compared between the transition states and the initial system configuration from the reactants.

For the study of the reactivation reaction mechanism, it is important to consider steric and electronic effects of the chemical reactions. For this, a combined procedure of docking and DFT calculations at the interface QM/MM for the mechanism were carried out, the transition states were characterized through the calculation of potential energy curves. Tables 4 and 5 show the kinetic parameters $\Delta\Delta E^\ddagger$, the experimental values of reactivation of K203 and K206 at the concentration of 10^{-3} mol.L⁻¹ and the respective imaginary frequencies that characterize the structures of each transition state.

Table 4. Experimental results, intermolecular interaction energy, relative activation energy for K203.

System	React. (%) Conc. 10⁻³ M	ΔE (kcal.mol⁻¹)	ΔΔE[#] (kcal.mol⁻¹)	Frequency (cm⁻¹)
AChE-GA	55	-74.68	14.70	i291.26
AChE-GB	36	-40.94	30.01	i301.49
AChE-GF	4	-84.74	25.44	i226.38
AChE-VX	62	-78.25	0	i201.62

Table 5. Experimental results, intermolecular interaction energy, relative activation energy for K206.

System	React. (%) Conc. 10⁻³ M	ΔE (kcal.mol⁻¹)	ΔΔE[#] (kcal.mol⁻¹)	Frequency (cm⁻¹)
AChE-GA	10	-66.88	28.13	i190.11
AChE-GB	40	-55.53	32.61	i308.33
AChE-GF	0	-71.99	35.99	i89.49
AChE-VX	24	-73.29	0	i279.59

Considering $\Delta\Delta E^\#$, by performing a linear regression between this parameter and the reactivation rate, we obtained correlation values of 0.54 and 0.05 respectively for K203 and K206. This results make clear that neither ΔE nor $\Delta\Delta E^\#$ individually explain the experimental results. With the increase of the number of descriptors of the system, a better correlation between theory and experiment is expected. Based on this, a multiple linear regression (MLR) of the reactivation rate by the ΔE and $\Delta\Delta E^\#$ values was performed. Thus, two line equations, each representing the efficiency of each oxime for the different inhibitors, were obtained with correlation values 0.86 and 0.95 for K203 and K206, respectively. The equations of the straight lines are arranged to follow (Equations 1 and 2).

$$\%reactivation = 0.87\Delta E - 2.09\Delta\Delta E^\# + 136.97 \text{ (1)}$$

$$\%reactivation = 2.31\Delta E - 0.80\Delta\Delta E^\# + 193.09 \text{ (2)}$$

Equations 1 and 2 refer to K203 and K206, respectively. By analyzing the equations some important characteristics of the studied systems are obtained. Beginning with the correlation values were better for the MLR than the simple linear regressions, showing that the docking conjugated to QM/MM calculations reveal a better representation of these systems. Focusing on the coefficients of the equations, it is also possible to evaluate the importance of each stage for the reactivation process of AChE by these oximes. In Equation 1, the highest modulus of the coefficient of the term $\Delta\Delta E^\ddagger$ gives indications that the reaction step has a greater weight for AChE reactivation than the interaction step for K203. The inverse is observed in Equation 2, where the term that accompanies ΔE has a greater weight, indicating that the interaction stage could be more significant for K206 in the reactivation process than the reactivation efficiency. This means that K206 can slightly more easily fit to the transition state structure in the reactivation process of AChE than K203. However, the binding mode of K206 is critical for the oxime activity.

In line with our theoretical findings indicate that both steps, interaction and reactivation, play an important role in the reactivation process. On the other hand, it is possible to observe in Tables 4 and 5 a tendency of the reactivation values to increase as the interaction energy values decrease. For example, comparing the two oximes, for the AChE-GA complex with the reactivation values of 10 and 55%, the ΔE values are -66.88 and -74.68 kcal.mol⁻¹ for K206 and K203, respectively. There is also a tendency to increase reactivation with the activation energy barrier decrease. For example, for the AChE-GA complex, where the reactivation rate is 10 and 55%, the relative activation energy barrier is 28.13 and 14.70 kcal.mol⁻¹ for K206 and K203, respectively.

Conclusions

We tested *in vitro* efficiency and applied computational calculation methods on two isomeric oximes, K203 and K206, in order to evaluate the kinetic factors and interactions that govern the AChE enzyme reactivation process inhibited by different nerve agents and the influence of the carbamoyl group position change on the pyridinium ring. Our theoretical results indicate that the change in the position of the carbamoyl group on the pyridinium ring from 4 to 3 for K203 and K206, respectively, generates some differences in the intermolecular interaction of the oxime with the inhibited enzyme, since some changes in the spatial coordinates, which can influence in the accommodation in the site as well as in the amount and intensity of interactions with amino acid residues, resulting in differences in the total interaction energy value. The results also indicate that the structural difference between the oximes influences the reactivation reaction occurring within the enzyme due to different modes of electrostatic and electronic interaction. Our experimental results show that neither K203 nor K206 can be considered broad-spectrum reactivators, but they are potential reactivators for specific inhibitors. K203, as reported in the literature, has been shown to be one of the most promising reactors for AChE inhibited by GA. A suggestion for future studies may be the addition of a substituent, for example Fluor, in one of the pyridine rings, with the intention of increasing the permeability of this molecule in the blood brain barrier, allowing

better rates of reactivation with lower concentrations, thus avoiding side effects that the high concentration of this drug can cause in living beings. The search for a universal reactivator is still objective for future studies.

References

1. Sadik OA, Land WH, Wang J. Targeting Chemical and Biological Warfare Agents at the Molecular Level. *Electroanalysis*. 15(14), 1149–1159 (2003).
2. De Giacoppo JOS, De Lima WE a, Kuca K, Da Cunha EFF, França TCC, De Ramalho TC. Chemical warfare: Perspectives on reactivating the enzyme acetylcholinesterase inhibited by organophosphates . *Rev. Virtual Quím*. 6(3), 653–670 (2014).
3. Spiers J. New perspectives on vulnerability using emic and etic approaches. *J. Adv. Nurs*. 31(3), 715–721 (2000).
4. França TCC, Silva GR, Castro AT De. Chemical Defense: A new subject in the Chemical Teaching. *Rev. Virtual Química*. 2(2), 84–104 (2010).
5. Gravett MR, Hopkins FB, Self AJ, Webb AJ, Timperley CM, Baker MJ. Evidence of VX nerve agent use from contaminated white mustard plants. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci*. 470(2168), 20140076–20140076 (2014).
6. Chauhan S, Chauhan S, D’Cruz R, *et al*. Chemical warfare agents. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 26(2), 113–122 (2008).
7. Ganesan K, Raza S, Vijayaraghavan R. Chemical warfare agents. *J. Pharm. Bioallied Sci*. 2(3), 166–178 (2010).
8. El-Ebiary AA, Elsharkawy RE, Soliman NA, Soliman MA, Hashem AA. N - acetylcysteine in Acute Organophosphorus Pesticide Poisoning: A Randomized, Clinical Trial. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 119(2), 222–227 (2016).
9. Black RM, Read RW. Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch. Toxicol*. 87(3), 421–437 (2013).
10. Dong H, Weng YB, Zhen GS, *et al*. Clinical emergency treatment of 68 critical patients with severe organophosphorus poisoning and prognosis analysis after rescue. *Med. (United States)*. 96(25), 9–12 (2017).
11. Kassa J, Korabecny J, Nepovimova E, Jun D. The influence of modulators of acetylcholinesterase on the resistance of mice against soman and on the effectiveness of antidotal treatment of soman poisoning in mice. *J. Appl. Biomed*. (2016), 1–5 (2016).
12. De Koning MC, Joosen MJA, Worek F, *et al*. Application of the Ugi Multicomponent Reaction in the Synthesis of Reactivators of Nerve Agent Inhibited Acetylcholinesterase. *J. Med. Chem*. 60(22), 9376–9392 (2017).
13. Dos Santos VMR, Donnici CL, DaCosta JBN, Caixeiro JMR. COMPOSTOS

ORGANOFOSFORADOS PENTAVALENTES: HISTÓRICO, MÉTODOS SINTÉTICOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES COMO INSETICIDAS E AGENTES ANTITUMORAIS. *Quim. Nova.* 30(1), 159–170 (2007).

14. Terekhov SS, Palikov VA, Palikova YA, *et al.* Application of Tetrameric Recombinant Human Butyrylcholinesterase as a Biopharmaceutical for Amelioration of Symptoms of Acute Organophosphate Poisoning. *Bull. Exp. Biol. Med.* 163(4), 430–435 (2017).
15. Kumar G K R, S N, M R, Virupakshappa V. Clinical Pattern and Outcome of Organophosphorus Compound Poisoning. *J. Evol. Med. Dent. Sci.* 5(47), 3030–3033 (2016).
16. Masson P, Nachon F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *J. Neurochem.* 142, 26–40 (2017).
17. Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68(11), 2237–2248 (2004).
18. Li C, Srivastava RK, Athar M. Biological and environmental hazards associated with exposure to chemical warfare agents: arsenicals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1378(1), 143–157 (2016).
19. Wilson C, Main MJ, Cooper NJ, Briggs ME, Cooper AI, Adams DJ. Swellable functional hypercrosslinked polymer networks for the uptake of chemical warfare agents. *Polym. Chem.* 8(12), 1914–1922 (2017).
20. Silva GR, Borges I, Figueroa-Villar JD, De Castro AT. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. *Quim. Nova.* 35(10), 2083–2091 (2012).
21. Malfatti MA, Enright HA, Be NA, *et al.* The biodistribution and pharmacokinetics of the oxime acetylcholinesterase reactivator RS194B in guinea pigs. *Chem. Biol. Interact.* 277, 159–167 (2017).
22. Herbert J, Thiermann H, Worek F, Wille T. Precision cut lung slices as test system for candidate therapeutics in organophosphate poisoning. *Toxicology.* 389, 94–100 (2017).
23. Alencar Filho EB, Santos AA, Oliveira BG. A quantum chemical study of molecular properties and QSPR modeling of oximes, amidoximes and hydroxamic acids with nucleophilic activity against toxic organophosphorus agents. *J. Mol. Struct.* 1133, 338–347 (2017).
24. Chakravorty A. Structural chemistry of transition metal complexes of oximes. *Coord. Chem. Rev.* 13(1), 1–46 (1974).
25. Kalia J, Raines RT. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47(39), 7523–7526 (2008).
26. Kassa J, Kuca K, Bartosova L, Kunesova G. The Development of New Structural Analogues of Oximes for the Antidotal Treatment of Poisoning by Nerve Agents and the Comparison of Their Reactivating and Therapeutic Efficacy with Currently Available Oximes. *Curr. Org. Chem.* 11(3), 267–283 (2007).

27. Kuča K, Kassa J. A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime - 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18(6), 529–535 (2003).
28. Delfino RT, Ribeiro TS, Figueroa-Villar JD. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Sect. Title Toxicol.* 20(3), 407–428 (2009).
29. Čalić M, Vrdoljak AL, Radić B, *et al.* In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology.* 219(1–3), 85–96 (2006).
30. Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* 40(6), 803–816 (2002).
31. Musilek K, Holas O, Kuca K, *et al.* Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23(1), 70–76 (2008).
32. Jun D, Stodulka P, Kuca K, Dolezal B. High-performance liquid chromatography analysis of by-products and intermediates arising during the synthesis of the acetylcholinesterase reactivator HI-6. *J. Chromatogr. Sci.* 48(8), 694–696 (2010).
33. Kuča K, Cabal J. Evaluation of Newly Synthesized Reactivators of the Brain Cholinesterase Inhibited by Sarin Nerve Agent. *Toxicol. Mech. Methods.* 15(4), 247–252 (2005).
34. Allgardsson A, Berg L, Akfur C, *et al.* Structure of a prereaction complex between the nerve agent sarin, its biological target acetylcholinesterase, and the antidote HI-6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113(20), 5514–5519 (2016).
35. Hehre, W J. Deppmeier, B J. Klunzinger PE. PC Spartan Pro. (1999).
36. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ort and DJF. Gaussian 09, Revision A.02. (2016).
37. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* 49, 3315–3321 (2006).
38. Ferreira L, dos Santos R, Oliva G, Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules.* 20(7), 13384–13421 (2015).
39. Dos Reis MBG, Manjolin LC, Maquiaveli CDC, Santos-Filho OA, Da Silva ER. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (-)-epicatechin: A comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. *PLoS One.* 8(11) (2013).
40. Nemukhin A V., Grigorenko BL, Morozov DI, Kochetov MS, Lushchekina S V., Varfolomeev SD. On quantum mechanical-molecular mechanical (QM/MM) approaches to model hydrolysis of acetylcholine by acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 203(1), 51–56 (2013).

41. Da Silva Gonçalves A, França TCC, Caetano MS, Ramalho TC. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: Reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32(2), 301–307 (2014).
42. Matos K, Cunha E, Abagyan R, Ramalho T. Computational Evidence for the Reactivation Process of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Carbamates. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 17(6), 554–564 (2013).
43. Ramalho TC, Caetano MS, da Cunha EFF, Souza TCS, Rocha MVJ. Construction and assessment of reaction models of class i epsp synthase: Molecular docking and density functional theoretical calculations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27(2), 195–207 (2009).
44. Kuca K, Musilek K, Jun D, *et al.* A newly developed oxime K203 is the most effective reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 19(1), 1–10 (2018).
45. Heyden A, Lin H, Truhlar DG. Adaptive partitioning in combined quantum mechanical and molecular mechanical calculations of potential energy functions for multiscale simulations. *J. Phys. Chem. B.* 111(9), 2231–41 (2007).
46. Besler BH, Merz KM, Kollman PA. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 11(4), 431–439 (1990).
47. Singh UC, Kollman PA. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5(2), 129–145 (1984).
48. Rutkowska-Zbik D, Witko M. Following nature-Theoretical studies on factors modulating catalytic activity of porphyrins. *J. Mol. Catal. A Chem.* 258(1–2), 376–380 (2006).
49. Giacoppo JOS, França TCC, Kuča K, *et al.* Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33(9), 2048–2058 (2015).
50. da Cunha EFF, Barbosa EF, Oliveira AA, Ramalho TC. Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27(5), 619–625 (2010).
51. Li R, Liu Y, Zhang J, Chen K, Li S, Jiang J. An isofenphos-methyl hydrolase (Imh) capable of hydrolyzing the P-O-Z moiety of organophosphorus pesticides containing an aryl or heterocyclic group. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94(6), 1553–1564 (2012).
52. Gorecki L, Korabecny J, Musilek K, *et al.* SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.* 90(12), 2831–2859 (2016).
53. da Cunha EFF, Ramalho TC, Reynolds RC. Binding mode analysis of 2, 4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with mycobacterium tuberculosis and human dihydrofolate reductases. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 25(4), 377–385 (2008).
54. Bajgar J, Fusek J, Kuca K, Bartosova L, Jun D. Treatment of Organophosphate Intoxication Using Cholinesterase Reactivators: Facts and Fiction. *Mini-Reviews Med. Chem.* 7(5), 461–466 (2007).

55. Kuča K, Patočka J. Reactivation of Cyclosarin-inhibited Rat Brain Acetylcholinesterase by Pyridinium–Oximes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19(1), 39–43 (2004).
56. Worek F, von der Wellen J, Musilek K, Kuca K, Thiermann H. Reactivation kinetics of a homologous series of bispyridinium bis-oximes with nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Arch. Toxicol.* 86(9), 1379–1386 (2012).
57. Kuca K, Cabal J, Musilek K, Jun D, Bajgar J. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J. Appl. Toxicol.* 25(6), 491–495 (2005).
58. Kuča K, Kassa J. Oximes-induced reactivation of rat brain acetylcholinesterase inhibited by VX agent. *Hum. Exp. Toxicol.* 23(4), 167–171 (2004).
59. Worek F, Widmann R, Knopff O, Szinicz L. Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLö 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.* 72(4), 237–243 (1998).
60. da Cunha EFF, Mancini DT, Ramalho TC. Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors. *Med. Chem. Res.* 21(5), 590–600 (2012).
61. Matos KS, Mancini DT, Cunha EFF da, Kuča K, França TCC, Ramalho TC. Molecular aspects of the reactivation process of acetylcholinesterase inhibited by cyclosarin. *J. Braz. Chem. Soc.* 6(4), 286–289 (2011).
62. Kuca K, Hrabínova M, Jun D, *et al.* Universality of Oxime K203 for Reactivation of Nerve Agent-Inhibited AChE. *Med. Chem.* 11(7), 683–6 (2015).