



## **BIOSENSORES PARA INVESTIGAÇÃO: ESTUDO E CONSTRUÇÃO DE NOVOS DISPOSITIVOS PARA RECONHECIMENTO DE AGENTES QUÍMICOS DE GUERRA E RADIAÇÕES IONIZANTES**

**João N. C. Bandeira<sup>1</sup>, Fabiane M. Garbim<sup>1</sup>, Joyce S. F. Diz<sup>1</sup>, Álvaro J. Boareto-Mendes<sup>1</sup> e Fernando M. Araújo-Moreira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Militar de Engenharia (IME) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear (PPGEN), Praça General Tibúrcio, 80 – Urca, Rio de Janeiro-RJ 22290-270, Brasil.  
e-mail: joao.nilton@ime.eb.br

**Palavras-Chave:** Biotecnologia, Biossensores, Radiações-Ionizantes, Detecção, Dispositivos.

### **RESUMO**

A indústria e o setor químico-nuclear sempre dependeram de ferramentas e dispositivos capazes de executar leituras e medidas apropriadas que acompanhem seus respectivos processos. Essa dependência está diretamente relacionada com a necessidade de aplicação direta na qualidade e na segurança do processo ou produto, correlacionado com a produção de energia, radiofármacos, diagnósticos, aplicações em segurança, em Defesa, dentre outras. O desenvolvimento de novas ferramentas para o sensoriamento eficiente remete a grandes possibilidades devido às inúmeras capacidades de adequação quando combinadas ciências de várias naturezas, como química nuclear, física nuclear, eletrônica, bioquímica, biotecnologia, bioprocessos e outros, apresentando uma abordagem multi e interdisciplinar. A utilização da biotecnologia nos remete a essas possibilidades devido à capacidade de interação entre sistemas não-biológicos com sistemas biológicos. Tendo essa capacidade em vista, torna-se necessário um olhar especial para as questões de instrumentação e medidas para os setores químico e nuclear (militar e civil). Neste contexto, a ideia do desenvolvimento de pesquisas com potencial de produzir novos biossensores com capacidade de detecção de agentes de guerra química (AGQ) e gerar sinais elétricos proporcionais e de radiação por efeitos radiológicos e nucleares (ERN), demonstram a importância deste trabalho. Neste desdobramento, foram realizados estudos *in silico* para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos, que posteriormente serão construídos e testados *in vitro* e *in loco* em amostras ambientais. Os conceitos para o desenvolvimento do biossensor baseiam-se em estudos teóricos de sistemas bioquímicos voltados para essa aplicação, paralelamente com modelagens moleculares (dockings), com cálculos quânticos e com simulações computacionais para identificação das fronteiras dos sistemas envolvidos, resultando na ação prática da criação da ferramenta/dispositivo. O presente trabalho se divide em três etapas: - a primeira etapa, já em andamento, consiste em estudos de ancoramento molecular entre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase e os principais agentes de guerra química, que são compostos organofosforados, capazes de inibir os alvos moleculares e causar síndrome conlinérgica em seres humanos e animais. Para tal, dois modelos de receptores foram construídos e validados, a partir de estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados *Protein Data Bank*. As estruturas tridimensionais foram construídas utilizando-se o programa *Spartan'08*. Em seguida, estudos de docking foram realizados utilizando o programa Molegro Virtual Docker (MVD)<sup>®</sup> e os resultados foram avaliados de acordo com a energia de interação e resíduos de interação com as duas; nas duas etapas seguintes foca-se no estudo das interações das radiações ionizantes com o meio simulado e criações.



## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da pesquisa contemplando biossensores nacionais pode contribuir para aumentar a independência do país em termos de importação de tecnologia e de produtos de defesa, quando voltados para à área de instrumentação químico-nuclear, a detecção de agentes de guerra química (AGQ) e radiações ionizantes (ERN) é uma área de pesquisa que vem ganhando forte destaque e relevância, dada à necessidade de monitoramento ambiental, segurança nacional e outras características de âmbito civil e militar. Esses dispositivos têm o potencial de oferecer respostas rápidas e precisas em situações de emergência, como acidentes/ataques químicos ou acidentes radiológicos. A escolha do elemento biológico ativo é crucial para a eficácia do biossensor, e a acetilcolinesterase (AChE) possui características bioquímicas que permitem e corroboram para uma abordagem diferenciada devido à sua sensibilidade e especificidade.

Nessa nova condição tecnológica, em um cenário real de ataques ou incidentes, pode-se realizar a detecção eficiente em tempo oportuno, garantindo a soberania nacional diante da questão abordada. Neste trabalho, técnicas de modelagem molecular em sistemas biológicos foram aplicadas para verificar as interações entre agentes de guerra química (AGQ) e radiação ionizante (ERN) com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Essas enzimas são os principais alvos destes agentes no organismo humano e de animais. Estas interações bioquímicas serão transduzidas em sinais ou informações elétrica, de forma a promover a detecção destes compostos de forma tempestiva e auxiliar as equipes de pronta resposta e as equipes de saúde na contenção de eventuais danos a pessoas, animais, materiais e ao meio-ambiente.

A acetilcolinesterase é uma enzima envolvida na degradação do neurotransmissor acetilcolina, sendo amplamente distribuída em organismos vivos [01]. Sua capacidade de interagir com inibidores, como os agentes químicos de guerra, torna-a um alvo ideal para biossensores. Estudos demonstraram que a AChE e a BChE podem ser utilizadas nas construções de biossensores, proporcionando detecções e comparações que variam em um curto espaço de tempo retornando informações e permitindo inferências que ajudem nas tomadas de decisões.

Os biossensores têm ganhado destaque na área da análise química e ambiental, especialmente pela sua capacidade de oferecer soluções rápidas e sensíveis para a detecção de uma ampla gama de compostos. Entre os diversos elementos bioativos utilizados, a acetilcolinesterase (AChE) se destaca por sua função crucial na sinalização neurológica e por sua vulnerabilidade à inibição por agentes neurotóxicos.

O desenvolvimento desses biossensores requerem uma abordagem inter e multidisciplinar que envolve química nuclear, biologia, física nuclear, bioprocessos, eletrônica, engenharia e outros. Técnicas de nanotecnologia têm sido empregadas para melhorar a sensibilidade e a estabilidade dos biossensores, permitindo a criação de dispositivos mais robustos, eficientes, de baixo custo, de fácil manuseio e outros. Estudos exploram o uso de nanomateriais como suportes para a AChE e BChE, potencializando suas propriedades e aumentando a área de superfície disponível para interações com os analitos [02, 03].

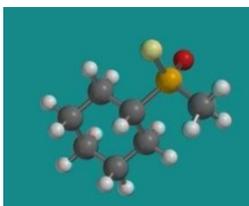
Ao estudar os efeitos biológicos das radiações tem-se observado novas possibilidades. Sistemas químico-biológicos expostos às radiações ionizantes respondem de maneiras que possibilitam ser mensurados, sejam qualitativamente ou quantitativamente, devido a quantização da energia dos sistemas envolvidos, seja pela percepção da alteração de cargas ou formação de íons no sistema. Explorando essa relação, é possível desenvolver sistemas/dispositivos não apenas capazes de identificar agentes químicos (neurotóxicos ou até mesmo aflatoxinas), mas também, radiações ionizantes, sejam para monitoramento ou identificação de acidentes/incidentes ampliando a funcionalidade dos biossensores.



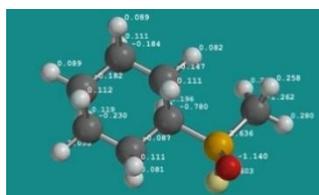
Este estudo tem como objetivo abordar o que tem sido desenvolvido de maneira computacional, dando base para prototipação de um dispositivo com tais características. Sendo possível a criação de biossensores utilizando a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase como elementos enzimáticos (zona de reconhecimento biológico do biossensor), focando em sua capacidade de detectar agentes químicos de guerra e radiações ionizantes.

## 2. METODOLOGIA

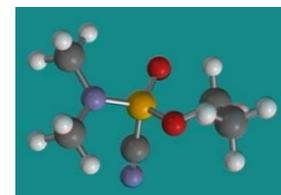
O trabalho se divide em três etapas: (a) a primeira etapa, consiste em estudos de ancoramento (*docking*) molecular entre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase com os principais AGQ e duas Aflatoxinas (B1 e M1). Esses agentes são compostos organofosforados e aflatoxinas sendo capazes de inibir os alvos moleculares em questão e causar síndrome conlinérgica em seres humanos e animais. Para tal, dois modelos de receptores foram construídos e validados a partir de estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (Modelos de Estruturas Computacionais (CSM))[04]. A estrutura tridimensional dos organofosforados e toxinas foram construídas e as cargas atômicas parciais foram calculadas utilizando-se o programa *Spartan'08* (Version 08<sup>®</sup>, Wavefunction, Irvine, CA, EUA, collaboration with Q-Chem, 2009)[05]. As figuras 01, 02 e 03 representam as fórmulas estruturais tridimensionais dos organofosforados Ciclosarin e Tabun construídas no *Spartan'08*. Em seguida, estudos de docking foram realizados utilizando-se o programa Molegro Virtual Docker (MVD)<sup>®</sup> (versão 6.0, CLC bio, Aarhus, Dinamarca, 2013)[06], sendo os resultados avaliados de acordo com a energia de interação e resíduos de interação com as duas enzimas. Essa etapa de modelagem foi realizada no Laboratório de Modelagem Molecular aplicado à Defesa Química e Biológica (LMDQB) da Seção de Engenharia Química do IME; - (b) segunda etapa, foi realizada para fins de detecção da radiação ionizante. Foram realizadas simulações computacionais com o código MCNPX (código de transporte de radiação Monte Carlo de uso geral, energia contínua, geometria generalizada, dependente do tempo) (*MCNPX EXTENSIONS VERSION 2.6.0*, Los Alamos National Laboratory, 2008)[07]. O código gerado no MCNPX teve a geometria avaliada no software Vised (que é uma extensão do código MCNPX). Essa etapa de simulação foi realizada no Laboratório de Simulação Nuclear (LSN) da Seção de Engenharia Nuclear do IME; (c) a terceira etapa será a construção do biossensor, utilizando como ponto de partida os resultados anteriores.



**Fig. 01:** Ciclosarin



**Fig. 02:** Ciclosarin com cargas



**Fig. 03:** Tabun

## 3. RESULTADOS

Depois de realizados mais de 9000 iterações de 11 organofosforados e 02 aflatoxinas com a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Os melhores resultados de dockings com interações entre ligantes e a AChE foram para os organofosforados VR e Novichok-A232 e para a toxina Aflatoxina M1. Esses resultados são apresentados nas figuras 04, 05 e 06.



Fig. 04: VR



Fig. 05: Novichok-A232

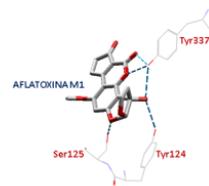


Fig. 06: Aflatoxina M1

A tabela 01 a seguir apresenta os resultados de energia de interação entre os compostos estudados com a enzima acetilcolinesterase (AChE) e com os principais resíduos de ligação de hidrogênio. A distância entre o fósforo (P<sub>i</sub>) e a serina-203 (Ser-203).

Tabela 01. Melhores Resultados de Interações entre Ligantes e AChE

Ligante	Score [kCal/mol]	Distância [Å]	Resíduo
Ciclosarin	-64,23	3,24	Ser - 203 / Gly - 122
Sarin	-57,82	3,55	Ser - 203 / Gly - 122
Soman	-61,03	3,31	Ser - 203 / Gly - 122
Tabun	-58,84	3,97	Ser - 203 / Gly - 122 / Ser - 125 / Tyr - 124
VR	-100,21	3,10	Ser - 203 / Gly - 122
VX	-94,73	3,41	Ser - 203 / Gly - 122
Novichok - A230	-81,18	3,15	Ser - 203 / Gly - 122
Novichok - A232	-78,44	3,12	Ser - 203 / Gly - 122
Novichok - A234	-85,50	3,31	Gly - 122
Novichok - A242	-99,24	3,28	Tyr - 124 / Gly - 122
Novichok - A262	-109,24	3,22	Ser - 203 / Gly - 122
Aflatoxina B1	-138,79	XX	Tyr - 124 / Tyr - 337
Aflatoxina M1	-139,06	XX	Tyr - 124 / Ser - 125 / Tyr - 337

É possível verificar pela tabela 01 que os resultados sugerem uma forte inibição da enzima AChE devido a proximidade dos organofosforados e aflatoxinas no sítio ativo da mesma, uma vez que a flutuação em energia apresentada em Kcal/mol é extremamente relevante, causando a inativação da enzima. Ao selecionar os resultados mais promissores (organofosforados VR e Novichok-A232 e toxina Aflatoxina M1) podemos inferir que quando se tem um grupo fosfato na composição do ligante, o resíduo de interação se torna o alvo molecular o qual é responsável pela hidrólise da acetilcolina, sofrendo um rearranjo e impedindo que esse processo de quebra aconteça, acarretando num aumento de acetilcolina no sistema, prejudicando a propagação dos impulsos nervosos.

Já num segundo momento apenas de maneira a construir um comparativo entre sistemas de estudos, foi feito o mesmo processo de simulação molecular (docking) para a enzima BChE, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica, também responsável



pela hidrólise em menores proporções da acetilcolina. Para tanto a tabela 02 apresenta os melhores resultados dessas interações.

Tabela 02. Melhores Resultados de Interações entre Ligantes e BChE

Ligante	Score [kCal/mol]	Distância [Å]	Resíduo
Ciclosarin	-50,44	2,30	Ala -199 / Gly - 117
Sarin	-46,61	2,80	Gly - 117 / Ala - 199
Soman	-44,32	2,35	Ala -199 / Gly - 117
Tabun	-47,05	2,94	Ser 198 / Ala 199 / Gly 117
VR	-69,73	2,53	Ser - 198 / Gly - 116
VX	-73,54	2,19	Ala - 199 / Gly - 117
Novichok - A230	-59,94	2,29	Ala - 199 / Gly - 117
Novichok - A232	-62,46	2,65	Ser - 198 / Gly - 117 / Ala - 199 / H2O
Novichok - A234	-65,64	1,92	Ser - 198 / Gly - 116 / Gly - 117 / Ala - 199
Novichok - A242	-65,20	3,46	Ser 198 / Gly 116 / 2.H2O
Novichok - A262	-77,87	3,26	Ser 198 / Gly 117 / H2O
Aflatoxina B1	-108,06	XX	Gly - 283 / Asn - 289 / 3.H2O
Aflatoxina M1	-114,48	XX	Ser - 198 / Gly - 116 / Gly - 117 / 9.H2O

Para BChE os melhores resultados são os organofosforados VX, Novichok A-234 e a toxina Aflatoxina M1. As mesmas observações são pertinentes, agora com a alteração da enzima, o alvo molecular está deslocado, pois a tríade catalítica desse novo sistema é outro (apenas em posições diferentes), mas as interações acontecem de maneiras análogas e com mesmas propriedades.

Para uma melhor aproximação com um sistema de leitura padronizado, é apresentado no Gráfico 01 e 02 relação entre as interações dos ligantes com a AChE e BChE respectivamente.

Gráfico 01. Resultados de Interações entre Ligantes e AChE

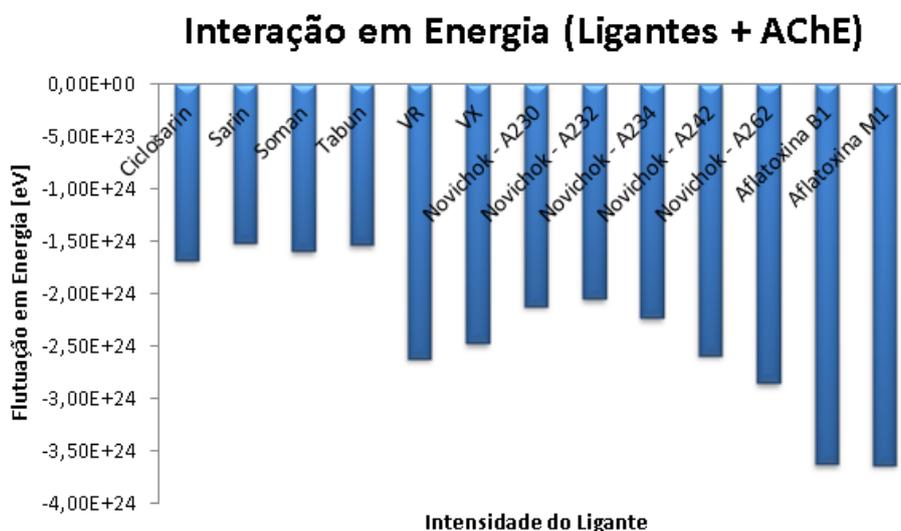
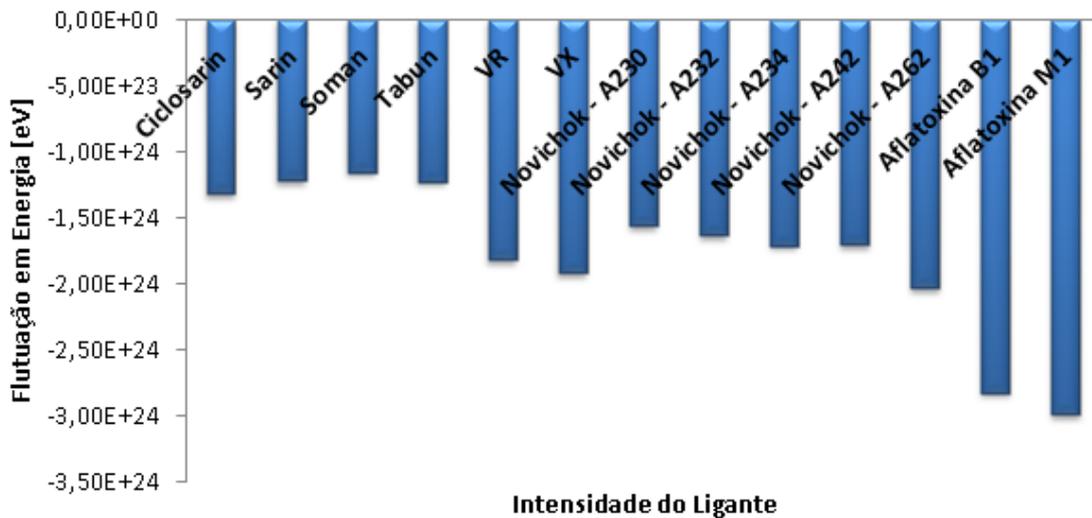




Gráfico 02. Resultados de Interações entre Ligantes e BChE

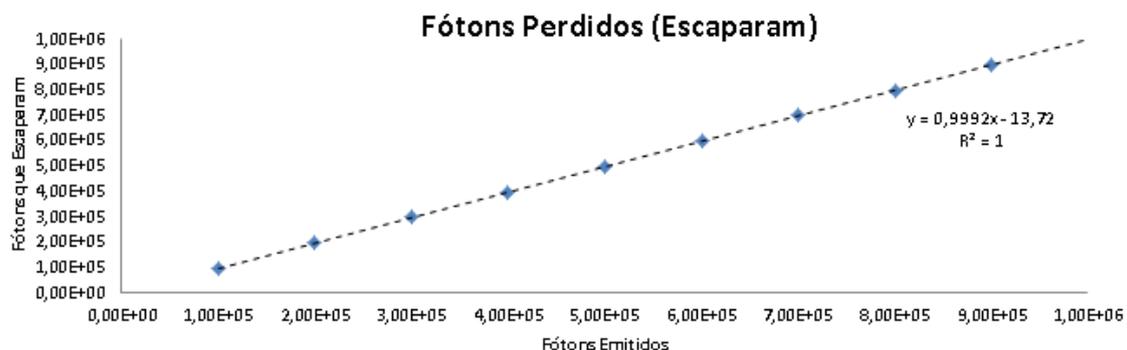
## Interação em Energia (Ligantes + BChE)



Através de uma correlação direta da transformação em [Kcal] em [eV] da ordem de  $1 [Kcal] \sim 2,611 \times 10^{22} [eV]$  é possível obter os gráficos 01 e 02 como resultados parciais para essas investigações, no entanto, os principais critérios para esse estudo são as interações e as possibilidades de usar simulações para construções práticas com moléculas análogas para efetivação deste estudo.

Para avaliação ERN, o Gráfico 03 expõe informações de quantidades de partículas (gama) geradas a partir de uma fonte de Césio-137 (Cs-137) e a quantidade de partículas que escapam (que não colidem com o alvo) criado com o código MCNPX para estudo simulado também.

Gráfico 03. Gráfico de acompanhamento de Fótons.



O Gráfico 03 apresenta os resultados obtidos nas simulações com o código MCNPX, tornando evidente uma distribuição linear dos dados das simulações, evidenciando a baixa probabilidade de interação entre os fótons e o biossensor em desenvolvimento. Essa linearidade sugere que a taxa de fótons detectados pelo biossensor é proporcional à intensidade da radiação incidente, e a baixa probabilidade de interação indica que a maioria dos fótons gerados não são absorvidos pelo volume de controle. Considerando que os fótons que não interagem com o



biossensor não são absorvidos, é plausível inferir que estes permanecem no ambiente e podem estar sujeitos a outros efeitos da radiação ionizante. Essa constatação levanta questões sobre a sensibilidade e especificidade do biossensor, além das implicações da presença de fótons não detectados. A compreensão desses mecanismos de interação e a influência de outros fatores, como a geometria do biossensor e a composição dos materiais, são cruciais para aprimorar o desempenho do dispositivo.

#### 4. CONCLUSÃO

Os dados coletados e as inferências possíveis apresentadas direcionam para formalização e materialização da construção de biossensores. Uma vez que a variação sutil do potencial elétrico pode ser mensurada através da correlação entre [Cal] e [eV]. Deste modo, conclusões podem ser delineadas gerando impactos relevantes, tanto pelo potencial inovador como recurso a ser empregado em campo frente a sistemas que utilizam radionuclídeos para outros estudos. Os resultados parciais indicam que o equipamento proposto apresente potencial de realizar a detecção de forma rápida, precisa e com menor custo devido à alta sensibilidade, contribuindo para o desenvolvimento de tecnologia nacional.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro da Finep ao projeto "Desenvolvimento e Inovação de Sensores, Biossensores, Detectores Nacionais e Produtos Estratégicos Relacionados a Agentes QBRN de Uso Dual (PDI-QBRN)" conduzido no Instituto Militar de Engenharia (IME).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [01] Câmara, S. A. V, et al. Exposição a agrotóxicos: determinação dos valores de referência para colinesterase plasmática e eritrocitária. *Brasília Med*;v.49 (3), 2012, p. 163–169
- [02] Ferreira HS, Rangel M do C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Quím Nova* [Internet]. 2009; 32(7):1860–70. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>
- [03] Toma, H. E.; *O Mundo Nanométrico: a dimensão do novo século*, Ed. Oficina de Textos: São Paulo, 2004.
- [04] RCSB PROTEIN DATA BANK (RCSB - PDB). Computed Structure Models (CSM). *ELETROPHORUS ELETTRICUS ACETYLCHOLINESTERASE*. Link for access: < <https://www.rcsb.org/>>. Accessed on 20, Nov, 2023.
- [05] PC *Spartan'08* for windows, macintosh and linux. Molecular modeling for desktop. Wavefunction, Inc., Japan Branch Office. Spartan'08 is a collaboration with Q-Chem, Inc. 2006 - 2009.
- [06] Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3315–3321.
- [07] John S. Hendricks et. al., *MCNPX EXTENSIONS VERSION 2.6.0*, Los Alamos National Laboratory, LA-UR-08-2216 (2008).