



**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**ESTUDO TEÓRICO ENTRE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS E ORGANOFOSFOTIOATOS E  
A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE HUMANA  
(HssAChE)**

**LAVRAS – MG  
2021**

**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**ESTUDO TEÓRICO ENTRE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS E ORGANOFOSFOTIOATOS E  
A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE HUMANA  
(HssAChE)**

Monografia apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Química (Licenciatura Plena),  
para a obtenção do título de Licenciado.

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

Prof (a). Dr (a). Daiana Teixeira Mancini  
Coorientadora

Prof (a). Dr (a). Thais Aparecida Sales  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

**ISABELA APARECIDA MILITANI**

**ESTUDO TEÓRICO ENTRE PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS E ORGANOFOSFOTIOATOS E  
A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE HUMANA  
(HssAChE)**

**THEORETICAL STUDY BETWEEN  
ORGANOPHOSPHORUS AND  
ORGANOPHOSPHOTIOATES AND THE HUMAN  
ACETYL CHOLINESTERASE ENZYME (HssAChE)**

Monografia apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Química (Licenciatura Plena),  
para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADA em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

Alexandre Alves de Castro UFLA  
Letícia Cristina de Assis UFLA

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

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

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, força, coragem, pelas bênçãos derramadas no decorrer da minha caminhada e por me amparar nas horas que eu mais precisei.

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

Ao meu filho Miguel, que foi a minha motivação maior para continuar os meus estudos e é a maior bênção em minha vida.

Ao meu namorado Jander, que acreditou em mim, me incentivou a voltar a estudar e me deu total apoio durante a minha graduação.

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

Ao meu avô Israel (in memoriam), que foi minha inspiração para que eu nunca desistisse de sonhar.

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

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade oferecida.

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

À professora Katia Júlia de Almeida pela orientação à Iniciação Científica, pelo incentivo, por toda ajuda e dedicação.

Ao Laboratório de Química Fundamental e Inorgânica (LQFI) pela oportunidade de realização da minha Iniciação Científica e aos amigos que me proporcionou.

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

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

À minha coorientadora Daiana Teixeira Mancini, pela atenção, dedicação e ensinamentos.

À minha coorientadora Thaís Aparecida Sales, por todo auxílio.

Muito obrigada!

## RESUMO

Os pesticidas possuem propriedades letais, capazes de eliminar ou controlar um organismo vivo, ou seja, bloqueiam os processos metabólicos vitais dos organismos. Eles são eficazes no controle de pragas, aumentando a produtividade e a qualidade dos alimentos, mas ao mesmo tempo, provocam graves problemas ambientais e para a saúde humana, pois apresentam grande toxicidade. Os pesticidas mais utilizados e que são considerados tóxicos, são conhecidos como organofosforados, e esses tem sido motivo de estudo sobre o seu metabolismo e toxicologia. A toxicidade desses pesticidas é aumentada quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativa, onde a ligação P=S é transformada em uma ligação P=O. Baseado nesse contexto, o objetivo desse trabalho é estudar o modo de interação de diferentes pesticidas organofosforados (com ligações P=S e P=O) com a enzima Acetilcolinesterase humana (*HssAChE*), utilizando-se as técnica de ancoramento molecular (*docking*). Os resultados teóricos obtidos mostraram que os organofosforados com ligação P=O apresentaram valores de energia de interações intermoleculares mais estáveis do que os compostos com ligação P=S no sítio ativo da enzima *HssAChE*. Dentre os organofosforados, o paration com ligação P=O foi o que obteve um melhor valor de energia de interação intermolecular dentro do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase humana, sendo um valor igual a -76,22 kcal mol<sup>-1</sup>. Essa investigação teórica pode ser utilizada como um ponto de partida para direcionar o desenvolvimento de novas drogas a base de fósforo, contribuindo assim, para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras chave: Docking, Enzima Acetilcolinesterase Humana, Pesticidas organofosforados.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estruturas dos OP Clorpirifós, Diazinon, Dimetoato, Malation e Paration.....	10
Figura 2- Estrutura geral dos OP. ....	12
Figura 3- Hidrólise da ACh pela AChE .....	14
Figura 4- Volume da cavidade (roxo) da enzima 5HF9 com o paraxon (amarelo) ancorado. Para melhor visualização omitiu-se a proteína. ....	19
Figura 5- <i>Re-docking</i> do inibidor paraxon dentro da enzima 5HF9, estrutura do cristal está representada de amarelo. Para melhor visualização omitiu-se a proteína. ....	19
Figura 6- Ligações de hidrogênio (tracejado azul) entre o ligante ativo e os resíduos do sítio ativo. Tracejado mais forte indicam as interações mais fortes e tracejados mais fracos as interações mais fracas. ....	20
Figura 7- Sobreposição dos organofosforados Paration e Clorpirifós após o ancoramento. O ligante ativo está representado em amarelo e os organofosforados em verde. Para melhor visualização omitiu-se a proteína. ....	21
Figura 8- Ligações de hidrogênio (tracejado azul) entre os organofosforados e os resíduos do sítio ativo. ....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores da energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/compostos (P=S) e ligação de hidrogênio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) obtidos do ancoramento. ....	22
Tabela 2- Valores da energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/compostos (P=O) e ligação de hidrogênio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) obtidos do ancoramento.....	24

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	10
2.1 Objetivo Específico .....	10
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
3.1 Contaminação dos ecossistemas .....	11
3.2 Pesticidas organofosforados .....	11
3.3 Toxicidade dos organofosforados .....	13
3.4 Enzima acetilcolinesterase .....	13
3.5 Métodos computacionais .....	15
3.6 Ancoramento molecular ( <i>docking</i> ) .....	15
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 Estudo por ancoramento molecular .....	18
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	19
5.1 Estudo de <i>docking</i> .....	19
5.1.1 <i>Re-docking</i> .....	19
5.1.2 <i>Docking</i> dos ligantes .....	20
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	25
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	26
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são úteis na remoção de pragas que danificam a agricultura, mas ao mesmo tempo, possuem grande toxicidade aos organismos vivos. Quando os pesticidas são usados de forma excessiva e errada, causam a contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres. Os pesticidas mais utilizados e que são considerados tóxicos, são conhecidos como organofosforados, e esses tem sido motivo de estudo sobre o seu metabolismo e toxicologia. Os organofosforados mais utilizados são os clorpirifós, diazinon, dimetoato, malation e paration (BELLO-RAMIREZ, CARREON-GARABITO E NAVA-OCAMPO, 2000).

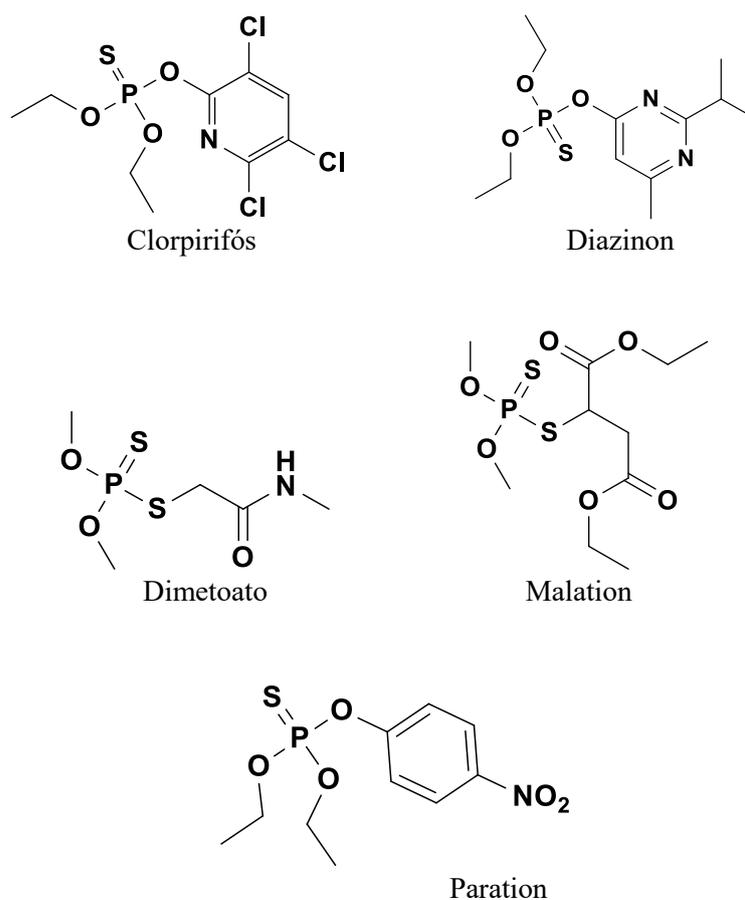
Os organofosforados podem ser absorvidos pelo organismo humano através de vias respiratórias, dérmicas, membranas mucosas e do trato intestinal, pois possuem elevada lipossolubilidade, ou seja, facilidade de atravessar uma membrana biológica. A toxicidade desses pesticidas é aumentada quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativa, onde a ligação P=S é transformada em uma ligação P=O (ALMEIDA, 2010). Através de estudos já realizados, foi possível avaliar que, a toxicidade causada no ser humano, de diversos compostos organofosforados (OP), está relacionada às ligações P=O, presente em sua estrutura molecular ou em seus metabólitos ativos (BURATTI; TESTAI, 2007). Como a ligação P=O possibilita a transferência de elétrons do fósforo para o oxigênio, cargas mais intensas são geradas nos dois elementos, resultando em interações mais fortes dos OP com o centro esterásico da enzima Acetilcolinesterase (AChE) (BURATTI; TESTAI, 2007).

Como a maior parte dos organofosforados possuem a ligação P=S, é preciso que ocorra a reação de dessulfuração para que os mesmos possuam uma considerável atividade anticolinesterase (BURATTI; TESTAI, 2007). Mas ainda não há um estudo mostrando se o processo de biotransformação oxidativa ocorre a todos os pesticidas organofosforados com ligação P=S. Através do uso das técnicas de química computacional como, por exemplo, *docking* é possível obter informações importantes do modo de interação destes compostos no sítio ativo da enzima Acetilcolinesterase humana (*HssAChE*). E a partir deste estudo, novas técnicas de remediação da contaminação dos pesticidas serão desenvolvidas, bem como a descoberta de drogas a base de fósforo para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar o modo de interação de alguns pesticidas organofosforados (FIGURA 1) no sítio ativo da enzima Acetilcolinesterase humana (*HssAChE*), utilizando modelos e cálculos computacionais.

Figura 1- Estruturas dos OP Clorpirifós, Diazinon, Dimetoato, Malation e Paration



Fonte: Barbosa et al. (2005).

### 2.1 Objetivo Específico

Estudar, através da técnica de ancoramento molecular, o modo de interação de diferentes pesticidas organofosforados (com ligações P=S e P=O) no sítio ativo da enzima *HssAChE*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Contaminação dos ecossistemas

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

O manejo inadequado do solo e a retirada da mata ciliar causa o transporte de agrotóxicos do solo para a água, devido ao escoamento superficial promovido pela chuva ou irrigação da cultura. (LOURENÇATO, 2010). A água doce vem sendo ameaçada por extinção de sua qualidade e biodiversidade, devido a contaminação por pesticidas. Os pesticidas podem causar grandes efeitos na água doce, impedindo importantes funções das espécies e afetando o funcionamento do ecossistema (SCHÄFER; VON DER OHE; RASMUSSEN; KEFFORD; BEKETOV; SCHULZ; LIESS, 2012).

Técnicas agrícolas podem ser utilizadas a fim de diminuir a contaminação dos solos e rios, como terraceamento, curvas de nível, plantio direto, rotação de culturas, entre outras. O manejo do solo e culturas e o gerenciamento dos recursos hídricos são alternativas capazes de controlar a contaminação por pesticidas, porém, um estudo sobre os pesticidas é de suma relevância para garantir uma maior proteção ao ecossistema e a população (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

#### 3.2 Pesticidas organofosforados

Os Pesticidas organofosforados são um dos agrotóxicos mais utilizados na agricultura, devido a sua alta eficiência no combate as pragas, porém apresentam alta toxicidade aos organismos vivos. Os compostos organofosforados (OP) são usados como anti-helmínticos (vermicidas) ou ainda no controle de ectoparasitas em algumas espécies domésticas (RADOSTITIS et al., 2000). Os OP ganham destaque, pois dentre os pesticidas, eles representam as maiores ameaças para a saúde humana, devido seus efeitos neurotóxicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Além disso, os agentes neurotóxicos OP são considerados uma das armas químicas mais letais à vida (MARTIN; LOBERT, 2003). Em 1854, foi sintetizado o primeiro OP,

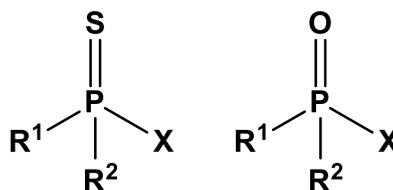
conhecido como como TEPP (tetraetilpirofosfato). A fórmula geral dos OP foi desenvolvida no ano de 1937, e nesse mesmo ano foi sintetizado o Sarin (GB), Tabun (GA) e outros agentes neurotóxicos (CHAUHAN et al., 2008).

Os agentes neurotóxicos OP foram usados em ataques terroristas, como no atentado ocorrido no metrô de Tóquio, em 1995, sendo utilizado o gás Sarin (MUNRO et al., 1999; SHIH; KAN; MCDONOUGH, 2005). Esse mesmo gás foi utilizado em 2013, em ataques terroristas ocorrido nos arredores de Damasco na Síria (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016).

Como os organofosforados possuem elevada lipossolubilidade, eles podem ser absorvidos pelo organismo humano por diversas vias, como oral, nasal, cutânea e pela via ocular (RADOSTITIS et al., 2000). Após a absorção, os OP se depositam nos tecidos adiposo, fígado, rins, glândulas salivares, pâncreas, pulmões, sistema nervoso central, músculos, paredes do estômago e do intestino. Eles se tornam mais tóxicos quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativas, ou seja, a ligação P=S é transformada em uma ligação P=O (ALMEIDA, 2010).

Os OP são ésteres e derivam do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico. Eles são compostos por um átomo de fósforo polarizável, pentavalente, e apresentam os radicais arila ou alquila representado por R1 e R2 (FIGURA 2), que podem ser metil ou etil, e o X pode ser diferentes grupos, como halogênios, alifáticos, aromáticos, entre outros, ligados diretamente ao átomo de fósforo central. Esse X é liberado do átomo de fósforo quando o pesticida organofosforado é hidrolisado. O átomo central de fósforo está ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação (KANEKAR; BHADBHADE; DESHPANDE; SARNAIK, 2004). Como eles são ésteres, as moléculas do OP apresentam posições capazes de sofrer hidrólise. As reações que podem ocorrer envolvendo os OP são a hidrólise, oxidação, alquilação e desalquilação, entre outras.

Figura 2- Estrutura geral dos OP.



Fonte: Stoddart (1979).

### 3.3 Toxicidade dos organofosforados

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

No mundo, aproximadamente milhões de agricultores são intoxicados anualmente e devido à falta de estatísticas oficiais, são responsabilizados as pessoas que não cumprirem medidas eficazes de controle da produção, distribuição e a venda dos pesticidas. Ainda não se sabe o número de tentativas de suicídio por ingestão dos OP. A intoxicação decorrente dos OP, ocorre devido as altas taxas do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na sinapse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

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

A ação pesticida e tóxica dos compostos OP é o resultado da inibição da acetilcolinesterase (AChE). Enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas e pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (SILVA, 2015).

### 3.4 Enzima acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que pertence à família das colinesterases, e é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE encontra-se no sistema nervoso central e periférico (RANG, 2001).

No sistema nervoso central, a AChE atua no controle motor, na cognição e na memória. Já no sistema nervoso periférico, a AChE modula os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos através da dilatação dos vasos sanguíneos e na contração dos músculos lisos (PETRONILHO et al., 2011).



sítio ativo, a afinidade ou configuração dos compostos ligados ao centro ativo é influenciada pela ocupação do sítio ativo periférico (PAS). Outro sítio ativo que existe e que pode ser alvo de inibidores, é o sítio de ligação à colina, o qual possui resíduos de triptofano hidrofóbicos e grupos aniônicos (PETRONILHO et al., 2011).

Neste contexto, um melhor entendimento da atuação dos compostos OP no sítio ativo da AChE é necessário para o desenvolvimento de novos fármacos e novos métodos de remediação.

### 3.5 Métodos computacionais

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o *design* de novos fármacos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse, especificamente neste trabalho, os compostos OP Clorpirifós, Diazinon, Dimetoato, Malation e Paration (Figura 1). Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva. Dentre as inúmeras ferramentas computacionais, destaca-se o docking que é um método bem versátil para a análise (MANCINI, 2011; CARVALHO et al., 2003).

### 3.6 Ancoramento molecular

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

A simulação computacional do ancoramento molecular é uma técnica muito utilizada e de grande importância para investigar as interações moleculares entre a enzima e o ligante após a elucidação da estrutura tridimensional da enzima. Através dessa simulação, encontra-se a estrutura que apresenta maior estabilidade do complexo enzima-ligante e essa estabilidade relativa é calculada. As conformações estruturais que

apresentam maior confiabilidade é obtida por meio da análise de raios-X de cristais do complexo ou RMN, porém há uma grande dificuldade em obter os dados experimentais de todos os inibidores de interesse (MANCINI, 2011; GUIMARÃES, 2010; SILVEIRA, 2003).

Os valores da função utilizada no ancoramento (*Docking Scoring Function*),  $E_{score}$ , são definidos pela Equação 1 (MANCINI, 2011).

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra}$$

### Equação 1

O termo  $E_{inter}$ , é a energia de interação ligante-enzima e é definido de acordo com a Equação 2 (MANCINI, 2011).

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

### Equação 2

Na Equação 2, o primeiro termo  $E_{PLP}$ , é o de energia potencial inibidor por partes que utiliza dois conjuntos diferentes de parâmetros, um para a aproximação do termo estérico (Van de Waals) entre átomos e o outro para o potencial para a ligação de hidrogênio. Já o segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomo carregados, ou seja, é um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ( $D(r) = 4r$ ). O valor numérico de 332,0 fixa as unidade de energia eletrostática para  $\text{Kcal mol}^{-1}$  (MANCINI, 2011; RAMALHO et al., 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2000).

O termo  $E_{intra}$  é a energia interna do ligante e é definido de acordo com a Equação 3 (MANCINI, 2011).

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

### Equação 3

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, exceto os pares de átomos conectados por duas ligações. Já o segundo termo refere-se a energia de torção, onde o  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. Para determinar diversas torções, é utilizada a média da contribuição de torção da ligação da energia. O último termo,  $E_{\text{penalizada}}$  (termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Todas essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (enzima) (MANCINI, 2011).

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

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Estudo por ancoramento molecular

O programa utilizado para o ancoramento molecular foi o *Molegro Virtual Docker (MVD)* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) um programa que permite determinar a conformação mais provável do ligante na enzima. A identificação da conformação do ligante é feita através da avaliação de diversos candidatos (conformações dos ligantes) estimando as energias de suas interações com a enzima (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

As estruturas tridimensionais dos compostos OP (FIGURA 3) foram construídas por meio do programa Gaussview e suas cargas parciais atômicas foram calculadas utilizando o método DFT 6-31G. Esse procedimento é necessário para obter a conformação inicial dos OP, importante para o estudo de ancoramento molecular.

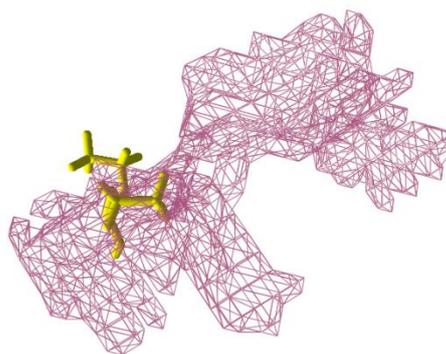
Após a construção das estruturas 3D dos OP, eles foram transferidos para o programa *MVD*, onde cada composto foi ancorado no sítio ativo da enzima HssAChE (código PBD 5HF9; resolução = 2.20 Å; inibidor = paraoxon). Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa avaliando um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando a energia de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional (MANCINI, 2011). Para melhores resultados consideramos como flexíveis os resíduos a 12Å do ligante, a conformação de cada OP foi selecionada usando seu maior grau de similaridade espacial com o ligante ativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Estudo de *docking*

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa tridimensional foi usado para gerar o sítio de ligação da enzima 5HF9 através do programa MVD. O volume da cavidade foi de 174,08 Å e está representado na Figura 4 juntamente com o paraxon (composto cristalizado no sítio ativo).

Figura 4- Volume da cavidade (roxo) da enzima 5HF9 com o paraxon (amarelo) ancorado. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.

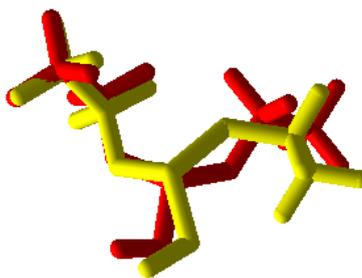


Fonte: Programa MVD.

#### 5.1.1 *Re-docking*

A Figura 5 mostra o resultado de *re-docking* para a estrutura mais bem encaixada do inibidor paraxon dentro da enzima 5HF9. É importante notar que os RMSD para a superposição foi de 0,95 Å. De acordo com a literatura, um valor de RMSD inferior a 2,00 Å é considerado aceitável (Guimarães, Oliveira, et al., 2011b; Warren et al., 2006).

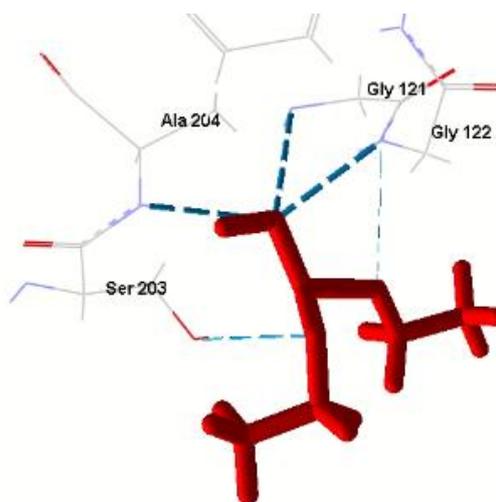
Figura 5- *Re-docking* do inibidor paraxon dentro da enzima 5HF9, estrutura do cristal está representada de amarelo. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.



Fonte: Programa MVD.

É importante destacar ainda que, a energia de interação intermolecular obtida no *re-docking* foi de  $-57,08 \text{ kcal mol}^{-1}$ , ou seja, esse valor se encontra dentro da faixa de variação dos 10 compostos estudados no sítio ativo da 5HF9, que foi de  $-27,86 - 76,22 \text{ kcal mol}^{-1}$  (TABELA 1 e TABELA 2), validando assim, a metodologia teórica utilizada para os cálculos de ancoramento molecular. Além disso, é possível observar na Figura 6 que o ligante ativo apresenta um total de cinco interações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo, sendo que as interações mais fortes são com os resíduos Ala204, Gly121 e Gly122.

Figura 6- Ligações de hidrogênio (tracejado azul) entre o ligante ativo e os resíduos do sítio ativo. Tracejado mais forte indicam as interações mais fortes e tracejados mais fracos as interações mais fracas.



Fonte: Programa MVD.

### 5.1.2 *Docking* dos ligantes

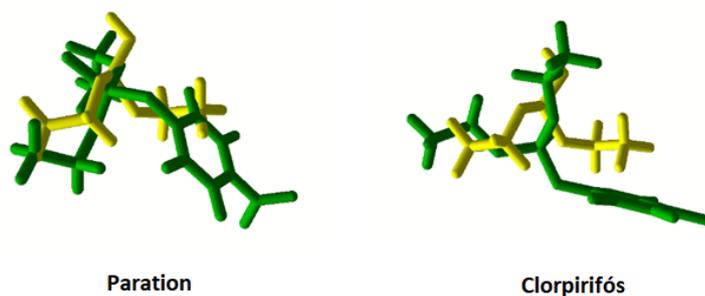
Os cinco compostos OP mostrados na Tabela 1 foram ancorados no sítio ativo da 5HF9 e comparados ao ligante ativo. As energias de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio ligante-proteína foram calculadas para melhor se entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores que são responsáveis pela atividade dos compostos.

Como pode ser observado na Tabela 1, o Paration foi o que apresentou um valor mais estável de energia de interação intermolecular, ou seja, possui uma maior interação com o sítio ativo da 5HF9 e, conseqüentemente, uma maior estabilidade. Por outro lado, o Clorpirifós apresentou uma energia de interação intermolecular menos estável que os outros compostos, ou seja, possui uma menor interação com o sítio ativo e com isso, uma menor estabilidade.

É importante ressaltar ainda que, os resultados teóricos de DL50 (dose letal mediana dos compostos) obtidos no ADMET (acrônimo utilizado na farmacocinética e na farmacologia para “absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade”, e descreve a disposição de um composto farmacêutico em um organismo, <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction>) para enzima *HssAChE*, estão de acordo com os resultados teóricos obtidos nos cálculos de ancoramento molecular (TABELA 1). O DL50 é frequentemente usado como um indicador da toxicidade aguda de uma substância, quanto maior a dose que será letal, menos tóxica é considerada. De acordo com a *home* do IPCS INCHEM que apresenta valores experimentais de DL50 para os organofosforados (P=S) na enzima *HssAChE*, o Paration é o composto mais tóxico, ou seja, apresenta um valor experimental de DL50 igual a 13 mg/kg. Por outro lado, o Clorpirifós é o menos tóxico, com um valor experimental de DL50 igual a 135 mg/kg (<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg001.htm#PartTitle:1.%20%20NAME>).

Com o estudo teórico de ancoramento molecular, foi possível observar que o Paration foi o que melhor se posicionou no interior do sítio ativo (FIGURA 7), apresentando uma energia de ligação de hidrogênio mais estável do que a maioria dos outros compostos (TABELA 1) e, conseqüentemente, um maior potencial inibitório na enzima 5HF9, corroborando assim, com os resultados experimentais de DL50.

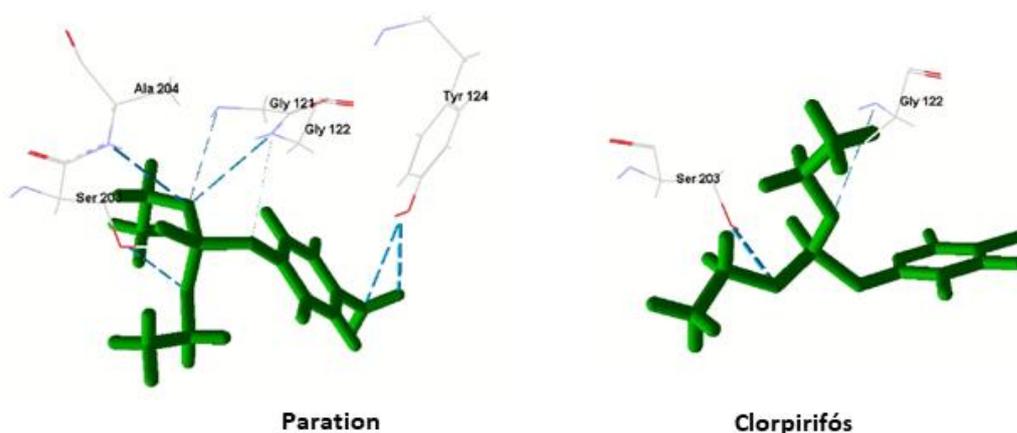
Figura 7- Sobreposição dos organofosforados Paration e Clorpirifós após o ancoramento. O ligante ativo está representado em amarelo e os organofosforados em verde. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.



Fonte: Programa MVD.

Outro aspecto importante analisado nos estudos de ancoramento molecular foram as ligações de hidrogênio que cada composto realizou com a enzima, assim, tornou-se mais fácil de visualizar quais são os resíduos de aminoácidos que estão interagindo mais fortemente aos organofosforados estudados no presente trabalho. Observou-se que o Paration apresentou no total, sete interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, ou seja, duas interações de hidrogênio com os resíduos Gly122 e Tyr124 uma interação com os resíduos Gly121, Ala204, Ser203. Por outro lado, o Clorpirifós apresentou somente duas interações de hidrogênio com os resíduos Ser203 e Gly122 (FIGURA 8).

Figura 8- Ligações de hidrogênio (tracejado azul) entre os organofosforados e os resíduos do sítio ativo.



Fonte: Programa MVD.

Tabela 1- Valores da energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/compostos (P=S) e ligação de hidrogênio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) obtidos do ancoramento.

<b>Compostos</b>	<b>Energia de interação intermolecular</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio</b>	<b>*Tox. (DL<sub>50</sub>, mol kg<sup>-1</sup>)</b>
Clorpirifós (P=S)	-27,86	-3,04	3,87
Diazinon (P=S)	-28,21	-10,91	3,08
Dimetoato (P=S)	-31,06	-3,57	3,08
Malation (P=S)	-29,29	-1,24	3,46
Paration (P=S)	-44,75	-10,53	2,81

Resultados teóricos obtidos do ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcs/prediction>).

De acordo com a literatura, os OP se tornam mais tóxicos quando ocorrem reações de dessulfuração metabólica oxidativas, ou seja, a ligação P=S é transformada em uma ligação P=O (ALMEIDA, 2010). Mas ainda não há um estudo mostrando se o processo de biotransformação oxidativa ocorre a todos os pesticidas organofosforados com ligação P=S. Com isso, neste trabalho também foi estudado a forma com que os OP (P=O) interagem no sítio ativo da enzima 5HF9. A Tabela 2 mostra os valores da energia de interação intermolecular e ligação de hidrogênio obtidos do ancoramento entre os cinco OF com ligação P=O e a enzima 5HF9.

Com os estudos de ancoramento molecular para os OP com ligação P=O, foi possível observar que todos os compostos apresentam energia de interação intermolecular mais estável no sítio ativo da enzima (TABELA 2) quando comparados aos OP com ligação P=S, corroborando com os resultados apontados pela literatura. A maior estabilidade dos OP com P=O no sítio ativo da enzima pode ser explicado pelo fato do oxigênio aumentar o número de ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima.

Porém, os resultados teóricos de DL<sub>50</sub> obtidos no ADMET para os OP com P=O, mostraram que os valores são bem próximos aos encontrados para os OP com P=S, a diferença maior ocorre somente para o Clorpirifós. Ou seja, estes resultados indicam que nem todos os metabólitos com P=O são mais tóxicos. Entretanto, novas investigações como dinâmica molecular e estudos de QM/MM serão necessários para avaliar se o processo de biotransformação oxidativa ocorre para todos os metabólitos com ligações P=S e o que contribui para aumentar ou não a toxicidade desses OP.

Tabela 2- Valores da energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/compostos (P=O) e ligação de hidrogênio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) obtidos do ancoramento

<b>Compostos</b>	<b>Energia de interação intermolecular</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio</b>	<b>*Tox. (<math>\text{DL}_{50}</math>, <math>\text{mol kg}^{-1}</math>)</b>
Clorpirifós (P=O)	-72,48	-1,76	4,14
Diazinon (P=O)	-71,59	-3,65	3,08
Dimetoato (P=O)	-48,44	-9,40	3,07
Malation (P=O)	-37,02	-6,80	3,41
Paration (P=O)	-76,22	-0,12	2,88

Resultados teóricos obtidos do ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction>).

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados teóricos obtidos mostraram que os organofosforados com ligação P=O apresentaram valores de energia de interações intermoleculares mais estáveis que os compostos com ligação P=S no sítio ativo da enzima HssAChe, essa estabilidade se dá, pois o oxigênio é capaz de aumentar o número de ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima, e essas ligações influenciam significativamente na estabilidade dos compostos estudados.

Dos compostos OP estudados, o paration apresentou uma maior estabilidade, mostrando uma boa interação com o sítio ativo da 5HF9. Após o estudo teórico de ancoramento molecular, o paration foi o que se posicionou melhor no interior do sítio ativo, apresentando também uma energia de ligação de hidrogênio com uma grande estabilidade, e com isso, os resultados teóricos obtidos do paration mostraram um bom acordo com a literatura estudada.

Já os resultados teóricos de DL50 obtidos, quando comparados com o resultado experimental, mostraram que nem todos os compostos com ligação P=O são realmente os que apresentam maior toxicidade, portanto, novas investigações serão necessárias a fim de avaliar se o processo de biotransformação oxidativa ocorre para todos os compostos com ligações P=S e também o que faz aumentar ou não a toxicidade desses OP.

## 7 PERSPECTIVAS

Até o presente momento pequena parte desse projeto foi estudado para ser apresentado nessa monografia, pois o mesmo é extenso e contribui significativamente para a comunidade científica. Portanto, esse projeto continuará sendo estudado no meu mestrado, a fim de se chegar no objetivo final. Para isso, novas investigações serão realizadas, como dinâmica molecular e QM/MM. Esse projeto tem como base um estudo dos modos de interação de vários pesticidas organofosforados frente à enzima Acetilcolinesterase (AChE) em uma reação inibitória. Por meio do conhecimento do processo de biotransformação oxidativas, é possível obter um melhor entendimento da toxicidades desses agentes, assim como na avaliação dos potenciais terapêuticos de compostos organofosforados. Estes compostos poderão ser eficientes no tratamento de doenças neurodegenerativas, e essa investigação teórica poderá guiar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos à base de fósforo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. N. **Contaminação por agrotóxicos carbamatos e organofosforados em água para consumo humano de Dourados, MS, 2008 a 2009**. 22.ed. 628.16. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Campo Grande, 2010.

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.

BELLO-RAMIREZ, A. M.; CARREON-GARABITO, B. Y.; NAVA-OCAMPO, A. A. **A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides**. Toxicology, v. 149, n. 2–3, p. 63–68, ago. 2000.

BURATTI, F. M.; TESTAI, E. **Evidences for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver**. Toxicology, Easton, v. 241, n. 1-2, p. 33-46, 2007.

CADDIGAN, E. J. et al. **VMD user's guide**. Urbana: University of Illinois; Beckman Institute, 2004. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em 01 de março de 2021.

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, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 113-122, July/Sept. 2008.

COUTINHO, C. F. B. et al. **PESTICIDAS: MECANISMO DE AÇÃO, DEGRADAÇÃO E TOXIDEZ**. Pesticidas: r.ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas**. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, v.18, n.12, p.1296–1301, 2014.

EDWARDS, P. M. Origin 7.0: scientific graphing and data analysis software. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, Sept./Oct. 2002.

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

GUIMARÃES, A. P.; OLIVEIRA, A. A.; da CUNHA, E. F.; RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. **Design of new chemotherapeutics against the deadly anthrax**

disease. **Docking and molecular dynamics studies of inhibitors containing pyrrolidine and riboamidrazone rings on nucleoside hydrolase from Bacillus anthracis.** J Biomol Struct Dyn. doi: 10.1080/07391102.2011.10508588. PMID: 21142217. 2011 Feb;28(4):455-69.

GUIMARÃES, A. P.; OLIVEIRA, A. A.; da CUNHA, E. F.; RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. Analysis of Bacillus anthracis nucleoside hydrolase via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. J Mol Model. doi: 10.1007/s00894-011-0968-9. Epub 2011 Feb 12. PMID: 2131823. 2011 Nov;17(11):2939-51.

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

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

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

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

MARTIN, T.; LOBERT, S. **Chemical warfare: toxicity of nerve agents.** American Association of Critical Care-Nurses, Hagerstown, v. 23, n. 5, p. 15-22, 2003.

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

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

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

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

PETRONILHO, E. da C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. **Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química.** Revista Militar de Ciência e Tecnologia. 3º Trimestre de 2011.

RADOSTITIS, E. M. et al. **Veterinary medicine.** 9. ed. London: W. B. Saunders, 2000. 1881 p.

RAMALHO, T. C. et al. **Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations.** *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

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

SCHÄFER, R. B. et al. **Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems.** dx.doi.org/10.1021/es2039882| *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 5134–5142.

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

SILVA, S. M. S. da. **Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento.** Artigo de revisão. Março, 2015.

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

SPOEL, D. van der et al. **GROMACS user manual version 3.0.** Groningen: University of Groningen, 2001. Disponível em: <https://manual.gromacs.org/2016/manual-2016.pdf>. Acesso em: 01 de março 2021.

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

SUSSMAN, J. L. et al. **Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo Califórnia: A prototypic acetylcholine-binding protein.** *Science*, 1991, 253, 872.

TAYLOR, P., BROWN, J. H. **Acetylcholine Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, 214-242, 1999.

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

VENTURA, A. L. M. et al. **Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo.** Ventura ALM, et al. / *Rev Psiq Clín.* 2010;37(2):66-72.

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

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