



**ÉRIKA FERREIRA SILVA**

**MODELAGEM MOLECULAR DE SENSORES  
QUÍMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE  
OXIMAS PARA DETECÇÃO DE  
ORGANOFOSFORADOS**

**LAVRAS- MG**

**2016**

**ÉRIKA FERREIRA SILVA**

**MODELAGEM MOLECULAR DE SENSORES QUÍMICOS  
FLUORESCENTES DERIVADOS DE OXIMAS PARA DETECÇÃO DE  
ORGANOFOSFORADOS**

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

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

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

Silva, Érika Ferreira.

Modelagem molecular de sensores químicos fluorescentes  
derivados de oximas para detecção de organofosforados / Érika  
Ferreira Silva. – Lavras : UFLA, 2016.

83 p.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Organofosforados. 2. Sensores químicos. 3. Oximas. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ÉRIKA FERREIRA SILVA**

**MODELAGEM MOLECULAR DE SENSORES QUÍMICOS  
FLUORESCENTES DERIVADOS DE OXIMAS PARA DETECÇÃO DE  
ORGANOFOSFORADOS**

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

APROVADA em 20 de Abril de 2016.

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha

UFLA

Profa. Dra. Mírian Aparecida Isidro dos Santos

UNIFOR-MG

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

*“Se não puderes ser um  
pinheiro, no topo de uma colina,  
Sê um arbusto no vale, mas sê  
O melhor arbusto à margem do  
regato.  
Sê um ramo, se não puderes ser  
uma árvore.  
Se não puderes ser um ramo, sê  
um pouco de relva  
E dá alegria a algum caminho.  
Se não puderes ser uma estrada,  
Sê apenas uma senda,  
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.  
Não é pelo tamanho que terás êxito ou  
fracasso...  
Mas sê o melhor no que quer que sejas.”*

*(Pablo Neruda)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter guiado o meu caminho e me proporcionado sabedoria e força para cumprir mais esta etapa da minha vida.

A minha família, por sempre ter me apoiado. Principalmente, a minha mãe, Anelice, pelo exemplo de vida, compreensão e força nos momentos difíceis e por sempre ter feito mais que o possível para que eu pudesse chegar até aqui. Amo vocês!

Ao amor da minha vida, meu marido Gustavo, por ser meu maior incentivador, pelo apoio, confiança, amor incondicional e por não medir esforços para me ajudar nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Teodorico de Castro Ramalho, pela confiança e ensinamentos fundamentais para que eu pudesse concluir este trabalho com sucesso.

Às professoras Elaine e Mírian, por terem aceitado o convite para participar da banca examinadora.

Agradeço, em especial, ao Eduardo pela significativa contribuição neste trabalho e por sempre ter se colocado gentilmente à disposição durante todo tempo.

Ao pessoal do Laboratório de Modelagem Molecular.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Química e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

Organofosforados (OFs) são compostos orgânicos largamente utilizados na agricultura, bem como em armas químicas. Sua utilização na agricultura é devido às suas propriedades inseticidas. Seu emprego como arma química está associado à inibição da enzima acetilcolinesterase, promovendo a síndrome colinérgica. Neste contexto, a rápida detecção desta classe de compostos é crucial para um tratamento eficaz. Nesta perspectiva, o composto 1 foi empregado para a detecção de OFs, utilizados como agentes dos nervos, como Cilosarin, Sarin, Soman, GV, VG, VM, VX, DFP e DCP, por meio de emissão fluorescente. Parâmetros termodinâmicos e cinéticos, assim como propriedades espectroscópicas dos complexos formados entre os OFs e o composto 1 foram investigados por meio de cálculos teóricos. A partir dos resultados obtidos, observou-se que apenas DCP, GV e VG emitem fluorescência nos solventes hexano, tolueno, clorofórmio, DCM, metanol, acetonitrila, água e DMSO. Os parâmetros termodinâmicos indicam valores negativos de  $\Delta G$  para o VX para a reação com 1, enquanto Sarin e Ciclosarin revelam os menores valores de  $\Delta G^\ddagger$ , sendo cineticamente favorável e apresentando maior reatividade.

**Palavras-chave:** Organofosforados. Sensores químicos. Oximas. Fluorescência.

## ABSTRACT

Organophosphates (OPs) are organic compounds largely used in agriculture, as well as chemical weapons. Its use in agriculture is due to its insecticide properties. Its employment as chemical weapon is associated to the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, promoting the cholinergic syndrome. In this context, the quick detection of this class of compounds is crucial for an effective treatment. In this perspective, compound 1 was employed for detecting the OPs, using nerve agents such as Ciclosarin, Sarin, Soman, GV, VG, VM, VX, DFP and DCP, by means of fluorescent emission. Thermodynamic and kinetic parameters, as well as spectroscopic properties of the complexes formed between the OPs and compound 1, were assessed by theoretical calculations. With the results obtained, we verified that only DCP, GV and VG emit fluorescence on solvents hexane, toluene, chloroform, DCM, methanol, acetonitrile, water and DMSO. The thermodynamic parameters indicate negative values for  $\Delta G$  for VX for the reaction with 1, while Sarin and Ciclosarin reveal the smaller values for  $\Delta G^\ddagger$ , being kinetically favorable and presenting higher reactivity.

**Keywords:** Organophosphate. Chemical sensors. Oximes. Fluorescence.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	9
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Armas químicas</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Defensivos agrícolas</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Acetilcolina</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Acetilcolinesterase</b> .....	21
<b>2.5</b>	<b>Inibidores da Acetilcolinesterase</b> .....	23
<b>2.6</b>	<b>Inibição, reativação e envelhecimento da AChE</b> .....	24
<b>2.7</b>	<b>Deteção de organofosforado</b> .....	26
<b>2.8</b>	<b>Oximas</b> .....	28
<b>2.9</b>	<b>Fluorescência</b> .....	29
<b>2.10</b>	<b>Sensores fluorescentes</b> .....	34
<b>2.11</b>	<b>Química computacional</b> .....	35
<b>2.11.1</b>	<b>Teoria do Funcional de Densidade (DFT)</b> .....	36
<b>2.11.2</b>	<b>Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT)</b> .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	53
	<b>ARTIGO 1 - DETECTION OF CHEMICAL WEAPON AGENTS USING SPECTROSCOPIC PROBES: A COMPUTATIONAL STUDY</b> .....	53

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Organofosforados (OFs) são compostos orgânicos que possuem carbono ligado ao fósforo. Os primeiros compostos organofosforados foram preparados na Idade Média, mas seu estudo se deu no século XIX por Michaelis, que explorou a nucleofilia do fósforo, sendo esta estudada em detalhes, mais tarde, por Arbuzov. Em 1930, houve a descoberta de suas propriedades tóxicas e inseticidas, por Schrader e colaboradores, o que viabilizou o desenvolvimento de novos compostos organofosforados (CARULLO et al., 2015).

Existem várias reações para síntese de organofosforados, e o crescente interesse nestes compostos é devido à sua aplicabilidade como agrotóxico e arma química (GONÇALVES, 2009).

Uma das maneiras mais fáceis de obter a ligação carbono – fósforo é através da reação de Michaelis-Arbuzov (transformação de Arbuzov ou rearranjo de Arbuzov), a qual envolve um fosfito de triálquila e um halogeneto de alquila (SANTOS et al., 2007).

Em 1936, Gerhald Schrader sintetizou um composto organofosforado com propriedades inseticidas, levando, mais tarde, ao desenvolvimento de compostos mais potentes, conhecidos atualmente como “agentes dos nervos”, utilizados como armas químicas (ARDUINI et al., 2010).

A elevada toxicidade destes compostos está intimamente ligada ao seu poder inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os OFs formam com essa enzima uma ligação química bastante estável impedindo que a mesma exerça sua função de quebra da acetilcolina (ACh), provocando um aumento de ACh nas fendas sinápticas (PATOČKA et al., 2005).

A inibição ocorre no aminoácido serina da tríade catalítica, no interior do sítio ativo, via ligação covalente entre o organofosforado (átomo de fósforo) e a Ser 203(átomo de oxigênio) (EDDLESTON et al., 2002).

A reativação da AChE pode ocorrer de forma natural através da regeneração hidrolítica espontânea, porém esse processo torna-se insignificante devido a sua lentidão. Tratamentos com oximas podem reativar a colinesterase mais eficazmente que a hidrólise espontânea. A reativação ocorre através da reação de desfosforilação da serina do sítio ativo da acetilcolinesterase. O emprego da oxima deve ocorrer antes do processo de envelhecimento da mesma logo que a chance de reativação após o envelhecimento se torne mínima. Outro fator que limita o uso das oximas é a sua especificidade, ou seja, uma oxima pode dar bons resultados com um determinado organofosforado e ser inativa para outro (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

A despeito de ter seu uso proibido como arma química, é de amplo conhecimento que muitos países ainda estocam organofosforados. Esta ameaça iminente aliada ao grande número de intoxicação por OFs na agricultura leva a buscar formas mais eficientes de detecção desses compostos.

Oximas têm sido utilizadas como sondas fluorescentes para detecção de compostos organofosforados. Walton et al. (2012) utilizaram, em um de seus experimentos, a oxima N, N-carbonil-dipyrrinone para identificação do organofosforado DFP (diisopropilfluorofosfato) obtendo um complexo fluorescente com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 400 nm.

A utilização de oximas como sondas fluorescentes para detecção de OFs vem ganhando destaque na atualidade devido sua alta sensibilidade, resposta rápida e baixo limite de detecção. O estudo dessas oximas torna-se cogente frente ao cenário atual no qual o uso de agentes dos nervos vem se tornando cada vez mais comum em ataques terroristas. Cabe ressaltar que o uso de

organofosforados na agricultura tem causado um elevado número de intoxicações (WALTON et al., 2012).

Deste modo, foi realizado um estudo teórico que teve como objetivo a obtenção de complexos fluorescentes entre a oxima N, N-carbonil-dipyrinone e os compostos organofosforados.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Armas químicas

Os agentes químicos são empregados desde a antiguidade, porém somente com o advento da indústria foi possível sua utilização como arma de destruição em massa (GIACOPPO et al., 2014).

Um dos aspectos mais relevantes a respeito do uso de armas químicas está relacionado ao seu alto poder de destruição e baixo custo, quando comparadas com armas convencionais (GONÇALVES, 2009).

As armas químicas podem ser divididas em cinco classes, sendo a primeira a dos vesicantes, que são substâncias que causam irritação e destruição da pele e de membranas mucosas, sobretudo nos pulmões. Nessa classe destacam-se os chamados “gases de mostarda”, substâncias que causam fortes efeitos incapacitantes. Na segunda classe, estão os tóxicos pulmonares, que atacam os tratos respiratórios, sendo o principal deles o fosgênio ( $\text{COCl}_2$ ). Na terceira, encontram-se os chamados cianetos, substâncias que liberam íons cianeto no organismo, com alta capacidade mortal através da inibição da enzima citocromo-c oxidase, sendo os mais populares o ácido cianídrico e o cianeto de cloro. Na quarta, estão os agentes incapacitantes ou agentes irritantes que são compostos que levam a efeitos fisiológicos e mentais negativos, incapacitando as pessoas de realizarem suas atividades rotineiras, sendo os mais conhecidos os lacrimogênicos como cloroacetofenona e análogos, assim como compostos psicoativos como o benzilato de 3-quinoclinidila. Na última classe, temos os agentes neurotóxicos, que são compostos organofosforados (OFs) que atuam inibindo a enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, a chamada acetilcolinesterase (AChE). A

inibição da AChE leva à chamada crise colinérgica, com vários efeitos, inclusive a morte por deficiência respiratória (SILVA et al., 2012).

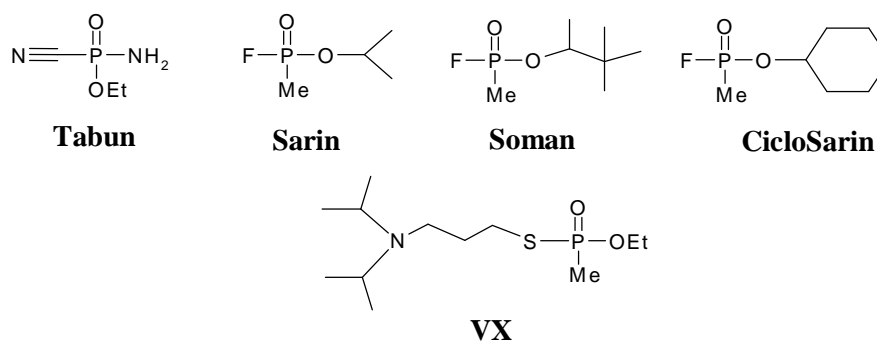
Foi na Primeira Guerra Mundial, em 1915, que as armas químicas ganharam importância militar. Naquele momento, o exército alemão utilizava gás cloro contra tropas aliadas da Bélgica. Entretanto, foi somente na Segunda Guerra Mundial que se desenvolveram agentes de guerra mais potentes chamados organofosforados, agentes neurotóxicos ou “agentes dos nervos”. Esses possuem toxicidade muito mais elevada do que os anteriormente conhecidos. A alta toxicidade aliada ao baixo custo despertou o interesse de organizações terroristas, fazendo com que a defesa contra armas químicas deixasse de ser uma preocupação estritamente militar e passasse a ser também uma preocupação civil (GIACOPPO et al., 2014; GONÇALVES, 2009).

Gerhard Schraeder ao pesquisar novos inseticidas, com base na estrutura de um organofosforado, sintetizou o *o*-etil-N, N-dimetil-fosforamido-cianidato e *o*-isopropil-metil-fosfono-fluoridato, conhecidos, respectivamente por Tabun e Sarin. Devido à elevada toxicidade dos compostos, seus usos como inseticidas foram descartados. No entanto, o alto poder destruidor dessas substâncias despertou o interesse dos alemães que as produziram e as estocaram, tendo no final da Segunda Guerra Mundial estoques entre 10.000 a 30.000 toneladas de Tabun e menores quantidades de Sarin. Em 1944, Richard Kuhn sintetizou o *o*-pinacolil-metil-fosfono-fluoridato, conhecido como Soman (EYER; WOREK, 2007; WOREK et al., 2005).

Ao final da guerra, vários países iniciaram pesquisas nessa área, atribuindo à OTAN (Organização das Nações Unidas) códigos de identificação aos agentes químicos: GA (Tabun), GB (Sarin), GD (Soman). Neste cenário, é produzida na Inglaterra uma nova classe de neurotóxicos, destacando-se o *o*-etil-S-[2-(di-isopropilamino)-etil]-metil-fosfonotioato (VX - código OTAN) (SILVA et al., 2012).

Esses agentes químicos (FIGURA 1), devido às suas características, são sintetizados para uso em munição química, sendo estocados em grandes quantidades por vários países (SILVA et al., 2012).

Figura 1 - Estruturas de compostos organofosforados.



Atualmente, a preocupação com os agentes químicos concentra-se nos neurotóxicos inibidores da AChE, incluindo inseticidas organofosforados, carbamatos, haletos de sulfonila, proteínas naturais do grupo da fasciculina e outros inibidores sintéticos reversíveis altamente específicos (GONÇALVES, 2009).

Não obstante a proibição do uso de armas químicas em vigor desde 1997 pela Convenção sobre Armas Químicas, a preocupação com esses agentes é pertinente visto que em 1988 teve-se o primeiro relato do uso de um agente neurotóxico, o Sarin, pelo Iraque. Em 1994, ocorreu ataque terrorista em Matsumoto, no Japão, utilizando-se novamente o Sarin. Em 1995, esse gás é utilizado em Tóquio pelo mesmo grupo terrorista que atacou Matsumoto. Soldados americanos foram intoxicados por esse composto durante a Guerra do Golfo, em 1991, provavelmente durante a destruição de um depósito de armas químicas no Iraque. Em 2003, os Estados Unidos invadiram o Iraque em busca



de armas químicas. Em 2004, uma granada de gás Sarin explodiu em Bagdá (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014; ROSMAN et al., 2014). Em 21 de agosto de 2013, o mesmo agente neurotóxico foi utilizado na Síria (Damasco) causando a morte de 1.400 civis (ROSMAN et al., 2014).

## **2.2 Defensivos agrícolas**

Agrotóxicos são substâncias utilizadas para reduzir e/ou exterminar pragas que atacam as culturas agrícolas (KUMAR; KIM; DEEP, 2015).

Compostos organofosforados são largamente utilizados na agricultura como defensivos agrícolas. Essas substâncias apresentam uma ótima atividade como agrotóxicos. No entanto, deve-se levar em conta também seu grau de toxicidade (CARULLO et al., 2015).

A utilização de compostos organofosforados data de tempos remotos, mas seus efeitos deletérios só foram relatados em 1932. Apesar de se conhecer atualmente seus malefícios, o uso desses compostos é altamente disseminado devido a sua importância econômica, principalmente em países subdesenvolvidos (CARULLO et al., 2015).

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem colaborado com a degradação ambiental e com o aumento de intoxicações ocupacionais, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no meio rural (LONG et al., 2015).

Em 1962, Carson alerta sobre o problema da contaminação ambiental e humana decorrentes do uso de pesticidas. Segundo a autora, essas substâncias fixam-se no solo por um longo período de tempo, podendo assim entrar em contato com seres vivos, iniciando uma cadeia de envenenamento (KÖRBES, 2009).

O uso indiscriminado de agrotóxicos torna as pragas resistentes aos princípios ativos e com isso, faz-se necessária a utilização de uma maior quantidade e variedade de produtos. O aumento do consumo infere na expansão

dos riscos inerentes a esses produtos, contribuindo assim com o agravamento da problemática do agrotóxico (BEDOR et al., 2007).

A taxa de intoxicação por organofosforados no Brasil ainda é alta. A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que ocorra no mundo três milhões de casos de envenenamento por pesticidas ao longo do ano com 220.000 mortes relatadas (SILVA, 2012).

A alta prevalência de casos de intoxicação no Brasil (TABELA1) revela a precariedade com que são realizadas as aplicações nos campos, ausência de equipamentos de segurança, além do uso descontrolado dessas substâncias (ARAÚJO et al., 2007).

Tabela 1 - Dados de intoxicações/óbitos segundo a SINTOX 2011 (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas)

	<b>Intoxicações</b>	<b>Óbitos</b>
<b>Agrotóxicos de uso agrícola</b>	5.075	129
<b>Agrotóxicos de uso em geral</b>	11.106	146

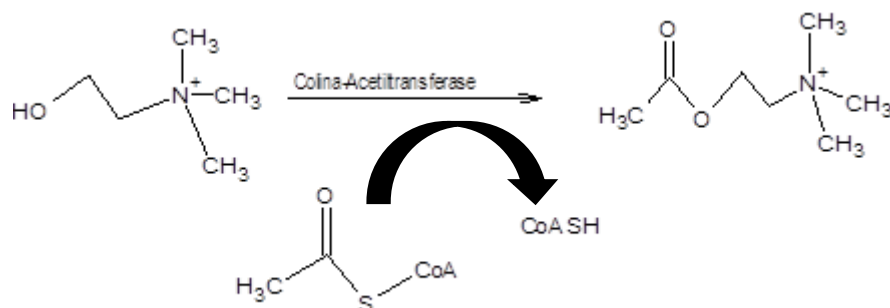
Os defensivos organofosforados apresentam efeito anticolinesterásico, ou seja, agem inibindo a AChE. Os principais sintomas da intoxicação são lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios sendo estes, os principais responsáveis pela morbidade e mortalidade de tais produtos (KUMAR; KIM; DEEP, 2015).

Uma das maneiras de reduzir a elevada taxa de intoxicações por pesticidas seria aumentar a fiscalização na utilização dos mesmos promovendo assim uma maior proteção à população e ao meio ambiente (KÖRBES, 2009).

### 2.3 Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor biossintetizado a partir de uma reação de acetilação entre colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), catalisada pela enzima colina acetiltransferase (FIGURA 2). A colina é obtida através da alimentação ou pela degradação da própria acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase (AChE).

Figura 2 - Reação de biossíntese de acetilcolina (ACh).



A acetilcolina pode atuar tanto no sistema nervoso central (sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição) quanto no sistema nervoso periférico (contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos) (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

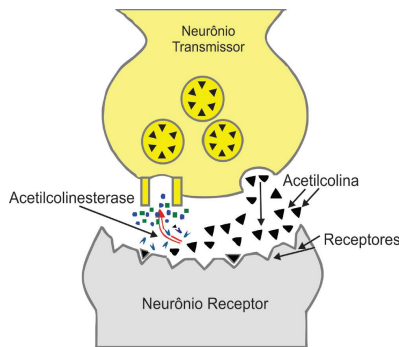
Tabela 2 - Efeitos estimulantes dos colinoceptores de ação direta.

<b>Órgão</b>	<b>Resposta</b>
<b>Olho</b>	
Esfíncter muscular da íris	Contração (meiose)
Músculo ciliar	Contração para visão para perto
<b>Coração</b>	
Nodo sinoatrial	Diminuição da frequência (cronotropismo negativo)
Átrios	Diminuição da força contrátil (inotropismo negativo). Diminuição do período refratário
Nodo atrioventricular	Diminuição da velocidade de condução (dromotropismo negativo). Aumento do período refratário.
Ventrículos	Pequena diminuição da força contrátil
<b>Vasos sanguíneos</b>	
Artérias, veias	Dilatação (via EDRF). Constrição (efeito direto de dose alta)
<b>Pulmão</b>	
Músculos brônquicos	Contração (broncoconstrição)
Glândulas brônquicas	Estimulação
<b>Trato gastrintestinal</b>	
Motilidade	Aumento
Esfíncteres	Relaxamento
Secreção	Estimulação
<b>Bexiga urinária</b>	
Detrusor	Contração
Trígono e esfíncter	Relaxamento
<b>Glândulas</b>	
Sudoríparas, salivares, lacrimais, nasofaringianas	Secreção

Esse neurotransmissor é formado na região terminal dos neurônios (axônio terminal) e armazenado em vesículas sinápticas. Estas vesículas são

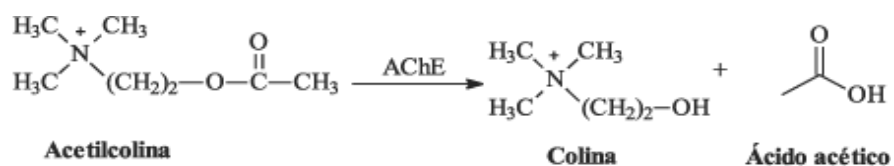
induzidas a excitação pela abertura dos canais cálcio voltagem dependente. Elas se rompem liberando acetilcolina que passa pela fenda sináptica se ligando aos receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) (FIGURA 4). Assim que ocorre essa ligação os canais de sódio e potássio se abrem permitindo a saída do potássio e entrada do sódio. Quando a acetilcolina interage com os receptores, regenera o impulso nervoso no neurônio, levando assim à continuidade da transmissão (QUINN, 1987; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Figura 3 - Processo de transmissão nas sinapses colinérgicas.



Após romper sua ligação com os receptores, a ACh retorna a fenda sináptica e, para evitar que esta se ligue novamente a outro receptor, é necessário que ela seja desativada. Sua desativação ocorre por meio de uma reação de hidrólise catalisada pela enzima acetilcolinesterase (FIGURA 5). A ação desta enzima impede que ocorra o excesso de transmissão nervosa, que pode levar a problemas de funcionamento do corpo (ALBUQUERQUE et al., 2006; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Figura 4 - Reação de hidrólise da acetilcolina.



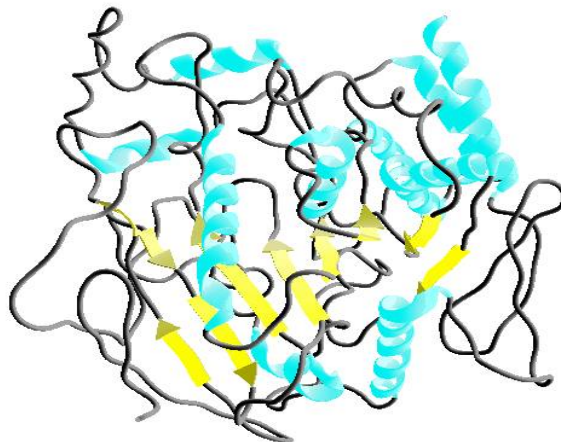
Uma parte da colina obtida da reação de hidrólise é reabsorvida pelo neurônio pré-sináptico para ser reconvertida em ACh (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

## 2.4 Acetilcolinesterase

Dentro da superfamília alfa/beta hidrolases, encontra-se a família de serino-hidrolases dentro da qual estão inseridas as colinesterases. Existem dois tipos de colinesterases, as acetilcolinesterase (AChE) (FIGURA 5) e os butirilcolinesterases (BuChE) (SILVA, 2009).

A AChE (EC 3.1.1.7) é a enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e acetato. A acetilcolinesterase possui notória ação catalítica, hidrolisando, por minuto, até  $6 \times 10^5$  moléculas de acetilcolina por molécula de enzima (ARDUINI et al., 2010).

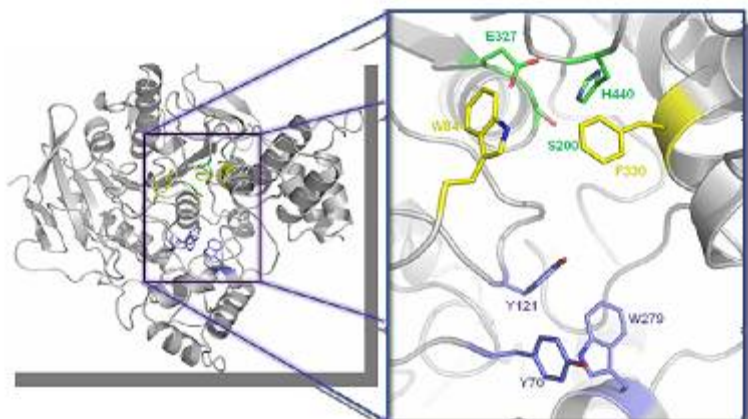
Figura 5 - Estrutura tridimensional da *HsAChE* obtida do PDB (Código: 3LII).



O sítio catalítico da enzima AChE (FIGURA 6) é composto por três resíduos de aminoácidos que estão diretamente envolvidos no processo de hidrólise da acetilcolina. Estes aminoácidos são conhecidos como serina (Ser<sub>200</sub>), histidina (His<sub>440</sub>) e ácido glutâmico (Glu<sub>327</sub>). Encontra-se também no sítio ativo dessa enzima uma região aniônica que interage com a parte catiônica da ACh. Acerca de 14Å do sítio ativo, existe o sítio aniônico periférico, um segundo sítio ligante.

Além desses sítios, existe ainda o sítio de ligação à colina. Esse pode ser alvo de inibidores, que impediriam a saída do produto da reação (ALMEIDA, 2011).

Figura 6 - Sítio ativo da acetilcolinesterase.



A AChE é considerada um dos alvos moleculares mais vulneráveis a agentes neurotóxicos, pesticidas e venenos de cobras, e, também, a fármacos voltados para o tratamento de doenças como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer devido à função chave dessa enzima (PUDLO et al., 2014).

### 2.5 Inibidores da Acetilcolinesterase

Inibidores são compostos que interagem com uma enzima provocando a diminuição de sua atividade. Esses podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo do tipo de ligação presente no complexo enzima/inibidor (NELSON; COX, 2014).

Os inibidores mais comuns da AChE são os organofosforados e os carbamatos, apresentando grau variado de toxicidade em humanos. Esses compostos, a priori utilizados na agricultura, passaram a ser usados como armas químicas principalmente depois da II Guerra Mundial (GIACOPPO et al., 2014).

Os compostos organofosforados merecem uma atenção especial por se tratarem de inibidores irreversíveis. Nesse caso, eles irão impedir a reação de hidrólise da acetilcolina ocasionando um excesso de transmissão nervosa,

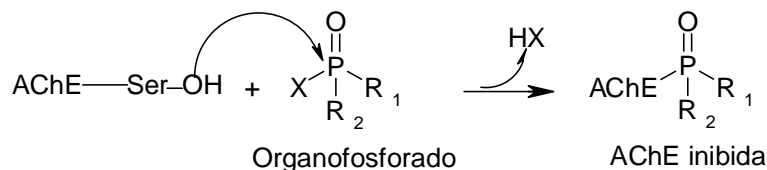


podendo levar o indivíduo à crise colinérgica (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

## 2.6 Inibição, reativação e envelhecimento da AChE

A inibição da acetilcolinesterase (FIGURA 7) ocorre no interior do sítio ativo, próxima à tríade catalítica. Alguns organofosforado ligam-se covalentemente a Ser203 (grupo hidroxila), interferindo no mecanismo catalítico da AChE (FIGURA 7). Esses compostos impedem a hidrólise da ACh, aumentando a transmissão colinérgica (GONÇALVES et al., 2006; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

Figura 7 - Esquema da inibição da AChE por OP, sendo, R<sub>1</sub> o grupo alquil, O-alquil ou amida; R<sub>2</sub> o grupo O-alquil ou amida; e X o grupo abandonador.

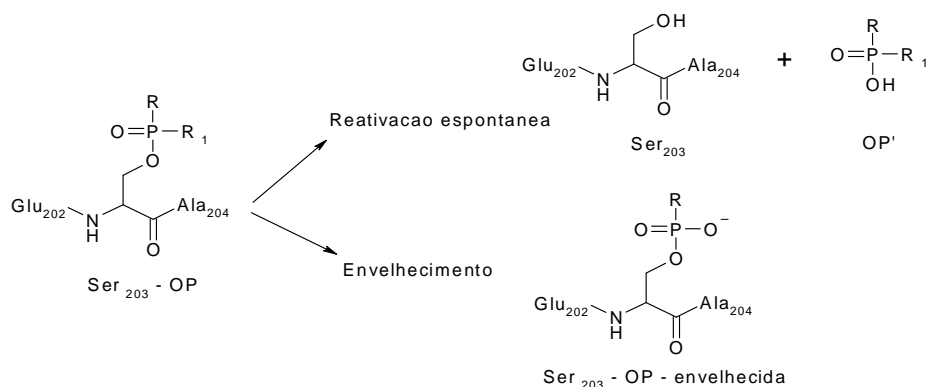


A enzima inibida pode agora sofrer o processo de envelhecimento ou reativação espontânea (FIGURA 8). A reativação espontânea, por ser extremamente lenta, deve ter seu processo acelerado pela adição de um nucleófilo forte como uma oxima. Na ausência da oxima, a reativação ocorrerá a uma taxa insignificante tornando a reação de envelhecimento majoritária (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

O processo de envelhecimento ocorre através de uma reação de eliminação ou pela desalquilação espontânea do fósforo conjugado na AChE, com quebra da ligação oxigênio-alquila. Como resultado, tem-se um complexo aniônico bastante estável, sendo esse resistente à reação de reativação por oximas ficando a AChE inibida irreversivelmente (HÖRNBERG;

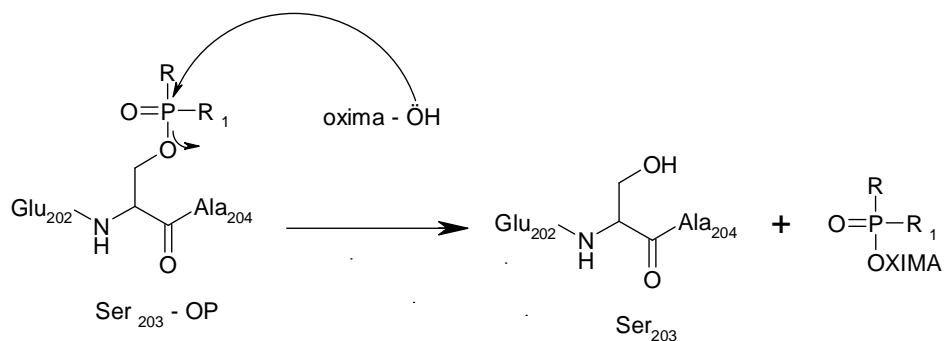
TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

Figura 8 - Esquema da reativação espontânea e do envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alkil ou amida; R1 o grupo O-alkil ou amida (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007)



A reativação da AChE se baseia na desfosforilação da Ser203 (FIGURA 9). Esse é o principal mecanismo de ação das oximas. No caso de oximas que possuem nitrogênio aromático, ocorrerá, no processo de reativação, a atração da porção positivamente carregada da molécula de oxima pelo sítio aniônico da AChE, permitindo, assim, que a parte ativa da oxima se posicione sobre o sítio fosforilado da AChE e promova o ataque nucleofílico, como pode ser visto na Figura 10 (ALMEIDA 2011; ROSMAN et al., 2009).

Figura 9 - Reação de reativação do conjugado AChE-OP por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-álquil ou amida; R1 o grupo O-álquil ou amida.



A eficácia da reação supracitada depende de fatores como as estruturas químicas do OP e do reativador (oxima). Cabe ressaltar que complexos formados entre a AChE e o agente neurotóxico Tabun, por exemplo, são altamente resistentes à reativação, enquanto complexos formados com os agentes neurotóxicos VX e Sarin podem ser reativados por diferentes substâncias (MATOS, 2012).

## 2.7 Detecção de organofosforado

A problemática que envolve os compostos organofosforado tem estimulado os pesquisadores a desenvolverem métodos sensíveis e seletivos para a detecção destes compostos (CARULLO et al., 2015).

Várias técnicas têm sido estudadas para detectar OFs, porém a maior parte destas ainda é bastante onerosa e pouco eficiente (KERKINES; PETSALAKIS; THEODORAKOPOULOS, 2011). Dentre os principais métodos utilizados na detecção, podemos citar: cromatografia em fase gasosa e líquida, espectrometria de massa, espectroscopia de RMN e detecção eletroquímica (KUMAR; KIM; DEEP, 2015).

Os meios mais comuns para a detecção de pesticidas organofosforados são métodos cromatográficos acoplados com detectores diferentes e vários tipos

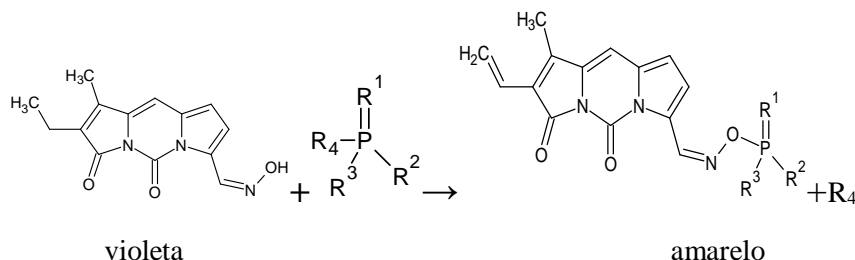
de espectroscopia. Entretanto, uma alternativa aos métodos clássicos para a detecção de pesticidas OFs é o desenvolvimento de sensores ópticos ou químicos, ou seja, colorimétricos ou fluorescentes (CARULLO et al., 2015).

O método de fluorescência é baseado na reação química entre a substância a ser analisada (organofosforado) com um sensor molecular (composto cromóforo). O produto desta reação apresentará alterações em suas propriedades fluorescentes. Essa alteração das propriedades de fluorescência pode envolver o aumento, diminuição ou até mesmo uma mudança significativa no comprimento de onda da fluorescência (isto é, a mudança de cor), em relação ao reagente. O processo de detecção pode tornar-se mais útil se a alteração da fluorescência ocorrer na parte visível do espectro e se o produto formado não for tóxico (KERKINES; PETSALAKIS; THEODORAKOPOULOS, 2011).

Os sensores baseados em fluorescência, biossensores e sensores químicos oferecem vantagens significativas sobre outros métodos convencionais para a detecção de compostos OFs. As principais vantagens da fluorescência são a sua elevada sensibilidade, resposta rápida e baixo limite de detecção (ZHANG et al., 2015).

Recentemente, oximas têm sido utilizadas como sensores químicos na técnica de fluorescência (KERKINES; PETSALAKIS; THEODORAKOPOULOS, 2011; WALTON et al., 2012). Elas sofrem uma drástica reação colorimétrica quando formam o aduto, de acordo com a Figura 10.

Figura 10 - Reação colorimétrica entre um sensor molecular e um organofosforado.



Vários estudos estão sendo realizados buscando-se investigar o processo de fluorescência dos sensores químicos, analisando-se o aumento, diminuição ou ausência de fluorescência (TANGOD et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

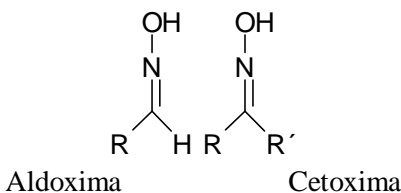
## 2.8 Oximas

As oximas são compostos químicos estáveis e de fácil preparação. Essa classe de compostos começou a ser estudada de forma significativa em 1905, quando Lev Tschugaeff mostrou que a dimetilglioxima poderia ser usada na determinação gravimétrica de Ni (II). A fácil preparação aliada às diferentes aplicações na indústria química e farmacêutica fizeram com que os pesquisadores continuassem estudando essa classe de compostos.

As oximas são consideradas compostos análogos às iminas, sendo essas compostos orgânicos que possuem fórmula geral  $RR'C=NR''$ . Essas substâncias são obtidas a partir de reações de condensação entre aldeídos e cetonas com compostos que apresentam o grupamento  $NH_2$ .

Oximas possuem fórmula geral  $RR'C = N-OH$ , sendo classificadas em aldoximas e cetoximas de acordo com a natureza dos radicais R e R'. As oximas que apresentam duas cadeias laterais alquilas (R e R') são chamadas de cetoximas; já as que apresentam um hidrogênio no lugar de R ou R' são denominadas aldoximas.

Figura 11 - Estrutura química das oximas.



Várias oximas têm sido utilizadas como reativadores da acetilcolinesterase na intoxicação por organofosforados. No entanto, nenhuma apresentou atividade satisfatória frente a vários OFs, sendo sua ação limitada aos OFs específicos. Alguns pesquisadores dedicam-se, então, ao estudo de oximas não para tratar intoxicação por organofosforados e sim para detectar esses compostos.

## 2.9 Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência tem se mostrado uma técnica promissora tanto no diagnóstico de doenças quanto na detecção de compostos organofosforados (SHAHZAD et al., 2009).

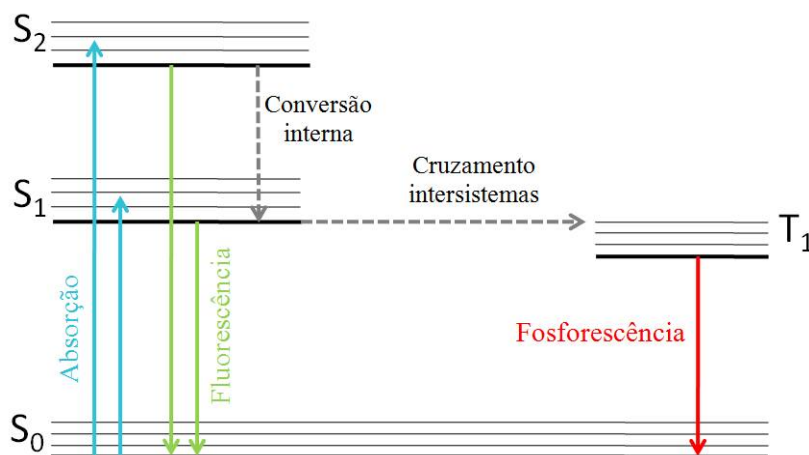
Em condições normais, a maior parte das moléculas se encontra no estado fundamental, ou seja, estado de menor energia. Para que ocorra a ocupação de níveis mais energéticos, é necessária a absorção de luz. Após a absorção, a energia absorvida será reemitida e esse fenômeno é chamado de fluorescência se esta reemissão ocorrer a partir do primeiro estado de singlete excitado (SIERRA et al, 1996).

Identificada como um processo radioativo, a fluorescência é caracterizada pelas transições  $\pi^* \rightarrow \pi$  (entre orbitais pi antiligantes – orbital pi ligante) e em menor escala  $\pi^* \rightarrow n$  (entre orbitais pi antiligantes – orbitais não ligantes) (LAKOWICZ, 2006).

A transição eletrônica está intimamente ligada ao tipo de estrutura molecular dos cromóforos (região da molécula responsável pela cor), isto é, qualquer alteração nessa estrutura poderá influenciar no comprimento de onda absorvido (FORESTIER, 2008; CORRÊA, 2010).

A emissão de energia ocorre do nível eletrônico excitado de menor energia. Após a excitação, a molécula poderá retornar ao estado fundamental através do processo de fluorescência ou desativar-se para o estado fundamental por dois caminhos: cruzamento entre sistemas (IC, do inglês internal conversion) ou conversão intersistemas (ISC, do inglês intersystem crossing). O IC ocorre entre spins de mesma multiplicidade [singleto (S2) – singleto (S1); tripleto (T2) – tripleto (T1)]. Já o ISC é observado entre spins de diferentes multiplicidades (singleto – tripleto), ocorrendo, assim, o processo conhecido como fosforescência (LAKOWICZ, 2006; ZHAO et al., 2012). Esses processos descritos anteriormente são caracterizados como não radioativos (competem com a fluorescência) e podem ser visualizados de forma resumida pelo diagrama de Jablonski (FIGURA 10) (LAKOWICZ, 2006). Podemos observar neste diagrama tanto os estados eletrônicos de uma molécula quanto as possíveis transições eletrônicas entre esses estados. Os estados estão organizados verticalmente por energias e agrupados horizontalmente por multiplicidade de spin. As transições radiativas são indicadas por setas retas e cheias.

Figura 12 - Diagrama de Jablonski simplificado.



A energia de transição eletrônica é igual à diferença de energia entre o primeiro e o último nível energético. Portanto, a transição de energia  $E$  ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) é determinada pela Equação 1 (LAKOWICZ, 2006):

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Em que  $h$  é a constante de Planck ( $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$ ),  $c$  é a velocidade da luz e  $\lambda$  é o comprimento de onda (nm). Portanto, cada transição ocorre com uma energia específica e, assim, um comprimento de onda é específico e único (LAKOWICZ, 2006).

O rendimento quântico de fluorescência ( $Q$ ) é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, como descrito na Equação 2:



$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Em que  $\Gamma$  é a taxa emissiva da molécula fluorescente e  $k_{nr}$  é a taxa não radioativa de decaimento para o estado fundamental ( $S_0$ ).

O tempo de vida do estado excitado é definido pela média do tempo que a molécula gasta no estado excitado para retornar ao estado fundamental. Geralmente, o tempo de vida ( $\tau$ ) fluorescente pode variar de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  s e é determinado pela Equação 3 (LAKOWICZ, 2006):

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3)$$

A emissão de fluorescência é um processo aleatório e poucas moléculas emitem seus fótons precisamente (LAKOWICZ, 2006). O tempo de vida da molécula fluorescente na ausência de um processo não radiativo é chamado de tempo de vida intrínseca ou natural e é dada pela Equação 4:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (4)$$

Muitas moléculas absorvem radiação ultravioleta ou visível, porém, poucas apresentam fluorescência. A presença de uma estrutura suficientemente rígida é uma condição fundamental para que ocorra a fluorescência (BARBATTI et al., 2009; KUNGWAN et al., 2012; ZHAO et al., 2012).

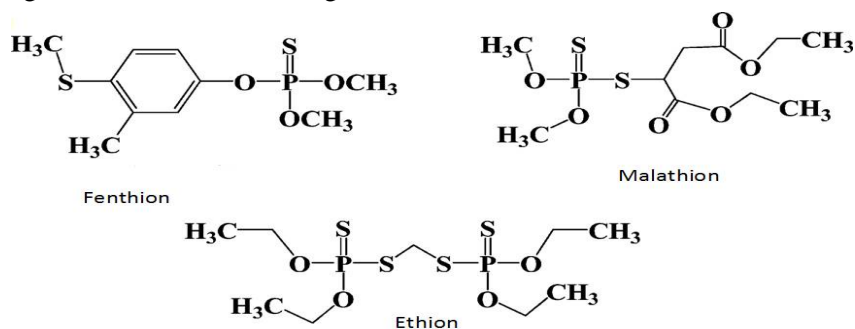
Fatores externos como temperatura, efeitos dos substituintes e o solvente influenciam o fenômeno da fluorescência. Um aumento da temperatura acarretará uma perda na eficácia da fluorescência devido ao aumento das

conversões internas causado pelo aumento da probabilidade de choques efetivos no estado excitado.

Com relação aos efeitos dos substituintes, teremos um aumento da eficácia da fluorescência quando grupos doadores de elétrons estiverem presentes e uma diminuição da eficácia com a presença de grupos retiradores de elétrons. A interação com o solvente já é mais complexa e essa dependerá do pH, da solvatação, da possibilidade de formar ligações de hidrogênio, da viscosidade, da força iônica, da polaridade do solvente etc. (BARBATTI et al., 2009; BÜHL; GOLUBNYGHIY, 2008; RAMALHO; PEREIRA; THIEL, 2011).

A técnica de detecção por fluorescência tem sido reportada por vários autores. Guo et al. (2011) utilizaram BDPPZ (benzodipyrido [3,2-a:2',3'-c] phenazine) e DM-BDPPZ (3,6-dimethylbenzodipyrido-[3,2-a:2',3'-c] phenazine) como sondas fluorescentes para a detecção dos organofosforado seshion, malathion e fenthion (FIGURA 11). A diferença na fluorescência produzida pela interação dos compostos com os pesticidas permitiu distinguir os três organofosforados. Sierra et al. (1996) relataram a utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida em águas naturais; já Gonçalves e Marsaioli (2014) utilizaram sondas fluorescentes no monitoramento de atividades enzimáticas.

Figura 13 - Estrutura dos organofosforados Fenthion, Ethion e Malathion.



## 2.10 Sensores fluorescentes

Sensores ópticos, isto é, sensores químicos ou fluorescentes, surgiram como alternativa aos métodos clássicos de detecção. Sua elevada sensibilidade e resposta quase instantânea na maior parte dos casos são os principais responsáveis pelo destaque dessa técnica (OBARE et al., 2010).

Vários estudos utilizando sensores químicos ópticos para detecção de OFs têm sido relatados na literatura. Van Houten, Heath, Pilato (1998) foram os responsáveis pelo primeiro sensor químico fluorescente para detecção de agente dos nervos. Eles sintetizaram um complexo de platina misturado a um álcool primário sendo que esse álcool foi convertido a éster de fosfato após a adição do composto organofosforado. O éster de fosfato reagiu intermolecularmente formando um produto cíclico fluorescente. Zhang e Swager (2003) desenvolveram uma série de compostos que após serem expostos aos agentes neurotóxicos sofreram uma reação de ciclização intermolecular resultando em um deslocamento batocrômico na absorção e fluorescência desses sensores (PALIWAL et al., 2007). Paliwal et al. (2007) sintetizaram um sensor fluorescente com base em curmarinas.

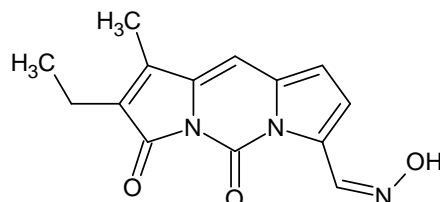
Para uma molécula emitir fluorescência, ela precisa possuir um grupo funcional denominado por fluoróforo. Esse grupamento absorve energia a partir de um comprimento de onda específico e emite luz a um comprimento de onda mais longo, ou seja, de menor energia. Os fluoróforos são também conhecidos como corantes fluorescentes ou sondas (CUNHA, CARVALHO, DODE, 2015).

As moléculas com propriedades fluorescentes absorvem energia (UV) fazendo com que os elétrons se excitem e ocupem níveis mais energéticos. Ao retornarem aos níveis de menor energia os elétrons transferem toda a energia do fóton para o fluoróforo, o que resulta na emissão de fluorescência (CUNHA, CARVALHO, DODE, 2015).

A presença somente do grupamento fluoróforo pode não garantir a emissão de fluorescência. Isso porque a molécula precisa apresentar outras características tais como rigidez estrutural, planaridade, ligações  $\pi$  conjugadas, as quais normalmente são formadas por grupos funcionais aromáticos e/ou anéis condensados (MOTA et al., 2015).

As oximas por apresentarem o grupamento fluoróforo e possuírem uma estrutura rígida e plana e elétrons  $\pi$  (FIGURA 12) estão sendo usadas como sondas fluorescentes. Walton et al. (2012) utilizaram em um de seus experimentos a oxima N, N-carbonil-dipyrinone para identificação do organofosforado DFP (diisopropilfluorofosfato) obtendo um complexo fluorescente com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 400 nm.

Figura 14 - Estrutura da oxima dipyrinone.



## 2.11 Química computacional

A química computacional vem se destacando cada vez mais no cenário atual devido à economia de tempo e dinheiro investidos na produção e introdução de novos produtos no mercado quando comparada aos métodos experimentais. Ela nos possibilita a obtenção de resultados extremamente confiáveis de uma infinidade de propriedades, sendo possível assim a resolução de inúmeras questões da química e de outras áreas do conhecimento (LACERDA JUNIOR, 2007). Os cálculos teóricos permitem determinar estados de transição, intermediários, calcular com precisão a geometria, estabelecer a

superfície potencial de moléculas, enfim, descrever todo o caminho de uma reação com um elevado grau de precisão (SZABO; OSTLUND, 1989).

Existem diversos métodos de cálculos de química teórica. Isso ocorre porque tanto a aproximação de um próton a um fragmento molecular quanto o comportamento de fármaco no sítio ativo de uma enzima podem representar um problema químico. Desta forma, cada método de cálculo tem sua especificidade e faixa de aplicabilidade. Cabe ressaltar, no entanto, que a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) tem se destacado dentre os demais métodos por utilizar a densidade eletrônica em detrimento da função de onda (MOTA et al., 2015).

### 2.11.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

A Teoria do Funcional de Densidade (DFT) determina que a energia do estado fundamental pode ser calculada pela densidade eletrônica, ou seja, a informação sobre o sistema é transferida da função de onda para a densidade eletrônica. A não utilização da função de onda possibilita ao DFT incluir em seus cálculos efeitos de correlação eletrônica (CRAMER; TRUHLAR, 2009).

A DFT tem sido usada para estudar estruturas cada vez mais complexas, isso porque a integral para repulsão de Coulomb necessita ser feita somente sobre a densidade eletrônica, que é uma função tridimensional, logo escala como  $N^3$ , em que  $N$  é o número de funções de bases. Já os métodos *ab initio*, escalam acima de  $N^4$  (KIRKPATRICK; GELATT; VECCI, 1983).

As vantagens citadas anteriormente são as principais responsáveis pela emergência da aproximação DFT como um método computacional tangível e versátil. Nesse sentido, a DFT é empregada com sucesso na obtenção de dados termodinâmicos, estruturas moleculares, campos de forças e frequências, estruturas de estados de transição, espectroscopia ultravioleta, EPR (ressonância paramagnética eletrônica), fotoeletrônica e RMN (ressonância magnética nuclear), bem como na determinação de barreiras de ativação, momentos de

dipolos e outras propriedades eletrônicas (BECKE, 1993; DUARTE; ROCHA, 2007; FUKUI, 1981; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; LEE; YANG; PARR, 1988).

A DFT se baseia na teoria proposta por Thomas e Fermi, em que a energia cinética e a energia de Coulomb dos elétrons eram expressas somente pela densidade (FERMI, 1928; THOMAS, 1927). O método DFT é baseado na densidade eletrônica, designada por  $\rho(r)$ , uma função tridimensional que carrega toda informação do sistema. Um funcional de densidade é utilizado para obter a energia para a densidade eletrônica, e a minimização desse funcional leva a energia do estado fundamental do sistema multieletrônico. É preciso ter em mente que um funcional é uma função de uma função que, nesse caso, é a densidade eletrônica. Existe uma gama de diferentes funcionais que podem apresentar vantagens e/ou desvantagens na descrição de um sistema (FERREIRA, 2011; KOCH; HOLTHAUSEN, 2001; ROCHA, 2013).

O teorema da existência de Hohenberg e Kohn (1964) prova que existe um único funcional, tal que

$$E[\rho(r)] = E_{elec} \quad (5)$$

Em que  $E_{elec}$  é a energia eletrônica exata. Além disso, demonstra-se que a densidade do elétron obedece ao teorema variacional.

A fim de resolver a energia pelo método DFT, Kohn e Shan propuseram que o funcional tem a forma, de acordo com a equação:

$$E[\rho(r)] = T_e[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (6)$$

Em que o termo da energia potencial de atração núcleo-elétron  $V_{ne}$ , é

$$V_{ne}[\rho(r)] = \sum_j^{nuclei} \int \frac{Z_j}{|r - r_k|} \rho(r) dr \quad (7)$$

$V_{ee}$ , é a energia potencial de repulsão elétron-elétron dada pela equação 8:

$$V_{ee}[\rho(r)] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (8)$$

E  $E_{xc}$  é um termo que inclui todos os efeitos de correlação eletrônica. Em geral, esse termo é dividido em uma energia de troca  $E_x$  e uma energia de correlação  $E_c$ . A dificuldade no método DFT e, portanto, a definição do funcional  $E_{xc}$  é o aspecto que os vários métodos diferem.

Os métodos LDA (do inglês local density approximation) assumem que a densidade pode ser tratada uniformemente em âmbito local. Dessa forma, o termo  $E_{xc}$  é função apenas da densidade eletrônica. Uma considerável melhora foi obtida por meio das aproximações do gradiente generalizado (GGA). Os métodos GGA (do inglês generalized gradient approximation) consideram a densidade eletrônica como não uniforme, de forma que suas derivadas são incluídas nos funcionais. Métodos híbridos incluem uma mistura da energia de troca resultante do cálculo HF com funcionais de troca e correlação da teoria DFT e, geralmente, são considerados os mais precisos (JENSEN, 2007; KOCH; HOLTHAUSEN, 2001).

Como mencionado anteriormente, o método DFT é utilizado para cálculos de sistemas multieletrônicos no estado fundamental. Ou seja, no caso dos estudos em que são descritas transições eletrônicas em estados excitados, é preciso utilizar recursos adicionais, como a teoria do funcional da densidade

dependente do tempo (TD-DFT, do inglês time dependent density functional theory) (KUNGWAN et al., 2012)

### 2.11.2 Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT)

A TD-DFT é uma extensão da DFT, na qual se baseia em princípios da mecânica quântica dependente do tempo (JENSEN, 2007). Devido ao sucesso da aplicação do método DFT no estado fundamental, a descrição de estados dependentes do tempo (estados excitados), em termos do funcional da densidade, tem sido realizada. Por meio desse método é possível obter resultados de energias de excitações, assim como as propriedades espectroscópicas (absorção e emissão) de uma molécula (BARBATTI et al., 2009; SALZMANN et al., 2009).

A equação de Schrödinger dependente do tempo para um sistema de  $N$  elétrons e coordenadas  $r = (r_1, \dots, r_N)$  pode ser expressa de acordo com a Equação 9 (BURKE; GROSS, 1998).

$$i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(r, t) = \hat{H}(r, t) \Psi(r, t) \quad (9)$$

Assim, o hamiltoniano do sistema fica na forma

$$\hat{H}(r, t) = \hat{T}(r, t) + \hat{U}(r, t) + V_{\text{ext}}(r, t) \quad (10)$$

Em que  $\hat{T}$  representa a energia cinética e  $\hat{U}$  é a repulsão de Coulomb entre os elétrons. Além disso, os elétrons estão sob a influência de um potencial externo dependente do tempo  $V_{\text{ext}}$  (EQUAÇÃO 11).



$$V_{\text{ext}} = \sum_{i=1}^N v_{\text{ext}}(\mathbf{r}_i, t) \quad (11)$$

O método TD-DFT é baseado no teorema de Runge e Gross (1984). De acordo com esse teorema, para um dado sistema de elétrons em um determinado estado inicial, existe uma relação entre o  $V_{\text{ext}}$  e a densidade eletrônica dependente do tempo  $\rho(\mathbf{r}, t)$ . De posse do teorema Runge-Gross (RUNGE; GROSS, 1984), é possível escrever uma equação de Kohn-Sham (KS) dependente do tempo (EQUAÇÃO 12).

$$i \frac{\partial}{\partial t} \varphi_i(\mathbf{r}, t) = \left( -\frac{\nabla^2}{2} + v_{\text{KS}}[\rho](\mathbf{r}, t) \right) \varphi_i(\mathbf{r}, t) \quad (12)$$

### 3 OBJETIVOS

A partir do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de:

- a) Estudar a aplicação de derivados de oximas como sondas fluorescente de compostos organofosforado;
- b) Determinar, por meio de cálculos teóricos, os parâmetros espectroscópicos da sonda espectroscópica *I* (oximadipyrrinone) com organofosforados Sarin (GB), Soman (GD), Ciclosarin (GF), GV, VX, VE, VG, VM, DFP, DCP;
- c) Estudar a identificação múltipla de organofosforados pela sonda, avaliando os comprimentos de onda de emissão de cada composto;
- d) Avaliar o efeito do solvente sobre o processo de emissão de fluorescência dos compostos.



## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E. X. et al. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 35, p. 13220-13225, Aug. 2006.
- ALMEIDA, J. R. **Estudo de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. 2011. 144 p. Dissertação (Mestrado em Física Biológica)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 115-130, mar. 2007.
- ARDUINI, F. et al. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B-1 detection (review). **Microchimica Acta**, [S.l.], v. 170, n. 3-4, p. 193-214, Sept. 2010.
- BARBATTI, M. et al. Ultrafast internal conversion pathway and mechanism in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole: a case study for excited-state intramolecular proton transfer systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S.l.], v. 11, n. 9, p. 406-415, Mar. 2009.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry: 3., the role of exact exchange. **Journal of Chemical Physical**, Ithaca, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, July 1993.
- BEDOR, C. N. G. et al.. Avaliação e reflexos da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do submédio do Vale do São Francisco. **Revista Baiana de Saúde Pública**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 68-76, 2007.
- BOURNE, H. R. et al. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. **Cell**, Cambridge, v. 114, p. 201-214, July 2003.
- BÜHL, M.; GOLUBNYCHIY, V. Density-functional computation of <sup>99</sup>Tc NMR chemical shifts. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 46, n. 1, p. 36-44, May 2008.

BURKE, K.; GROSS, E. K. U. A guided tour of time-dependent density functional theory. In: JOUBERT, D. (Ed.). **Density functional: theory and applications**. Berlin: Springer, 1998. p. 116-46.

CARULLO, P. et al. Fluorescence Spectroscopy Approaches for the Development of a Real-Time Organophosphate Detection System Using an Enzymatic Sensor. **Sensors**, Naples, v. 15, n. 2, p. 3932-3951, Feb. 2015.

CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. **Toxicology: the basic science of poisons**. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

CORRÊA, B. A. M. **Modelagem molecular, docking e estudos teóricos do espectro eletrônico de absorção de derivados da benzofenona**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Density functional theory for transition metals and transition metal chemistry. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, n. 49, p. 10757-10816, Dec. 2009.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO J. O.; DODE, M. A. N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 4365-4376, set. 2015.

CUNHA, E. F. F. da; MANCINI, D. T.; RAMALHO, T. C. Molecular modeling of the *Toxoplasma gondii* adenosine kinase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 21, n. 5, p. 590-600, May 2012.

DICKOFF, D. J.; GERBER, O.; TUROVSKY, Z. Delayed neurotoxicity after ingestion of carbamate pesticide. **Neurology**, Minneapolis, v. 37, n. 7, p. 1229-1231, July 1987.

DOMINGOS, J. B. et al. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 745-753, out. 2003.

DUARTE, H. A.; ROCHA, W. R. Teoria do Funcional de Densidade. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

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

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

FERMI, E. Eine Statistische begründung zur bestimmung einiger eigenschaften des atoms und ihre anwendungen auf die theorie des periodischen systems der elemente. **Zeitschrift für Physik**, Berlin, v. 48, n. 1, p. 73-79, 1928.

FERREIRA, D. E. C. **Estudo teórico de modelos biomiméticos para a hidrólise de ésteres fosfóricos**. 2011. 154 p. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 58, n. 5, p. S133-S138, May 2008.

FUKUI, K. The path of chemical reactions: the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 14, n. 12, p. 363-364, Dec. 1981.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://sinitox.icict.fiocruz.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

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

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado Tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 206 p. Tese (Doutorado em Biofísica)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES, A. S. et al. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 968-975, set./out. 2006.

GONCALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Monitorando atividades enzimáticas com sondas fluorogênicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 1028-1036, jul. 2014 .

GUO, W. et al. Dual fluorescence and electrochemical detection of the organophosphorus pesticides-Ethion, malathion and fenthion. **Talanta**, Kalamazoo, v. 87, p. 276-283, Oct. 2011.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, New York, v. 136, n. 3B, p. 864-871, Nov. 1964.

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

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. 2. ed. New York: John Wiley, 2007.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, June 1988.

KARPLUS, M.; LEVITT, M.; WARSHEL, A. Nobel da química de 2013 para modelização por computador de reações químicas. **Público Comunicação Social**, [S.l.], out. 2013.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KERKINES, I. S. K.; PETSALAKIS, I. D.; THEODORAKOPOULOS, G. Excited-state intramolecular proton transfer in hydroxyoxime-based chemical sensors. **The Journal of Physical Chemistry A**, New York, v. 115, n. 5, p. 835-840, Feb. 2011.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, New York, v. 220, n. 4598, p. 671-680, May 1983.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **Chemist's guide to density functional theory**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

KÖRBES, D. **Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias**: estudo anatômico e funcional. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

KUMAR, P.; KIM, K. H.; DEEP, A. Recent advancements in sensing techniques based on functional materials for organophosphate pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, [S.l.], v. 70, p. 469-481, Mar. 2015.

KUNGWAN, N. et al. The effect of hydrogen bonding on the excited-state proton transfer in 2(2'-hydroxyphenyl) benzothiazole: a TDDFT molecular dynamics study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 14, n.25, p. 9016-9025, July 2012.

LACERDA JUNIOR, V. Reatividade em reações de diels-alder: uma prática computacional. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 727-730, jun. 2007.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Berlin: Springer, 2006.

LEE, C. et al. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, New York, v. 37, n. 2, p. 785-789, Jan. 1988.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, New York, v. 37, n. 2, p. 785-789, Jan. 1988.

LIMA, Patrícia P.; MALTA, Oscar L.; ALVES JUNIOR, Severino. Estudo espectroscópico de complexos de  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  e  $\text{Gd}^{3+}$  com ligantes derivados de ácidos dicarboxílicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 805-808, out. 2005.

LONG, Q. et al. Upconversion nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer assay for organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, [S.l.], v. 68, p. 168-174, Dec. 2015.



MANCINI, D. T. et al. Molecular modeling studies on nucleoside hydrolase from the biological warfare agent *Brucella suis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, New York, v. 30, n. 1, p. 125-136, May 2012.

MATOS, K. S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por Ciclosarin e carbofurano**. 2012. 148p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOTA, A. A. R. et al. Fotofísica teórica ( DFT) de sondas fluorescentes benzotiadiazólicas. *Revista Virtual de Química*, Brasília, v. 7, n. 1, p. 357-389, out. 2015.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, London, v. 9, n. 6, p. 732-737, June 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OBARE, X. et al. Fluorescent chemosensors for toxic organophosphorus pesticides: a review. *Sensors*, [S.l.], v. 10, p. 7018-7043, July 2010.

OBREGON, A. D. C. **3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados**: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase. 2006. 114 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ORDENTLICH, A. et al. Architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. *Journal of Biology Chemical*, Washington, v. 271, n. 20, p. 11953-11962, May 1996.

PALIWAL, S. et al. Fluorescence-based sensing of p-nitrophenol and p-nitrophenyl substituent organophosphates. *Analytica Chimica Acta*, [S.l.], v. 596, n. 1, p. 9-15, May 2007.

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

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.

PETRONILHO, E. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Agents for defense against chemical warfare: Reactivators of the inhibited acetylcholinesterase with organophosphorus neurotoxic compounds. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 3, p. 671-686, mar. 2014.

PUDLO, M. et al. Quinolone-benzylpiperidine derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant hybrids for Alzheimer Disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 22, n. 8, p. 2496-2507, Mar. 2014.

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

RAMALHO, T. C.; PEREIRA, D. H.; THIEL, W. Thermal and solvent effects on NMR indirect spin-spin coupling constants of a prototypical Chagas disease drug. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 115, n. 46, p. 13504-13512, Nov. 2011.

ROCHA, M. V. J. **Propriedades estruturais e térmicas do híbridoorgânico/inorgânico pmma-óxido de ferro**: um estudo teórico e experimental. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROSMAN, Y. et al. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event. **American Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 1117-1124, Jan. 2009.

ROSMAN, Y. et al. Lessons learned from the Syrian Sarin attack: Evaluation of a clinical syndrome through social media. **Annals of Internal Medicine**, [S.l.], v. 160, n. 9, p. 644-648, May 2014.

RUNGE, E.; GROSS, E. K. U. Density-functional theory for time-dependent systems. **Physical Review Letters**, [S.l.], v. 52, n. 12, p. 997-1000, Mar. 1984.

SALZMANN, S. et al. Influence of the LOV domain on low-lying excited states of flavin: a combined quantum mechanics/molecular-mechanics investigation.

**The Journal of Physical Chemistry B**, Ithaca, v. 113, n. 47, p. 15610-15618, Nov. 2009.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159-170, fev. 2007.

SHAHZAD, A.; EDETSBERGER, M.; KOEHLER, G. Fluorescencespectroscopy: an emerging excellent diagnostic tool in medical sciences. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 45, n. 1, p. 1-11, 2010.

SHAHZAD, A. et al. Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field. **Journal of Translational Medicine**, New York, v. 7, n. 99, p. 1-6, Nov. 2009.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. Medical aspects of chemical and biological warfare. In: \_\_\_\_\_. **Textbook of military medicine**. Washington: Office of the Surgeon General, 1997. p. 129-179.

SIERRA, M. M. S. et al. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3 p. 294-301, out. 1996.

SILVA, D. R. **Estudo teórico do mecanismo de inibição da acetilcolinesterase de torpedo californica por novos fosforamidatos**. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Modelagem Molecular)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

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

SINGH, S. et al. Is atropine alone sufficient in acute severe organophosphorous poisoning: experience of a north-west indian hospital. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, Deisenhofen, v. 33, n. 11, p. 628-630, Nov. 1995.

SZABO, A., OSTLUND, N. S. **Modern Quantum Chemistry**, Dover Publications, New York, 1989.

TANGOD, V. B. et al. Studies of the photophysics of highly fluorescent Red Mega 480 laser dye in solutions: steady state spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.l.], v. 148, p. 105-113, Sept. 2015.

TE VELDE, G. et al. Chemistry with ADF. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 22, n. 9, p. 931-967, July 2001.

THOMAS, L. H. Wave mechanical treatment of the fermi gas. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 23, p. 542-544, 1927.

VAN HOUTEN, K. A.; HEATH, D. C.; PILATO, R. S. Rapid luminescent detection of phosphate esters in solution and the gas phase using (dppe)Pt{S<sub>2</sub>C<sub>2</sub>(2-pyridyl)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)}. **Journal American Chemical Society**, Maryland, v. 120, p. 12359-12360, July 1998.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 655-660, ago. 2004.

WALTON, I. et al. A fluorescent dipyrinone oxime for the detection of pesticides and other organophosphates. **Organic Letters**, [S.l.], v. 14, n. 11, p. 2686-2689, Mar. 2012.

WOREK, F. et al. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, Limerick, v. 214, p. 182-189, July 2005.

ZHANG, H.-X. et al. A novel fluorescent epoxy resin for organophosphate pesticide detection. **Chinese Chemical Letters**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 39-42, Jan. 2015.

ZHANG, S. W.; SWAGER, T. M. Fluorescent detection of chemical warfare agents: Functional group specific ratiometric chemosensors. **Journal American Chemical Society**, Cambridge, v. 125, n. 12, p. 3420-3421, Apr. 2003.

ZHAO, J. et al. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 14, n. 25, p. 8803-8817, July 2012.



**SEGUNDA PARTE - ARTIGO****ARTIGO 1 - DETECTION OF CHEMICAL WEAPON AGENTS USING  
SPECTROSCOPIC PROBES: A COMPUTATIONAL STUDY****(VERSÃO PRELIMINAR)**

Artigo formatado de acordo com as normas do Journal of Theoretical  
and Computational Chemistry

Érika Ferreira Silva<sup>a</sup>, Eduardo Pereira da Rocha<sup>a,b</sup>,  
Elaine F. F. da Cunha<sup>a</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>a,c†</sup>

*<sup>a</sup>Department of Chemistry. Federal University of Lavras,  
University Campus, 37200-000, Lavras-MG, Brazil.*

*<sup>b</sup>Institute of Exact and Biological Sciences. Federal University of Ouro Preto  
University Campus, 35400000, Ouro Preto, Brazil*

*Center for Basic and Applied Research, Faculty of Informatics and Management,  
University of Hradec Kralove, Czech Republic.*

### **Abstract**

Organophosphorus compounds (OP) are organic compounds widely employed in agriculture as well as in chemical warfare. The use in agriculture is due to their insecticidal properties. However, in chemical warfare, the use of OP is associated to acetylcholinesterase inhibition, which promotes the cholinergic syndromes. In this line, the fast detection of this class of compounds is crucial for an efficient treatment. In this perspective, the dipyrinone oxime (compound *I*) was employed for detection of OPs, that are employed as nerve agents, such as Cyclosarin, Sarin, Soman, VG, VM, VX, DFP and DCP, through fluorescent emission. The thermodynamics and kinetic parameters as well as spectroscopic properties of the complexes formed for *I* and all OP's cited were investigated by means of theoretical calculations. From our findings, only DCP, GV and VG emitted fluorescence in the solvents hexane, toluene, chloroform, DCM, methanol, acetonitrile, water and DMSO. The thermodynamic parameters indicate negative  $\Delta G$  values for VX for the reaction with *I*, while Sarin and Cyclosarin revealed the lowest  $\Delta G^\ddagger$  values, being kinetically favorable



56

and

presenting

more

reactivity.

## **Introduction**

Organophosphorus compounds (OP) are organic compounds that have, at least, one carbon-phosphorus chemical bond. The first OP compounds were prepared in the middle ages, but in the XIX century their study became more intense by Michaelis.<sup>1-3</sup> In 1930, toxic and insecticidal properties of these compounds were reported.<sup>4</sup> Since then, there has been growing interest for the study of this class of compounds due to their possible application as agrochemicals and chemical weapons.<sup>5,6</sup> The high toxicity of the OP compounds is associated to high affinity for the acetylcholinesterase enzyme.<sup>7,8</sup> Actually, it is well-known that OP compounds can form a stable chemical bond with the serine residue present in the active site of the AChE.<sup>8,9</sup> Among the main nerve agents, it is possible to highlight the compounds Cyclosarin, Sarin, Soman, DCP, DFP, GV, VM, VX and VG (Fig. 1).

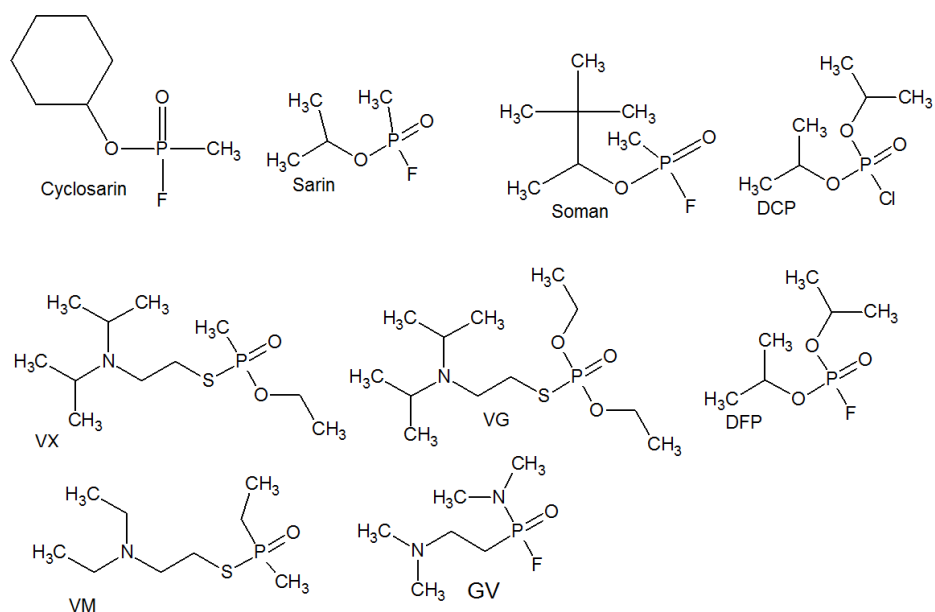
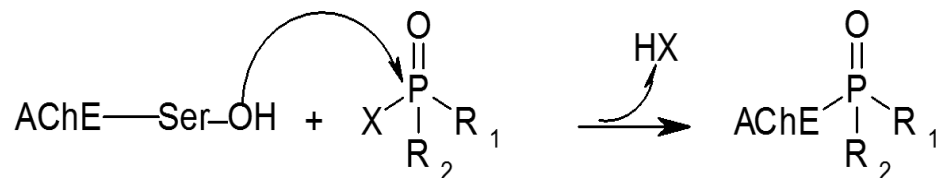


Fig 1. Chemical Structure of organophosphorates Cyclosarin, Sarin, Soman, DCP, DFP, GV, VM, VX and VG employed with fluorescent probes.

It should be kept in mind, however, that the reactivation reaction can occur by spontaneous hydrolysis, which is a very slow process, or by using oximes, which are considered AChE reactivators.<sup>10,11</sup>

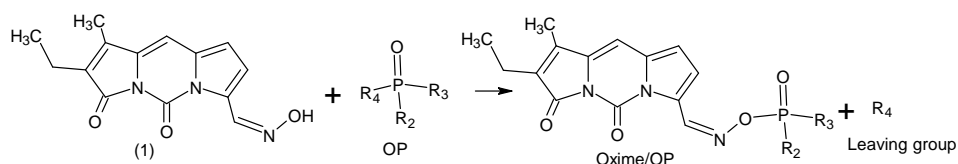
To date, the use of oximes is the most efficient approach aiming at AChE reactivation.<sup>12,13</sup> The AChE inhibition process can be illustrated in Scheme 1.<sup>14</sup>



Scheme 1. Inhibition scheme of AChE by OP, where  $R_1$  is the alkyl group, O-alkyl or amide;  $R_2$  the O-alkyl group or amide and X the leaving group.

Although the use of OP compounds as chemical weapons has called much attention and generated wide discussion in the international community,<sup>15,16</sup> it is important to keep in mind that the abusive use of OP compounds, as agrochemicals, is dangerous.<sup>16</sup> Currently, the use of OP compounds in agriculture is responsible for the majority of poisonings in Brazil.<sup>4,16</sup>

In view of this scenario, the detection and quantification of OP compounds in the environment is crucial.<sup>2</sup> In 2013, Walton et al. suggested the use of fluorescent techniques to detect OP compounds.<sup>17</sup> In fact, when OP compounds bind to a fluorescent probe, such as dipyrinone oxime (2-ethyl-7-[(Z)-(hydroxyimino)methyl]-1-methyl-3H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f]pyrimidine-3,5-dione), the color changes from red to yellow (Scheme 2).<sup>17</sup>



Scheme 2. Colorimetric reaction between dipyrinone oxime with organophosphates generating complex fluorescent oxime/organophosphates. Where R<sub>4</sub> is leaving group. R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> were other specific substituents in the compounds.

Despite several efforts to apply fluorescent probes for OP detection, there is still a dearth of systematic understanding of the thermodynamics of guest-responsive hybrid frameworks. In this perspective, the theoretical work could be an ally in the rationalization of thermodynamics and spectroscopic properties of these materials.<sup>18</sup> Furthermore, theoretical approaches provide an economically viable route for applications, as these methods can also open a new avenue to study the structural modifications, which could optimize the detection of OP compounds.<sup>19</sup>

Thus, aiming at combining efficiency and selectivity in the OP compound detection process, this paper is devoted to the theoretical study of spectroscopic properties of nerve agents with fluorescent probes.

## 2 Computational Methods

The ground and the twenty excited states were carried out at the DFT and TD-DFT levels,<sup>20,21</sup> respectively. The selection of the best functional for DFT and TD-DFT calculations was performed with five DFT functionals (CAM-B3LYP, B3PW91, MPW1PW91, PBEPBE,  $\omega$ B97XD)<sup>22,23</sup> and the wavelength calculation was evaluated for the oxime - organophosphorus complex. The error for the wavelength was calculated comparing with the experimental value and the DFT functional with the smallest error was chosen. For the optimization and finding the energy minimum Surface Response was employed.<sup>24</sup> The Surface Response was developed selecting two dihedral angles  $\alpha_1$  (C26, C28, C29, C31) and  $\alpha_2$  (C29, C31, C32, C33) according to Figure 2. The energy for the ground and excited state was calculated and a potential energy surface scan of dihedral angles  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  from -180 to 180° were performed, according to Table 1. The effect of the methanol solvent on the Surface Response was carried out employing IEFPCM<sup>25</sup> for each point of the Surface.

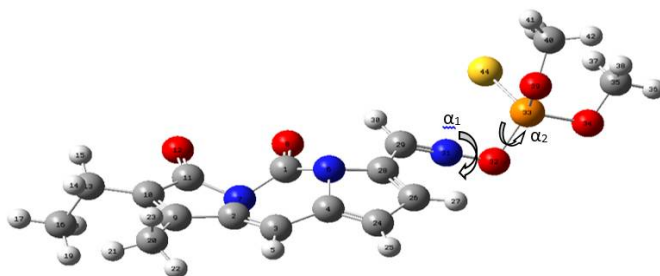


Fig. 2 – The dihedral angles  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  employed for building the Surface Response Model in the oxime-organophosphorus complex.

All compounds involved in the reaction described in Scheme 2 were optimized and the frequency calculated at the DFT/B3LYP/DGTZVP level. The transition state was evaluated using Spartan quantum software.<sup>26</sup> The imaginary frequency for all transition states was determined at the DFT/B3LYP/DGTZVP level.<sup>27,28</sup> The relaxation of the solvent was investigated using the Tamm-Dancoff Approximation (TDA)<sup>29-31</sup> by means of wavelength as well as energy calculations of eleven organophosphorus compounds used as chemical nerve agents (Cyclosarin, DFP, DCP, Sarin, Soman, VX, VM and VG) in complex with the dipyrnone oxime (*I*), taking into account the solvent effect from the solvents hexane, acetonitrile, methanol, toluene, chloroform, dichlorometane, dimethylsulphoxide and water. These

calculations were performed in conjugation with the TD-DFT method for the investigation of the of the solvents relaxation and spectroscopic properties calculation for each combination of oxime/organophosphorus compound. The all spectroscopic calculation were carried out in Orca Quantum Chemistry.<sup>32</sup>

### **3 Results and Discussion**

#### ***3.1 Selection of the DFT functional for spectroscopic calculations***

The spectroscopic properties of the complexes formed by Compound *I* and the organophosphorus compound (s) studied (Fig. 2) were evaluated by both DFT and TD-DFT methods. At the first moment, the selection of the best DFT functional was performed by error calculation in the absorption wavelength value for the Oxime(1)/DFP complex. This complex showed absorption wavelength at 400 nm. TD-DFT/DGTZVP was employed in conjugation with the DFT functional B3LYP, CAM-B3LYP, B3PW91, MPW1PW91, PBE and  $\omega$ -B97XD with the IEFPCM model for methanol, which was used in the experimental part. These functionals were tested for behold different families: meta-



GGA, hybrid functional and long-range hybrid functional. From our findings, the best functional for the investigated spectroscopic properties was the B3LYP hybrid functional. The error for the B3LYP functional was 7.1 nm, while for B3PW91 it was - 9.31 nm and for MPW1PW91 it was -13.22 nm. The three functionals belong to the same DFT family of hybrid functionals. The long-range hybrid functional, CAM-B3LYP and  $\omega$ -B97XD, showed higher error values, - 52.87 nm and - 54.75 nm, respectively. The PBE, which is a meta-GGA functional, showed an error value of 78.82 nm, the highest error for the spectroscopic properties. All error values and wavelengths for each DFT functional are shown in Table 1.

Table 1. Wavelength values for each DFT Functional and the respective error value.

<b>DFT Functional</b>	<b>Wavelength(nm)</b>	<b>Error (nm)</b>
<b>B3LYP</b>	407.1	7.1
<b>CAM-B3LYP</b>	347.13	-52.87
<b>B3PW91</b>	390.69	-9.31
<b>MPW1PW91</b>	386.78	-13.22
<b>PBEPBE</b>	478.82	78.82
<b>WB97XD</b>	345.25	-54.75
<i>Experimental</i>	<b>400*</b>	--

\*Experimental value according to WALTON et al., 2012<sup>17</sup>.

The B3LYP functional selected in the study was employed for the optimization in the ground state and the theoretical calculations of twenty excited-states for all compounds.

### **3.2 Response Surface Analysis**

It is well-known that spectroscopic properties are modulated by structural features.<sup>33-37</sup> Thus, to take into account the geometric effects on the nerve agents, we have used chemometric techniques, such as surface response methodology.<sup>38</sup>

The response surface (RS) is a design of experiment (DOE) methodology employed for optimization (in this case minimization) of response<sup>24,39</sup>. The RS is based on the factorial design with a central point and using the quadratic equation provides for minimum response with the least number of experiments (in this case theoretically calculated)<sup>40,41</sup>. The response surface was used to obtain the energy minimum in relation to the two dihedral angles  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  as in Fig 2. The dihedral angles were modified from -180 to 180° according to that described in Supplementary Information Table S1. The surface response in gas phase is presented in Fig 3. In gas phase, the energy minimum is associated to a dihedral angle  $\alpha_1$  of 25° and for the dihedral angle  $\alpha_2$  of 0°. In methanol solvent, Fig 3 shows the same angles for the compounds.

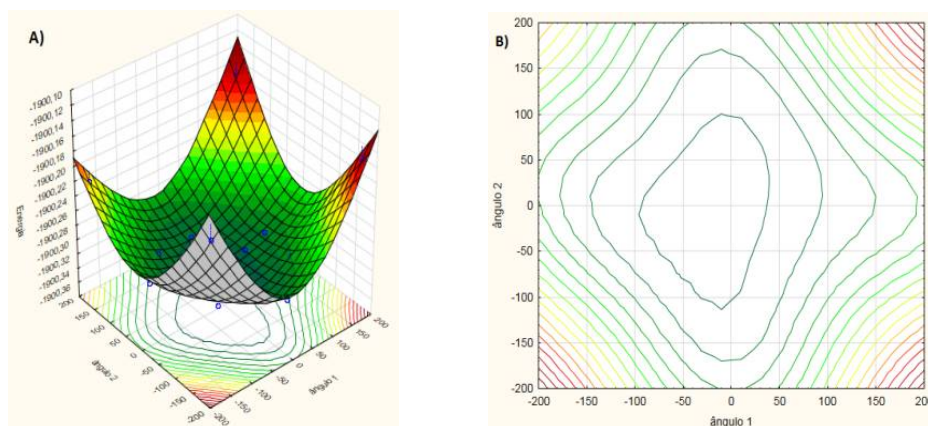


Fig. 3. Surface Response of the Oxime/OP complex showing the energy minimum for the dihedral angle  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  in gas phase. The Contour Graph of the Potential Surface of the Oxime/DFP complex showing the energy minimum for the dihedral angle  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  in gas phase.

From the dihedral angles, the spectroscopic properties were obtained for all analyzed compounds. The OPs analyzed were Sarin, Soman, DCP, DFP, Cyclosarin, GV, VX, VM and VG. Interestingly, all complexes formed between OP and the Spectroscopic probe **I** showed the same dihedral angles for the energy minimum. Thus, the dihedral angles were fixed for all compounds for the calculation of spectroscopic properties with TD-DFT/DGTZVP/B3LYP in gas phase as well as in the other eight solvents (hexane, chloroform, dichloromethane, toluene, methanol, acetonitrile, water and DMSO).

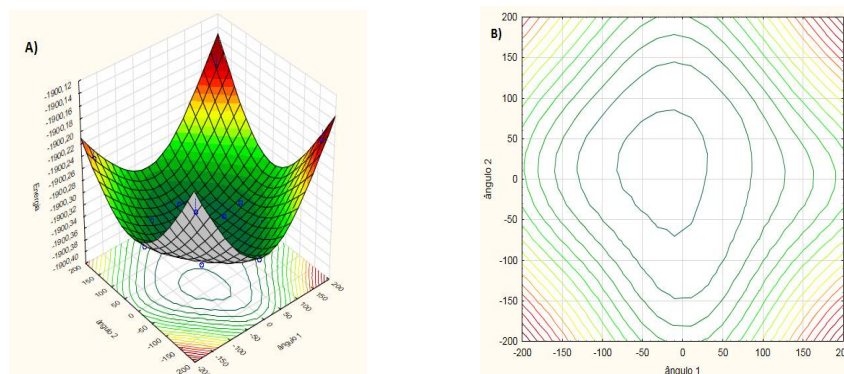


Fig. 4. Surface Response of the Oxime/DFP complex showing the energy minimum for the dihedral angle  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  in methanol. Contour Graph of the Potential Surface of the Oxime/OP complex showing the energy minimum for the dihedral angle  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  in methanol.

### 3.3 Thermodynamics and Kinetic parameters for the Reaction between oxime (**1**) and nerve agents

The thermodynamic and kinetic parameters for the colorimetric reaction described in Scheme 2 were calculated using the DFT methodology. Compound **1** reacted with each OP compound forming the oxime/OP complex, having the leaving group (R<sub>4</sub>) according to the OP employed. The S<sub>N</sub>2 reaction mechanism was employed for this reaction.<sup>1</sup> The  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta G^\ddagger$  values, as well as rate constants, were

calculated for analysis of the spontaneity of this reaction. The thermodynamic and kinetic parameters are shown in Table 2.

Table 2. Thermodynamic and kinetic parameters (kcal/mol) for colorimetric reaction between Oxime and Ops according to Figure 3.

Reaction	OP	Leaving Group	$\Delta H$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta G$	K
<b>I</b>	Cyclosarin	F	-2.49	15.68	3.49	6.17E+12
<b>II</b>	DCP	Cl	2.42	18.74	6.37	6.16E+12
<b>III</b>	DFP	F	1.80	16.82	6.49	6.17E+12
<b>IV</b>	GV	F	-0.51	18.01	6.44	6.16E+12
<b>V</b>	Sarin	F	-2.50	15.17	2.68	6.18E+12
<b>VI</b>	Soman	F	-2.53	18.50	3.08	6.16E+12
<b>VII</b>	VG	$S(CH_2)_2N(CH_2(CH_3)_2)_2$	0.37	25.09	0.69	6.15E+12
<b>VIII</b>	VM	$S(CH_2)_2N(CH_2(CH_3)_2)_2$	0.28	53.53	0.40	6.08E+12
<b>IX</b>	VX	$S(CH_2)_2N(CH_2CH_3)_2$	0.08	61.36	-0.23	6.06E+12

\* All energy values in kcal/mol; k was rate constant; AG was the leaving group.

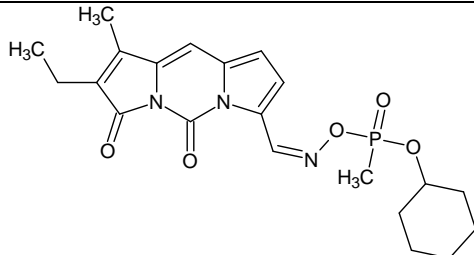
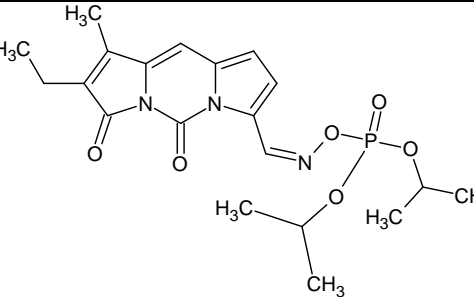
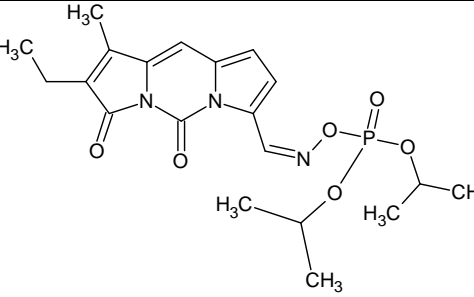
Reaction **I**, employing Cyclosarin as substrate and fluorine as a leaving group, generates a  $\Delta H$  value of -2.49 kcal/mol. This process was exothermic and the activation Gibbs free energy ( $\Delta G^\ddagger$ ) for reaching the transition state was 15.68 kcal/mol. Reaction **II** leads to  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta G^\ddagger$  values higher than **I**. Reaction **II** employed DCP with OP and chlorine as

a leaving group. The  $\Delta H$  for this reaction was the highest among the endothermic reactions.

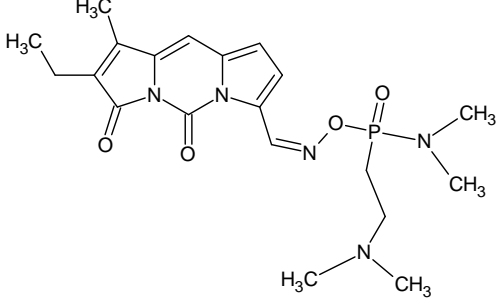
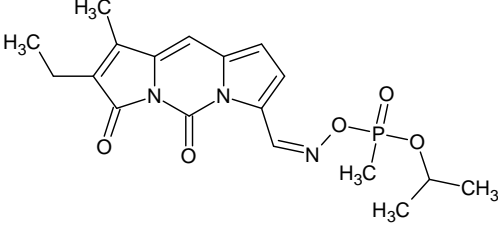
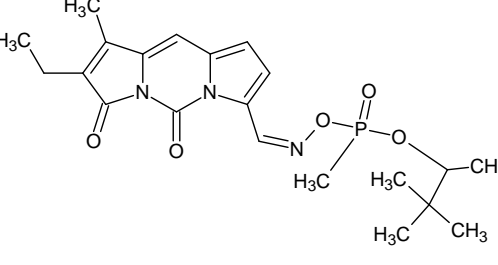
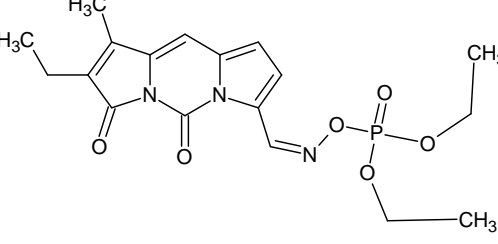
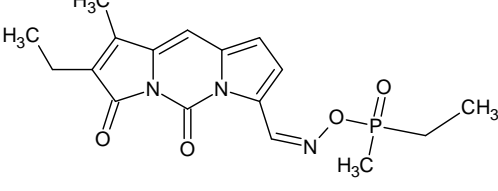
Now, by analyzing the other reactions having fluorine as a leaving group, it is possible to notice that Reaction **III**, employing DFP as OP, showed 1.80 and 6.49 kcal/mol for  $\Delta H$  and  $\Delta G$ , respectively. Thus, this reaction is endothermic and is not spontaneous. Reactions **IV**, **V** and **VI** were exothermic with  $\Delta H$  values of -0.51, -2.50 and -2.53 kcal/mol, respectively. Thus, having fluorine as the leaving group, only Reaction **III** was endothermic. The  $\Delta G$  values for the Reactions **IV**, **V** and **VI** were 6.44, 2.68 and 3.08 kcal/mol, respectively. Similarly, all reactions were not spontaneous. The other four reactions exhibit the sulfur group as the leaving group. Reactions **VII** and **VIII** showed the as 2-[di(propan-2-yl)amino]ethanethiolate a leaving group, while Reactions **IX** exhibit the 2-(diethylamino)ethanethiolate as a leaving group. The Reactions **VII** and **VIII** showed  $\Delta H$  values of 0.37 and 0.28 kcal/mol while the  $\Delta G$  values were 0.69 and 0.40 kcal/mol, respectively. Although the reaction showed positive  $\Delta H$  and  $\Delta G$  values, these systems were the most promising among the studied reactions without the sulfur group as a leaving group.

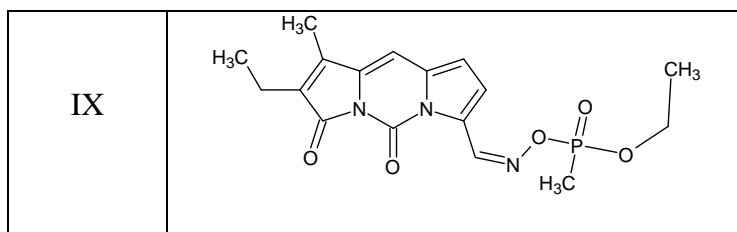
The Reactions **IX** showed  $\Delta H$  values 0.08 kcal/mol while the  $\Delta G$  values were -0.23 kcal/mol. The Reaction **IX** was endothermic and spontaneous.

Table 3 – Structure of reaction product between Dypirrinoneoxime and OP compounds according Scheme 2.

Reaction	Oxime/OP Complex
I	
II	
III	



IV	 <p>Chemical structure IV: A complex heterocyclic molecule featuring a methyl group and a methylmethyl group on a five-membered ring. The structure is linked via an imine group to a phosphorus atom, which is further substituted with a dimethylaminoethyl group.</p>
V	 <p>Chemical structure V: Similar to IV, but the phosphorus atom is substituted with a methyl group and a methylmethyl group.</p>
VI	 <p>Chemical structure VI: Similar to IV, but the phosphorus atom is substituted with a methyl group and a tert-butyl group.</p>
VII	 <p>Chemical structure VII: Similar to IV, but the phosphorus atom is substituted with two ethyl groups.</p>
VIII	 <p>Chemical structure VIII: Similar to IV, but the phosphorus atom is substituted with a methyl group and an ethyl group.</p>



Turning now to kinetic studies,  $\Delta G^\ddagger$  values (Figure 5) were positive for all studied reactions, which is according to transition state theory. Surprisingly, the halogen derivatives indicated the lowest  $\Delta G^\ddagger$  values, probably due to lower steric hindrance. This fact was observed in Reactions *VII*, *VIII* and *IX*, where there is the presence of more bulky substituents as leaving groups. In fact, it is well-known that steric factors are crucial for  $S_N2$  reactions.

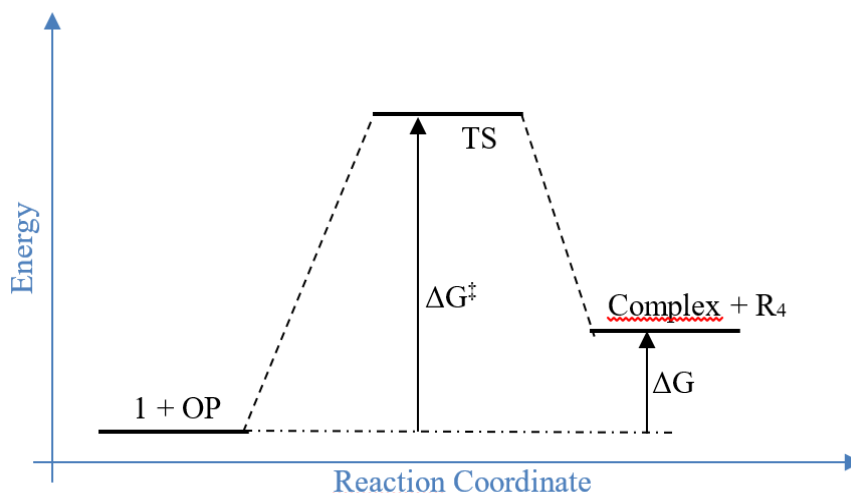


Fig 5. Diagram for reaction between Compound *I* and OP's like demonstrated in Figure 3. The  $\Delta G^\ddagger$  was the transition state Gibbs free energy and  $\Delta G$  was Gibbs free energy for reaction.

Furthermore the rate constant (k) was also calculated employing the Eyring equation<sup>42</sup> according to Equation 1. The rate constant demonstrates that Sarin is more reactive, while VM was the less reactive among the OPs. Therefore, the reactivity order was Sarin > Cyclosarin > DFP > DCP > GV > VG > VM > VX. The chemical reactions for VX were thermodynamically favorable, which can be characterized by negative  $\Delta G$  values. The reaction with Cyclosarin and Sarin was the most kinetically favorable among all, revealing the lowest  $\Delta G^\ddagger$  value. It should be kept in mind that all OP compounds were kinetically, but not thermodynamically favorable for the colorimetric detection reaction of nerve agents (Scheme 2).

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad \text{eq. 1}$$

### ***3.4 Spectroscopic properties of the Oxime/OP complex***

The complexes formed between the Oxime derivatives and OPs are displayed in Scheme 2. The compounds formed by the reaction of eleven OPs with the Oxime (Table 3) also have their spectroscopic properties calculated.

The absorption wavelengths of all complexes in eight solvents are reported in Table 4. The spectroscopic parameters were calculated by using the ORCA program at the TD-DFT/DGTZVP/B3LYP level, incorporating the Tamm-Dancoff approximation for evaluating the solvent relaxation as well as the absorption and emission energy for all compounds.

Table 4. Energy and absorption wavelength of Oxime/OP complexes for the eight studied solvents.

		Cyclosarin	DCP	DFP	GV	Sarin	Soman	VG	VM	VX
<b>Hexane</b>	E(e.v)	3.78	3.75	3.80	3.76	3.80	3.82	3.78	3.79	3.78
	$\lambda$ (nm)	328	330.8	325.9	329.4	326.2	324.5	327.7	326.4	327.9
<b>Toluene</b>	E(e.v)	3.77	3.74	3.79	3.76	3.79	3.81	3.78	3.78	3.78
	$\lambda$ (nm)	328.4	331.2	327.2	329.3	326.8	325.2	327.9	327.4	327.8
<b>Chloroform</b>	E(e.v)	3.78	3.76	3.79	3.80	3.78	3.80	3.77	3.79	3.79
	$\lambda$ (nm)	327.9	329.9	326.4	326.2	327.5	326.2	328.3	327	327.3
<b>DCM*</b>	E(e.v)	3.78	3.76	3.79	3.79	3.77	3.79	3.78	3.78	3.78
	$\lambda$ (nm)	328	329.6	326.4	326.5	328.2	327.1	328	328	327.8
<b>Methanol</b>	E(e.v)	3.78	3.76	3.79	3.80	3.77	3.78	3.78	3.77	3.78
	$\lambda$ (nm)	328	329.1	327.1	325.7	328.7	327.8	327.9	328.4	327.8
<b>Acetonitrile</b>	E(e.v)	3.78	3.76	3.79	3.80	3.77	3.78	3.78	3.77	3.78
	$\lambda$ (nm)	328.1	329.2	327.4	325.8	328.8	327.9	328	328.6	327.9
<b>Water</b>	E(e.v)	3.78	3.76	3.78	3.80	3.76	3.78	3.78	3.77	3.78
	$\lambda$ (nm)	328.2	329.2	328	325.7	329	328.1	328.1	328.7	328
<b>DMSO</b>	E(e.v)	3.76	3.76	3.79	3.79	3.76	3.77	3.60	3.76	3.80
	$\lambda$ (nm)	328.9	330.1	326.8	326.4	329.6	328.7	328.9	329.4	328.7

\*DCM is the dichloromethane solvent;

The study of the absorption wavelength with the most polar solvent showed higher values compared to apolar solvents. In the same solvent, for instance, Soman in hexane showed the lowest absorption wavelength value, 324.5 nm, followed by DFP (325.9 nm), Sarin (326.2 nm), VM (326.4 nm), VG (327.7 nm), VX (327.9 nm), Cyclosarin (328 nm), GV (329.4 nm) and DCP (330.8 nm). This behavior was observed in other tested solvents. For the same OPs, for example GV, the absorption wavelength was according to the following order: hexane (329.4 nm), toluene (329.3 nm), chloroform (326.2 nm), dichloromethane (326.5 nm), methanol (325.7 nm), acetonitrile (325.8 nm), water (325.7 nm) and DMSO (326.4 nm). All values for the other compounds were described in Table 2. In fact, the constant dielectric ( $\delta$ ) value of the studied solvents influences the absorption wavelength. The solvent hexane ( $\delta = 1.88$ ) showed always lower values compared to water ( $\delta = 80$ ), which shows the highest constant dielectric value in the studied series. Other solvent properties, such as the dipolar moment ( $\vec{\mu}$ ), can also be taken. From our findings, hexane ( $\vec{\mu} = 0$  D) showed lowest absorption wavelength value compared to DMSO ( $\vec{\mu} = 3.96$  D), according to Table 3. In this line, the dipolar moment can, in principle, rationalize the behavior observed in OP

compounds Cyclosarin, DCP, GV, Sarin, Soman, VG, VM and VX, which showed higher absorption wavelength values compared to water ( $\bar{\rho} = 1.85 \text{ D}$ ). It is important to notice that DFP was the only OP that showed an inversion of the behavior, in water solvent it showed the highest absorption wavelength values compared to DMSO.

Table 5 – Energy and Emission wavelengths of the Oxime/OP complex in eight solvents.

OPP		Hexane	Toluene	Chloform	DCM	methanol	Acetonitrile	water	DMSO
DCP	$\lambda(\text{nm})$	746.7	754	742.3	735.3	721.4	722.2	720.2	734.2
	E(e.V)	1.66	1.64	1.67	1.68	1.72	1.71	1.72	1.69
GV	$\lambda(\text{nm})$	423.6	434.5	426.5	422.4	411.6	413.2	411.5	426.2
	E(e.V)	2.92	2.85	2.91	2.93	3.01	3.00	3.01	2.91
VG	$\lambda(\text{nm})$	577.7	582.4	574.7	570.8	562.3	563.3	561.9	572
	E(e.V)	2.14	2.13	2.15	2.17	2.20	2.20	2.21	2.16

The emission wavelength value was observed in four OPs, DCP, GV and VG (Table 5). The other OP compounds dissipated the energy without fluorescence emission. The wavelength in the tested solvents was constant showing less variance. DCP emitted fluorescence at 734 nm, which corresponds to red color emission, GV emitted fluorescence at 420 nm, a violet color and VG emitted 570 nm, green.

The main transitions in the absorption process in apolar solvents (hexane, toluene and chloroform) were from Homo-1 to Lumo, Homo-1 to Lumo+1 and Homo to Lumo. On the other hand, in polar solvents (water and DMSO), only the transition Homo - Lumo was observed for the absorption process. This effect was observed for all OPs and the HOMO orbitals involved in the excitation were localized just in the *I* structure, while the LUMO orbitals are delocalized in *I* as well as in other organophosphorus compounds. The angles observed on the response surface can help in the delocalized orbitals between the organophosphorus and *I* as observed in Figure 5. This feature demonstrates that the conformational structure generated on the response surface was important for orbital delocalizations as well as for the emission process.

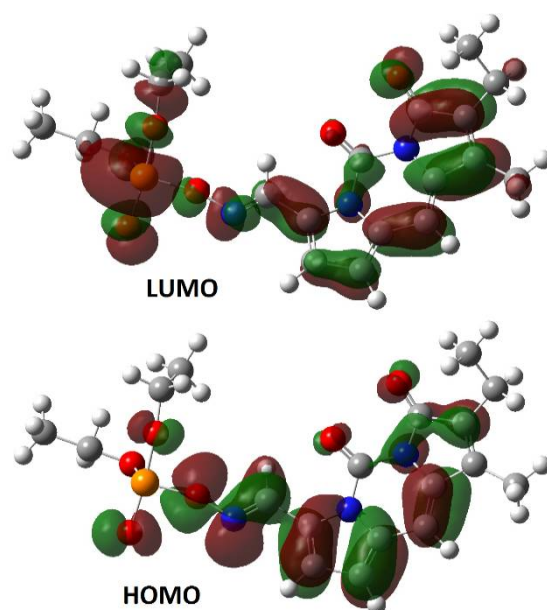


Fig. 5. Representation of HOMO-LUMO orbitals in the dipyrinone oxime/DCPcomplex.

#### 4. Conclusion

The DFT and TD-DFT were satisfactory for this study, and the hybrid functional family showed the lowest error when compared with other families. The B3LYP functional exhibited the error inside its family (7.1), being the functional selected for the optimization step as well as absorption and emission properties calculations. The Surface Response analysis showed the energy minimum when angle  $\alpha_1$  was  $25^\circ$  and  $\alpha_2$  was  $0^\circ$ . The solvent analysis showed less variation in the absorption values.



The dipolar moment and dielectric constant showed influence on the absorption properties. The reaction between Compound *I* and the OP compounds showed to be kinetically favorable for all compounds, Sarin and Cyclosarin being more reactive. The OPs with a sulfur leaving group demonstrated to be more thermodynamically favorable (VE, VX, VG and VM). The VE reaction showed -73 kcal/mol for  $\Delta G$  and -98 kcal/mol for  $\Delta H$ . The TDA was significant, because this methodology describes the solvent effects better.<sup>29-31</sup> Only four compounds showed emission values (DCP, VG, VE and GV). The emission was influenced by HOMO-1 – LUMO, HOMO-LUMO and HOMO-LUMO+1 transitions. The conformational structure generated on the response surface was important for orbitals delocalization between oxime and organophosphates. The understanding of the nature of the emission and the solvent influence was important for this study, because it allows proposing new ways for compound structural modifications in order to build more efficient fluorescent probes.

### **Acknowledgements**

Authors thank the Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES, and CNPq for the financial support of this research and UFLA for

infrastructure and encouragement in this work. This work was also supported by Excellence project FIM.

### Bibliography

1. E.A. de Lima, W., F. Pereira, A., A. de Castro, A., F.F. da Cunha, E. & C. Ramalho, T. Flexibility in the Molecular design of Acetylcholinesterase Reactivators: Probing Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Lett. Drug Des. Discov.***12**, 1–1 (2015).
2. Zhang, H., Hua, X., Tuo, X., Chen, C. & Wang, X. Polystyrene microsphere-based lanthanide luminescent chemosensor for detection of organophosphate pesticides. *J. Rare Earths***30**, 1203–1207 (2012).
3. Azab, H. A., Duerkop, A., Anwar, Z. M., Hussein, B. H. M. & Rizk, M. A. Analytica Chimica Acta Luminescence recognition of different organophosphorus pesticides by the luminescent Eu ( III )– pyridine-2 , 6-dicarboxylic acid probe. *Anal. Chim. Acta***759**, 81–91 (2013).
4. Santos, V. M. R. dos, Donnici, C. L., DaCosta, J. B. N. & Caixeiro, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova***30**, 159–170 (2007).
5. Yue, G. *et al.* Gold nanoparticles as sensors in the colorimetric and fluorescence detection of chemical warfare agents. *Coord. Chem. Rev.***311**, 75–84 (2016).
6. Singh, N., Karpichev, Y., Tiwari, A. K., Kuca, K. & Ghosh, K. K. Oxime functionality in surfactant self-assembly: An overview on combating toxicity of organophosphates. *J. Mol. Liq.***208**, 237–252 (2015).
7. Singh, M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.***70**, 165–188 (2013).
8. Scheffel, C., Thiermann, H. & Worek, F. Effect of reversible ligands on oxime-induced reactivation of sarin- and cyclosarin-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicol. Lett.***232**, 557–565 (2015).
9. Liu, Y., Yu, H., Zhao, L. & Zhang, H. Design and synthesis of new agents for neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChRs) imaging. *Nucl. Med. Biol.***40**, 126–134 (2012).
10. Winter, M. *et al.* Investigation of the reactivation kinetics of a large series of bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicol. Lett.***244**, 136–142 (2016).
11. Kulakova, A., Lushchekina, S., Grigorenko, B. & Nemukhin, A.

- Modeling reactivation of the phosphorylated human butyrylcholinesterase by QM(DFTB)/MM calculations. *J. Theor. Comput. Chem.***14**, 1550051 (2015).
12. Maxwell, D. M., Brecht, K. M. & Sweeney, R. E. A common mechanism for resistance to oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Chem. Biol. Interact.***203**, 72–76 (2013).
  13. Bajgar, J., Kuca, K., Jun, D., Bartosova, L. & Fusek, J. Cholinesterase Reactivators: The Fate and Effects in the Organism Poisoned with Organophosphates/Nerve Agents. *Curr. Drug Metab.***8**, 803–809 (2007).
  14. Radić, Z., Kalisiak, J., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. & Taylor, P. Interaction kinetics of oximes with native, phosphorylated and aged human acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.***187**, 163–166 (2010).
  15. Chadha, N., Bahia, M. S., Kaur, M. & Silakari, O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorg. Med. Chem.***23**, 2953–2974 (2015).
  16. Romero, A. M. Commercializing chemical warfare: citrus, cyanide, and an endless war. *Agric. Human Values***33**, 3–26 (2016).
  17. Walton, I. *et al.* A Fluorescent Dipyrinone Oxime for the Detection of Pesticides and Other Organophosphates. *Org. Lett.***14**, 2686–2689 (2012).
  18. Nash, K. L., Lavallette, C., Borkowski, M., Paine, R. T. & Gan, X. Features of the Thermodynamics of Two-Phase Distribution Reactions of Americium ( III ) and Europium ( III ) Nitrates into Solutions of 2 , 6-Bis [( bis ( 2-ethylhexyl ) phosphino ) methyl ] pyridine N , P , P ' -Trioxide. *Sci. Technol.***41**, 5849–5858 (2002).
  19. Wang, H., Zhou, G., Mao, C. & Chen, X. A fluorescent sensor bearing nitroolefin moiety for the detection of thiols and its biological imaging. *Dye. Pigment.***96**, 232–236 (2013).
  20. Casida, M. E. & Huix-Rotllant, M. Progress in Time-Dependent Density-Functional Theory. *Annu. Rev. Phys. Chem.***63**, 287–323 (2012).
  21. da Rocha, E. P., Castro, A. A., Ramalho, T. C. & da Cunha, E. F. F. Insights into the value of statistical models and relativistic effects for the investigation of halogenated derivatives of fluorescent probes. *Theor. Chem. Acc.***135**, 135 (2016).
  22. Jacquemin, D., Perpète, E. A., Scuseria, G. E., Ciofini, I. & Adamo, C. TD-DFT Performance for the Visible Absorption Spectra of Organic Dyes: Conventional versus Long-Range Hybrids. *J. Chem. Theory Comput.***4**, 123–135 (2008).
  23. Guzow, K., Milewska, M., Czaplewski, C. & Wiczak, W. A DFT/TD DFT study of the structure and spectroscopic properties of 5-methyl-2-(8-quinolinyl)benzoxazole and its complexes with Zn(II) ion. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.***75**, 773–781 (2010).

24. Ferreira, S. L. C. *et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A***1158**, 2–14 (2007).
25. Yang, D., Zhao, F., Zheng, R., Wang, Y. & Lv, J. A detailed theoretical investigation on the excited-state intramolecular proton-transfer mechanism of 3-BTHPB chemosensor. *Theor. Chem. Acc.***134**, 62 (2015).
26. Shao, Y. *et al.* Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package. *Phys. Chem. Chem. Phys.***8**, 3172–3191 (2006).
27. Roohi, H., Hejazi, F., Mohtamedifar, N. & Jahantab, M. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole and its naphthalene-fused analogs: A TD-DFT quantum chemical study. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.***118**, 228–238 (2014).
28. Sun, Q. *et al.* On the role of ligand-field states for the photophysical properties of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Coord. Chem. Rev.***282-283**, 87–99 (2015).
29. Chantzis, A., Laurent, A. D., Adamo, C. & Jacquemin, D. Is the Tamm-Dancoff Approximation Reliable for the Calculation of Absorption and Fluorescence Band Shapes? *J. Chem. Theory Comput.***9**, 4517–4525 (2013).
30. Casida, M. E. *et al.* Charge-transfer correction for improved time-dependent local density approximation excited-state potential energy curves: Analysis within the two-level model with illustration for H<sub>2</sub> and LiH. *J. Chem. Phys.***113**, 7062–7071 (2000).
31. Grimme, S. & Neese, F. Double-hybrid density functional theory for excited electronic states of molecules. *J. Chem. Phys.***127**, 154116 (2007).
32. Neese, F. The ORCA program system. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.***2**, 73–78 (2012).
33. de Assis, T. M. *et al.* QSAR Models Guided by Molecular Dynamics Applied to Human Glucokinase Activators. *Chem. Biol. Drug Des.***87**, 455–466 (2016).
34. Gonçalves, M. a., Peixoto, F. C., da Cunha, E. F. F. & Ramalho, T. C. Dynamics, NMR parameters and hyperfine coupling constants of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(100)–water interface: Implications for MRI probes. *Chem. Phys. Lett.***609**, 88–92 (2014).
35. Gonçalves, M. A., da Cunha, E. F. F., Peixoto, F. C. & Ramalho, T. C. Probing thermal and solvent effects on hyperfine interactions and spin relaxation rate of  $\delta$ -FeOOH(100) and [MnH<sub>3</sub>buea(OH)]<sup>2-</sup>: Toward new MRI probes. *Comput. Theor. Chem.***1069**, 96–104 (2015).

36. Mancini, D. T., Sen, K., Barbatti, M., Thiel, W. & Ramalho, T. C. Excited-State Proton Transfer Can Tune the Color of Protein Fluorescent Markers. *ChemPhysChem***16**, 3444–3449 (2015).
37. Mancini, D. T., Souza, E. F., Caetano, M. S. & Ramalho, T. C. <sup>99</sup>Tc NMR as a promising technique for structural investigation of biomolecules: theoretical studies on the solvent and thermal effects of phenylbenzothiazole complex. *Magn. Reson. Chem.***52**, 129–137 (2014).
38. Rocha, E. P. & Ramalho, T. C. Probing the ESIPT process in 2-amino-1,4-naphthoquinone: thermodynamics properties, solvent effect and chemometric analysis. *Theor. Chem. Acc.***135**, 39 (2016).
39. Lundstedt, T. *et al.* Experimental design and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.***42**, 3–40 (1998).
40. Chen, K. *et al.* Optimization of Process Variables in the Synthesis of Isoamyl Isovalerate Using Sulfonated Organic Heteropolyacid Salts as Catalysts. *J. Braz. Chem. Soc.***26**, 600–608 (2015).
41. Aslan, N. & Cebeci, Y. Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel***86**, 90–97 (2007).
42. Papo, T. R. & Jaganyi, D. Kinetic and mechanistic investigation into the influence of substituents on the substitution reactions of Pt(II) NCN-donor complexes. *Transit. Met. Chem.***40**, 53–60 (2015).