

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Instituto de Ciências Exatas – ICEX

Departamento de Química

Marcelo Andrade Chagas

*Dinâmica e Mecanismo de Ação de Metaloenzimas Envolvidas na
Hidrólise de Compostos Organofosforados*

Belo Horizonte

2018

UFMG/ICEx/DQ.1279^a
T.578^a

Marcelo Andrade Chagas

***Dinâmica e Mecanismo de Ação de Metaloenzimas Envolvidas na
Hidrólise de Compostos Organofosforados***

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2018

Ficha Catalográfica

C426d Chagas, Marcelo Andrade
2018 Dinâmica e mecanismo de ação de metaloenzimas
T envolvidas na hidrólise de compostos organofosforados
[manuscrito] / Marcelo Andrade Chagas. 2018.
[xvii], 225 f. : il.

Orientador: Willian Ricardo Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Físico-química - Teses 2. Compostos
organofosforados - Teses 3. Hidrólise - Teses 4.
Metaloenzimas - Teses 5. Mecanismo de ação
(Bioquímica) - Teses 6. Dinâmica molecular - Teses I.
Rocha, Willian Ricardo, Orientador II. Título.

CDU 043

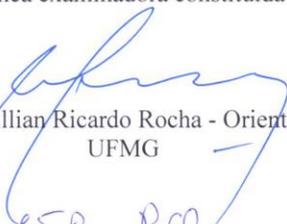
Elaborada pela Biblioteca do Departamento de Química - UFMG



"Dinâmica e Mecanismo de Ação de Metaloenzimas Envolvidas na Hidrólise de Compostos Organofosforados"

Marcelo Andrade Chagas

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Willian Ricardo Rocha - Orientador
UFMG


Prof. João Bosco Paraíso da Silva
UFPE


Prof. Josefredo Rodriguez Pliego Junior
UFSJ


Prof. Heitor Avelino de Abreu
UFMG


Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG

Belo Horizonte, 05 de junho de 2018.

Para as pessoas com quem pude conviver nessa vida, em especial, à minha família, bem maior, e refugio certo para tudo...!!!

Agradecimentos

- ✓ A Deus, Ser Supremo e meu guia;
- ✓ Aos meus familiares: Silvio, Aparecida e Lucilda, muito obrigado. Por vocês, e também para constituir minha família, busco crescer e termos uma vida melhor;
- ✓ Aos meus colegas e amigos da UFMG pelas discussões prazerosas e perspectivas futuras em comum;
- ✓ Aos meus colegas do LQCMM, que me auxiliaram em momentos importantes, em especial: Leonardo e Eufrásia, com os quais tive a honra de conviver durante a realização de meu trabalho;
- ✓ Ao Prof. Willian R. Rocha, orientador desta tese, pela oportunidade, confiança, paciência e amizade durante meus trabalhos, desde a iniciação científica até obtenção do título de Doutor atuando no LQCMM;
- ✓ Ao Prof. Helio F. dos Santos e ao seu aluno de doutorado Willian Novato pelas contribuições e disponibilidade de ajuda em minha visita técnica à UFJF;
- ✓ Ao Prof. Alex G. Taranto, da UFSJ, pela ajuda e disponibilidade iniciada durante a SBQT de 2015 em relação a estudos envolvendo Docking Molecular;
- ✓ Ao Prof. Gustavo Seabra pela disponibilidade de auxílio durante minha visita técnica à UFPE. Agradeço sua participação e direcionamento em relação a questões de parametrização, necessárias para a realização deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Júlio C. D. Silva, da UFAL, obrigado pela solicitude, ajuda e companheirismo na realização desta tese de doutorado;
- ✓ Aos professores da UFMG, que direta e indiretamente contribuíram para minha formação;
- ✓ A minha querida companheira, Daniele Soares Gomes, pelos momentos inesquecíveis ao longo desta jornada e pelas perspectivas futuras em buscarmos a felicidade, ajuda mútua, carinho e compreensão;
- ✓ Ao CNPQ pela bolsa de doutorado e a FAPEMIG pelos recursos financeiros para participação em eventos científicos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

A presente Tese de Doutorado envolveu o estudo teórico da dinâmica e reatividade de metaloenzimas envolvidas na degradação de compostos organofosfatos. Em particular, a degradação do triéster de fosfato paraoxon pela enzima fosfotriesterase. Inicialmente a hidrólise não enzimática do paraoxon em solução aquosa foi estudada onde se obteve, diferente hidrólise alcalina, que a hidrólise neutra ocorre em duas etapas, através de um mecanismo $A_N + D_N$, com a formação de um intermediário pentacoordenado de fósforo. A reação apresenta energias livres de ativação de 31,8 e 1,9 kcalmol⁻¹ para a primeira e segunda etapas, respectivamente, prossegue através de uma sequência de processos de transferência de prótons a partir da molécula de água nucleofílica e terminando com a protonação do grupo de saída nitrofenolato. A inclusão explícita das moléculas de água de solvatação mostrou-se essencial para descrever os processos de transferência de prótons ao longo da coordenada de reação e também para estabilizar o intermediário pentacoordenado. A hidrólise do paraoxon também foi estudada utilizando um modelo do sítio ativo da enzima fosfotriesterase de *Pseudomonas diminuta* contendo íons Cd²⁺. A partir deste estudo foi proposto um mecanismo básico consistindo em: i) Troca da molécula de água coordenada e coordenação do substrato ao átomo de Cd_β mais exposto ao solvente de forma monodentada, ii) protonação do ligante em ponte μ-hidroxo pela molécula de água e formação *in situ* do nucleófilo, iii) formação de um intermediário pentacoordenado com quebra de ligação química do grupo de saída e formação de ligação química para com o nucleófilo, iv) protonação do resíduo de aminoácido Asp301 e restauração do sítio ativo através da coordenação de outra molécula de água do meio solvente. Foi mostrado que as moléculas de água inicialmente coordenadas no sítio ativo desempenham um papel crucial na estabilização dos estados de transição e do intermediário pentacoordenado. A reação ocorre através de um mecanismo de duas etapas ($A_N + D_N$), com barreiras de energia de 12,9 e 1,9 kcalmol⁻¹ para a primeira e segunda etapas, respectivamente, em excelente concordância com os dados experimentais. Para os sistemas enzimáticos estudados, a inclusão da energia de dispersão contribui para diminuir as barreiras de energia em até 26%. O mecanismo básico para a enzima Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE proposto mostrou ser uma proposta consistente mecanisticamente e viável cineticamente. Os efeitos dos diferentes cofatores metálicos presentes no sítio ativo da enzima fosfotriesterase de *Pseudomonas diminuta* foram avaliados através de simulações de dinâmica molecular clássica. O modelo de íon livre e modelo de íon ligado com parametrização de potencial foram utilizados para a descrição dos metais de transição e parametrização do campo de força. As simulações da apoenzima de fosfotriesterase, em relação aos sistemas de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II), mostrou que a simples mudança de um dos metais no sítio ativo, através das análises de RMSF e PCA já são suficientes para provocar e mostrar modificações de dinâmica nas proteínas. Realizou-se simulações envolvendo o inibidor dietil metilbenzil fosfato e o substrato dietil p-

nitrofenol fosfato nos sistemas parametrizados de Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II). Através dos resultados foi mostrado que o inibidor dietil metilbenzil fosfato desloca-se do sítio ativo e fica durante a maior parte da simulação de dinâmica molecular clássica interagindo com resíduos de aminoácidos da superfície da enzima e com o meio solvente em ambos os sistemas. Entretanto, para o substrato dietil p-nitrofenol fosfato percebemos uma modificação estrutural e reorientação do substrato ao mudar sua posição no sítio ativo. Os resultados obtidos nas simulações de PTE indicam que os dados correlacionados na literatura trazem informações que podem não ser adequadas em virtude: i) das formas de equilibração de energia do sistema enzimático de PTE; ii) e do espaço de tempo curto das simulações realizadas. Os estudos de dinâmica molecular mostraram que mudanças nos cofatores metálicos levam a mudanças expressivas na dinâmica das metaloenzimas e, portanto, afetam na reatividade enzimática.

ABSTRACT

The present PhD thesis involved the theoretical study of the dynamics and reactivity of metalloenzymes involved in the degradation of organophosphate compounds. In particular, the degradation of the phosphate triester paraoxon by the phosphotriesterase enzyme. Initially the non-enzymatic hydrolysis of paraoxon in aqueous solution was studied where it was obtained that, different alkaline hydrolysis, neutral hydrolysis occurs in two stages, through an $A_N + D_N$ mechanism, with the formation of a pentacoordinated phosphorus intermediate. The reaction exhibits activation free energies of 31.8 and 1.9 kcalmol⁻¹ for the first and second stages, respectively, proceeding through a sequence of proton transfer processes from the nucleophilic water molecule and ending with protonation of the nitrophenolate leaving group. The explicit inclusion of solvation water molecules was essential to describe the proton transfer processes along the reaction coordinate and also to stabilize the pentacoordinated intermediate. The hydrolysis of paraoxon was also studied using an active site model of the enzyme phosphotriesterase of *Pseudomonas diminuta* containing Cd²⁺ ions. From this study a basic mechanism was proposed consisting of: i) Co-ordinate water molecule change and coordination of the substrate to the Cd_β atom most exposed to the solvent in a monodentate way, ii) protonation of the μ-hydroxyl bridge ligand by the water molecule and in situ formation of the nucleophile, iii) formation of a pentacoordinate intermediate with significant breaking of chemical bonding of the leaving group and formation of chemical attachment to the nucleophile, iv) protonation of the amino acid residue Asp301 and restoration of the active site by coordination of another water molecule of the solvent medium. It has been shown that the water molecules initially coordinated at the active site play a crucial role in the stabilization of the transition states and the pentacoordinate intermediate. The reaction takes place through a two-step mechanism ($A_N + D_N$), with energy barriers of 12.9 and 1.9 kcal mol⁻¹ for the first and second steps, respectively, in excellent agreement with the experimental data. For the enzymatic systems studied, the inclusion of dispersion energy contributes to decrease energy barriers by up to 26%. The basic mechanism for the proposed PTE Cd²⁺/Cd²⁺ enzyme proved to be a mechanistically consistent and kinetically feasible proposal. The effects of the different metallic cofactors present in the active site of the phosphotriesterase enzyme of *Pseudomonas diminuta* were evaluated through simulations of Classical Molecular Dynamics. The free ion model and ion model connected with potential parameterization were used for the description of transition metals and parameterization of the force field. The phosphotriesterase apoenzyme simulations, in relation to the Zn(II)-Zn(II) and Zn(II)-Cd(II) systems, showed that the simple change of one of the metals in the active site, through the RMSF and PCA are already sufficient to provoke and show changes of dynamics in the proteins. Simulations involving the diethyl methylbenzyl phosphate inhibitor and the diethyl p-nitrophenol phosphate substrate were

carried out in the Zn(II)-Zn(II) and Cd(II)-Cd(II) parametrized systems. From the results it has been shown that the diethyl methylbenzyl phosphate inhibitor moves from the active site and remains for most of the classical molecular dynamics simulation interacting with amino acid residues from the surface of the enzyme and with the solvent medium in both systems. However, for the substrate diethyl p-nitrophenol phosphate we noticed a structural modification and reorientation of the substrate by changing its position in the active site. The results obtained in the PTE simulations indicate that the correlated data in the literature provide information that may not be adequate due to: i) the energy equilibration of the PTE enzyme system; ii) and the short time of the simulations. Molecular dynamics studies have shown that changes in metal cofactors lead to significant changes in the dynamics of metalloenzymes and therefore affect enzymatic reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estruturas químicas de triésteres de fosfato pesticidas e inseticidas neurotóxicos.13

Figura 1.2: Estruturas químicas de agentes neurotóxicos de guerra química mais comuns. 13

Figura 1.3: Estrutura química geral de ésteres de fosfato

Figura 1.4: Propostas de clivagem via ação nucleofílica, para a reação de substituição para a degradação de ésteres de fosfato. Retirado das referências. 23,26

Figura 1.5: Possibilidades de mecanismo, (A) disossiativo, (B) concertado, (C) associativo, para a hidrólise de ésteres de fosfato.

Figura 1.6: Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Retirado e adaptado das referências. 10,13

Figura 1.7: Mecanismo de Inibição e "Envelhecimento" da AChE por Compostos Organofosfatos. Retirado e adaptado das referências.10,13

Figura 1.8: Mecanismo de atuação de oximas para o processo de reativação da AChE

Figura 1.9: Sobreposição de preferências a substratos por fosfotriesterases (PTE e OpdA), diesterases (GpdQ) e monoesterases. Figura adaptada e reproduzida da referência.14

Figura 1.10: Estrutura geral (esquerda) e do sítio ativo (direita) da PTE de *Pseudomonas diminuta*. Os dois íons metálicos divalentes no sítio ativo da enzima nativa (Zn^{2+} neste caso), são mostrados como esferas cinza, e estão ligados através de um resíduo de lisina carboxilado e uma molécula de água. A figura foi adaptada e retirada da referência.47

Figura 1.11: Mecanismo proposto para a catálise de paraoxon por PTE. A numeração do resíduo de aminiácido refere-se à estrutura cristalográfica de pdPTE.50

Figura 1.12: Estrutura aproximada do complexo de Michaelis entre paraoxon e o sítio ativo de PTE. Adaptado de Wong et al. 31

Figura 1.13: Visão geral do procedimento de imobilização covalente de fosfotriesterases. Os tecidos de poliéster são ativados com EDA para introduzir grupos de amina livres e a enzima é ligada covalentemente usando o reticulante glutaraldeído. Figura adaptada da referência.53

Figura 1.14: Degradação catalítica de paraoxon com um óxido de metal geral (MO) adaptado de Referência.17 Os produtos de degradação são: fosfato de dietila e p-nitrofenol.

Figura 2.1: Exemplo de recentes sistemas apresentados investigações por modelos de "cluster". Neste caso, o estudo da reação de transferência do grupo metila em histonas por metiltransferase (HKMT). Os asteriscos refere-se a coordenadas de átomos mantidas congeladas nas posições cristalográficas durante o processo de otimização das geometrias. Retirado das referências. 28, 29

Figura 2.2: Histidina protonada da esquerda para direita nos nitrogênios: ϵ (épsilon), δ (delta) e em ambas as posições.

Figura 2.3: Estruturas: I) a esquerda o resíduo de aminoácido Lys169 normal e II) a direita o resíduo lisina carboxilada encontrado no sítio ativo de pdPTE.

Figura 2.4: Representação de modelos de estruturas e de etapas utilizadas para o trabalho de parametrização de centros metálicos empregando o programa MCPB.py. Figura retirada da referência.⁷²

Figura 3.1: Estruturas otimizadas, no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d), dos reagentes (Reac), estado de transição (TS1) e intermediário pentacoordenado (Int) localizados na primeira parte da hidrólise neutra de paraoxon em solução aquosa. Os átomos de hidrogênio dos grupos etila foram omitidos para maior clareza. As distâncias são dadas em Angstroms.

Figura 3.2: Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) do estado de transição (TS2) e produtos (Prod) localizados na segunda parte da hidrólise neutra do paraoxon em solução aquosa. Os átomos de hidrogênio dos grupos etila foram omitidos para maior clareza. As distâncias são dadas em Angstroms.

Figura 4.1: (A) Estrutura cristalográfica da fosfotriesterase de Cd²⁺/Cd²⁺ de *Pseudomonas diminuta*²⁸ com zoon no sítio ativo mostrando os resíduos e moléculas de água coordenadas aos centros metálicos. (B) Modelo estrutural do sítio ativo da fosfotriesterase Cd²⁺/Cd²⁺ utilizado neste trabalho. Átomos de carbono marcados com asterisco foram mantidos congelados durante as otimizações geométricas para levar em consideração os efeitos estéricos do ambiente enzimático.

Figura 4.2: Estruturas cristalográficas do sítio ativo da fosfotriesterase de Cd²⁺/Cd²⁺ (A) e Zn²⁺/Zn²⁺ (B) de PTE, realçando as principais características estruturais dos sítios ativos. As distâncias das ligações químicas são dadas em Angstrom.

Figura 4.3: Estrutura otimizada no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ para os modelos estruturais dos sítios ativos: (A) Cd²⁺/Cd²⁺ e (B) Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE. As principais características estruturais foram destacadas. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

Figura 4.4: Superfície de Energia Potencial para a interação do substrato paraoxon com o modelo estrutural da fosfotriesterase de Cd²⁺/Cd²⁺ (A). Estruturas obtidas com r(Cdβ--O=P) = 4.0 Å (B) e 2,2 Å (C) são mostradas.

Figura 4.5: Estrutura otimizada do complexo substrato-enzima sem rotação do ângulo diédrico <(Cd-O-P-O) (A) e após rotação (B).

Figura 4.6: Estrutura otimizada obtida ao longo da primeira etapa na coordenada de reação para a hidrólise do paraoxon através do sítio ativo da fosfotriesterase de Cd²⁺/Cd²⁺. Espécies reagentes, Reac, primeiro estado de transição, TS1 e o intermediário Pentacoordenado, Int. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

Figura 4.7: Estrutura otimizada obtida ao longo da segunda etapa na coordenada de reação para a hidrólise do paraoxon através do sítio ativo da fosfotriesterase de Cd²⁺/Cd²⁺. Segundo estado de transição, TS2 e o produto final, Prod. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

Figura 5.1: Estruturas: I) a esquerda o resíduo de aminoácido Lys169 normal e II) a direita o resíduo lisina carboxilada encontrado no sítio ativo de pdPTE.

Figura 5.2: Estrutura e representação de nomenclatura dos 20 aminoácidos encontrados em sistemas biológicos.

Figura 5.3: Ângulos e ligações químicas do resíduo de Lys169 de pdPTE, Zn(II)-Zn(II), para os quais foram necessários o desenvolvimento de parâmetros a serem incorporados ao campo de força ff14SB, do programa AMBER.

Figura 5.4: Arquivo proteína.pdb obtido após tratamento com o programa pdb4amber e já com átomos de hidrogênio adicionados após uso do programa propka³⁷ e reduce.³⁸

Figura 5.5: Estados de protonação para os resíduos de aminoácidos His no sítio ativo de pdPTE para o processo de parametrização.

Figura 5.6: Arquivo proteína.pdb obtido após tratamento com o programa pdb4amber e já com átomos de hidrogênio adicionados, após uso do programa propka,³⁷ para definição dos estados de protonação. Arquivo no formato para iniciar o uso do programa MCPB.py⁵² de parametrização.

Figura 5.7: Representação dos ésteres de fosfato: a) dietil 4-metilbenzil paraoxon e b) dietil 4-nitrofenil paraoxon no sítio ativo de Zn(II)-Zn(II) parametrizado para realização de DM utilizando o modelo ligado. Estruturas representadas sem as moléculas de água da caixa de solvatação para melhor visualização.

Figura 5.8: Ângulos e ligações químicas do resíduo de Lys169 de pdPTE, Zn(II)-Zn(II), para os quais foram necessários o desenvolvimento de parâmetros a serem incorporados ao campo de força ff14SB, do programa AMBER.

Figura 5.9: Curvas de energia potencial, obtidas via scan rígido e ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, obtidas para parametrização de constante de força de ligação química entre os átomos de N11 e C68, do resíduo COO terminal da Lys169 na enzima pdPTE/1HZY. Cálculos realizados no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ.

Figura 5.10: Curvas de energia potencial, obtidas via scan rígido e ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, obtidas para parametrização de constante de força de deformação angular entre os átomos de C25-N11-C68, do resíduo COO terminal da Lys169 na enzima pdPTE/1HZY. Cálculos realizados no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ.

Figura 5.11: Arquivo biblioteca para o grupo CO2 terminal no resíduo de aminoácido não padrão Lys169 presente e coordenado em ponte no sítio ativo de pdPTE.

Figura 5.12: Estrutura solvatada do sistema nativo de pdPTE e representação dos resíduos no sítio ativo.

Figura 5.13: Gráfico de RMSD plotado em relação a simulação de DM usando o método de íon não ligado, para o sistema nativo de pdPTE, contendo os íons Zn⁺². RMSD dos carbonos alfa da proteína (linha preta) e RMSD dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo (linha vermelha).

Figura 5.14: Variação de distância dos átomos dos resíduos de aminoácidos da primeira esfera de coordenação direcionados aos metais de Zn⁺² na enzima nativa de pdPTE.

Figura 5.15: Sobreposição da estrutura cristalográfica e o último frame da simulação de DM do sistema nativo de pdPTE.

Figura 5.16: Ampliação da região do sítio ativo relacionada à sobreposição entre a estrutura cristalográfica e o último frame da simulação de DM do sistema nativo de pdPTE.

Figura 5.17: Representação do sítio ativo M α -M β modelado na parametrização usando o programa MCPB.py do pacote computacional AMBER.

Figura 5.18: RMSD para as DM para os sistemas de pdPTE: Zn(II)-Zn(II) (A), Cd(II)-Cd(II) (B) e Zn(II)-Cd(II) (C) usando o modelo ligado para os metais de transição no sítio ativo. (D) Sobreposição dos RMSF por resíduo de aminoácidos do sistema enzimático de Zn(II)-Zn(II) (linha preta), Cd(II)-Cd(II) (linha vermelha) e Zn(II)-Cd(II) (linha verde). Nos gráficos de RMSD a linha preta corresponde à variação do RMSD de toda a enzima, enquanto a linha vermelha sobre o RMSD dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

Figura 5.19: Sobreposição dos RMSF por resíduo de aminoácidos do sistema enzimático Zn(II)-Zn(II) (linha preta) e Zn(II)-Cd(II) (linha vermelha) de pdPTE.

Figura 5.20: Análise de PCA realizada sobre frames da etapa de produção das simulações de DM dos sistemas enzimáticos de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II) de pdPTE.

Figura 5.21: RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de pdPTE e substituída por Cd(II)-Cd(II) e a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do inibidor EBP.

Figura 5.22: Gráficos da variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do inibidor e o átomo de metal posicionado no sítio M(β) monitorada durante as simulações de DM.

Figura 5.23: Análise de PCA realizada sobre frames da etapa de produção das simulações de DM dos sistemas enzimáticos de Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II) de pdPTE, simuladas com a presença do inibidor EBP.

Figura 5.24: Gráficos de RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de pdPTE e substituída por Cd(II)-Cd(II) e a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do substrato PAR.

Figura 5.25: Gráficos da variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do substrato e o átomo de metal posicionado no sítio M(β), monitorada durante as simulações de DM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Variação das distâncias de ligação fósforo-nucleófilo (P-OH₂O) e do fósforo-grupo de saída (P-OAr) e percentagem de quebra de ligação P-OAr (% BB) e percentagem de formação da ligação P-OH₂O (% BF) ao longo da coordenada de reação.

Tabela 3.2: Parâmetros termodinâmicos e cinéticos calculados para a hidrólise neutra do paraoxon em solução aquosa.

Tabela 4.1: Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD) entre o modelo de cluster otimizado do sítio ativo Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE, a estrutura de difração de raios X experimental e a estrutura otimizada através do método ONIOM.

Tabela 4.2: Variação das distâncias de ligação fosforoso-nucleófilo (P-OH₂O) e do fósforo-grupo de saída (P-OAr) e a percentagem de quebra de ligação P-OAr (% BB) e a percentagem de formação da ligação P-OH₂O (% BF) ao longo da coordenada de reação.

Tabela 4.3: Energias relativas (em kcal/mol) obtidas para a reação de hidrólise do paraoxon promovida através do sítio ativo da enzima PTE substituída por Cd²⁺/Cd²⁺, em diferentes níveis de cálculo.

Tabela 5.1: Resultados para a parametrização da constante de força entre a ligação N11 e C68, obtidos via o ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, para o resíduo COO terminal da Lys169 na enzima pdPTE/1HZY.

Tabela 5.2: Resultados para a parametrização da constante de força entre o ângulo C25-N11-C68, obtidos via o ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, para o resíduo COO terminal da Lys169 na enzima pdPTE/1HZY.

Tabela 5.3: Parâmetros calculados de constantes de força e posições de equilíbrio, para descrição através do modelo de campo de força ligado, para os resíduos não padrão de metais de transição Zn⁺² no sistema nativo de pdPTE.

LISTA DE ABREVIACOES

OF - Compostos Organofosforados

ATP - Adenosina Trifosfato

BDEs - Energias de dissociação de ligações químicas

DNA - cido desoxirribonucleico

RNA - cido ribonucleico

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

CPAQ - Convenção Internacional sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Armazenamento e Uso de Armas Químicas

OTAN - Organização do Tratado do Atlântico Norte

AChE – Acetilcolinesterase

PTE - *Pseudomonas diminuta*

PAP - Fosfatase ácida púrpura

UV-Vis - Espectroscpia Ultravioleta Visível

S_N1 - Substituição nucleofílica unimolecular

S_N2 - Substituição nucleofílica bimolecular

D_N + A_N – Mecanismo dissociativo associativo

A_ND_N – Mecanismo concertado

A_N + D_N – Mecanismo associative dissociativo

BP.T – Geometria trigonal bipiramidal

pK_a – Constante de potencial de dissociação ácida

ACh – Acetilcolina

OpdA - *Agrobacterium radiobacter*

GpdQ – *Glycerophosphodiesterase*

His – Histidina

Asp – Aspartato

Lis – Lisina

QM/MM - Mecânica Quântica/Mecânica Molecular

CSIRO - Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Commonwealth

SsoPox - *Sulfolobus solfataricus*

DM – Dinâmica Molecular

CPU - Unidade de Processamento Central

GPU - Unidade de Processamento Gráfico

DFT – Teoria do Funcional de Densidade

DLPNO-CCSD – Coupled Cluster Local Baseado no Domínio de Pares de Orbitais Naturais

RESP - Potencial Eletrostático Restrito

MCPB.py - Construtor de Parâmetros de Centros de Metálicos Baseado em Python

ONIOM - Mecânica Orbital e Mecânica Molecular Integrada de N-camadas

PCM - Modelo Contínuo Polarizável

SMD - Densidade do Modelo de Solvente

MP2 – Teoria de Perturbação de Segunda Ordem

IRC - Coordenada Intrínseca de Reação

CHELPG - Potencial Eletrostático de Cargas Baseado no Método de Gride

MRCI - Método de interação de configuração multi-referência

AMBER - Modelo Assistido de Refinamento de energia

AM1 – Modelo Austin 1

PM3 - Modelo Parametrizado Número 3

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIACÕES	xvi
Capítulo 1: Introdução	20
1.1 Compostos Organofosforados (OFs)	20
1.2 Estrutura Química de Compostos Organofosforados e Mecanismos para a Clivagem da ligação P-O	24
1.3 Inibição da Acetilcolinesterase (AChE) por Organofosforados	29
1.4 Detoxificação Química de Organofosforados e Biorremediação	34
1.5 Importância e Desafios para a Química Teórica Computacional Enzimática	43
1.6 Objetivos.....	46
1.7 Referências Bibliográficas.....	48
Capítulo 2: Fundamentos Teóricos	54
2.1 Modelagem Computacional	54
2.2 Teoria do Funcional de Densidade - DFT	57
2.3 – Fundamentos da Teoria do Funcional da Densidade – DFT	57
2.4 – Teoremas de Hohenberg e Kohn – (HK)	59
2.5 – Primeiro Teorema	61
2.6 – Segundo Teorema.....	61
2.7 Modelagem de Sistemas Enzimáticos pelo Modelo de “Cluster” Usando a DFT	64
2.8 Dinâmica Molecular (DM).....	70
2.9 Aspectos Básicos de DM	72
2.10 Parametrização do Campo de Força AMBER para a Aproximação do Modelo Ligado (Bonded Model Approach) em Metaloproteínas	77
2.11 MCPB.py um Programa em Python Construtor de Parâmetros para Centros Metálicos	80
2.12 Métodos Híbridos QM/MM.....	85
2.13 Referências Bibliográficas.....	89
Capítulo 3: Investigação Teórica da Hidrólise Neutra do dietil p-nitrofenil fosfato (Paraoxon) em Solução Aquosa.....	96
3.1 Introdução	96
3.2 Detalhes Computacionais.....	101
3.3 Resultados e Discussão.....	102
3.4 Considerações Finais	113
3.5 Referências Bibliográficas.....	114
Capítulo 4: Mecanismo para a Hidrólise de Triésteres de Fosfato Promovido pela Fosfotriesterase Substituída por Cd(II)-Cd(II)	120

4.1 Introdução	120
4.2 Detalhes Computacionais	126
4.3 Resultados e Discussão.....	129
4.4 Considerações Finais	154
4.5 Referências Bibliográficas.....	155
Capítulo 5: Dinâmica Molecular (DM) de Fosfotriesterases (<i>pdPTE</i>) Contendo os Metais Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II), e Cd(II)-Cd(II): Interação com Inibidor e com o Substrato Paraoxon	161
5.1 Introdução	161
5.2 Detalhes Computacionais.....	164
5.3 Resultados e Discussão.....	179
5.4 Considerações Finais	210
5.5 Referências Bibliográficas.....	213
Capítulo 6: Conclusões	217
Capítulo 7: Apêndice	222
Apêndice A: Artigos Publicados e em Preparação Durante o Doutorado (2014-2018)	222
Apêndice B: Participação e Apresentação de Trabalhos em Congressos.....	222
Apêndice C: Formação Complementar.....	223
Apêndice D: Participação em Concursos/Aprovação	224
Apêndice E: Atuação Profissional	224

Capítulo 1: Introdução

1.1 Compostos Organofosforados (OFs)

Compostos Organofosforados (OFs) são substâncias que possuem o elemento fósforo e seus derivados substituídos do ácido fosfórico apresentam um grande número de aplicações e funções químicas.¹ Uma distinção é feita entre os compostos organofosforados nos quais o fósforo está diretamente ligado ao carbono (P-C), e entre os OFs em que o fósforo está ligado à parte orgânica das moléculas por um heteroátomo (oxigênio, nitrogênio ou enxofre).² Estes são amplamente distribuídos na natureza, principalmente como ésteres, ácidos fosfórico, pirofosfórico, trifosfóricos, e como coenzimas importantes, como adenosina trifosfato (ATP), dando suporte energético em organismos vivos - e uma série de vitaminas. Os OFs não apresentam, portanto, uma classificação única.^{2,3} Além disso, a ligação química P-C de um organofosforado é um análogo químico também estável da ligação P-O. Na verdade, ésteres de fosfato se destacam por sua resistência à hidrólise por ácidos fortes e até por combustão, durante processos de análise elementar.⁴ É importante observar, com base em energias de dissociação de ligações químicas (BDEs - Energies of chemical bond dissociation), que uma ligação P-C é de 70 a 100 kJmol⁻¹ mais fraca do que a correspondente ligação P-O de um éster de fosfato⁵, o que reflete o caráter menos polarizado deste tipo de ligação química.^{6,7} No entanto, BDEs refletem a quebra homolítica da ligação química e, se considerarmos a clivagem heterolítica, a ligação química P-C é consideravelmente mais estável.⁵ Entretanto, de forma bioquimicamente relevante e eficiente, a evolução colocou nas ligações P-O a base para a perpetuação da informação genética nos fosfodiésteres ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA).⁸

Paralelamente, os compostos organofosforados têm hoje o seu uso difundido em todo o mundo, principalmente na agricultura, como inseticidas, herbicidas e reguladores para o

crescimento de plantas.⁹ O uso desses compostos de forma indiscriminada iniciou-se a pouco mais de meio século, após as grandes guerras mundiais.¹⁰ A tecnologia usada na fabricação destes compostos de fósforo, como armas de guerra química, foi transferida e empregada geralmente na agricultura. Isto aconteceu durante o período conhecido como “Revolução Verde”, como resultado de ações promovidas pela organização mundial das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pelo Banco mundial.¹¹

No início da década de 70, as restrições impostas ao uso de pesticidas organoclorados como o DDT, aldrin, heptacloro e clordano, por exemplo, tornaram os compostos organofosforados e carbamatos novas vias para a busca de novos pesticidas, por se acreditar serem estas espécies químicas mais “seguras” que os organoclorados.¹² No entanto, a grande estabilidade das ligações químicas P-O tornam estas classes de compostos resistentes a intempéries como, ação da água, do solo e do ar.⁵⁻⁷ Portanto, acúmulos são observados devido ao uso excessivo ou manuseio inadequado destes compostos, que tem como consequência a contaminação de solos e meios aquáticos, e de modo geral, representam um problema para a sociedade. A figura 1.1 apresenta exemplos de estruturas destas moléculas, compostos organofosforados, usados como pesticidas e inseticidas.¹³

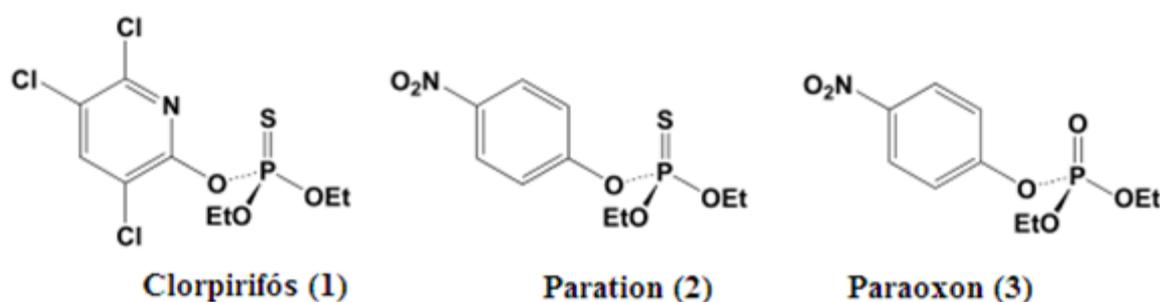


Figura 1.1: Estruturas químicas de triésteres de fosfato pesticidas e inseticidas neurotóxicos.¹³

Em relação aos agentes organofosforados de guerra química, um avanço considerável aconteceu em 1993, quando, 170 países entre eles o Brasil, assinaram a Convenção Internacional Mundial sobre a Proibição do Desenvolvimento, Produção, Armazenamento e Uso de Armas Químicas (CPAQ).¹³ Além de proibir o desenvolvimento, a produção, o armazenamento e o emprego das armas químicas, o tratado assinado estabeleceu um prazo de 10 anos para a destruição dos estoques destas armas químicas de guerra, pelos países detentores.¹⁴ Existe uma diversidade de agentes neurotóxicos¹⁵, dentre estes os mais conhecidos e estudados são: Tabun (GA) (1), Sarin (GB) (2), Soman (GD) (3), Ciclo-Sarin (GF) (4), e *O*-etil metilfosfonotioato de *S*-2(*diisopropilamino*)etila (VX) (5), sendo GA, GB, GD, GF e VX códigos de identificação atribuídos pela OTAN para esses agentes químicos mostrados na figura 1.2. Para exemplificar a toxicidade destes compostos, com apenas uma gota na pele, o agente nervoso (5) VX [*O*-etil metilfosfonotioato de *S*-2(*diisopropilamino*)etila] pode matar um ser humano em cerca de poucos minutos.^{16,17}

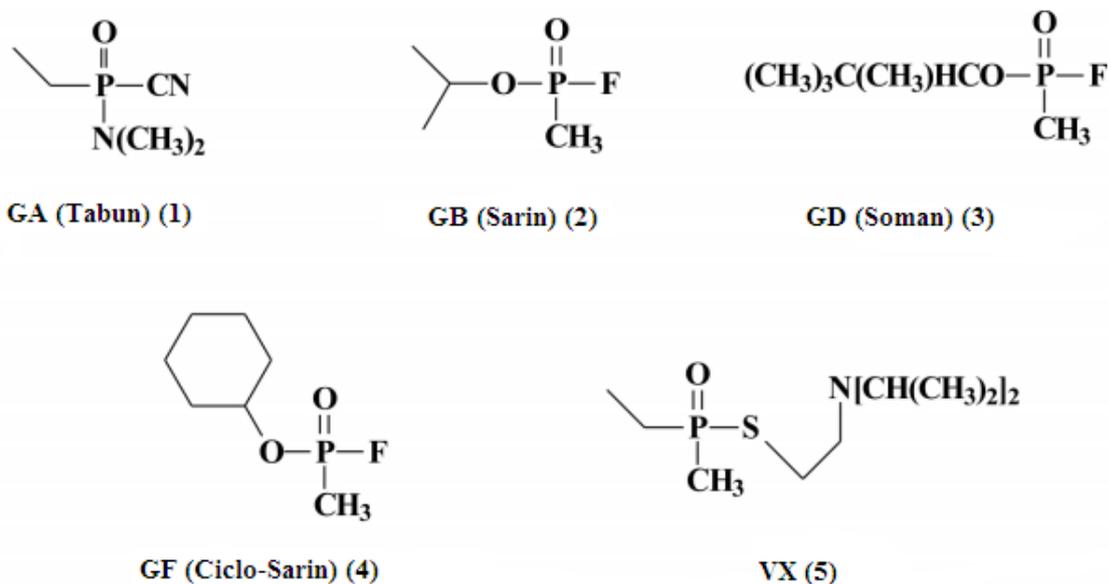


Figura 1.2: Estruturas químicas de agentes neurotóxicos mais comuns usados em guerra química.¹³

Diferentemente, a produção mundial de pesticidas agrícolas organofosforados está em franca expansão. Sendo que as intoxicações por pesticidas tornaram-se causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo.¹⁸ Seus efeitos inibindo colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (AChE), provocam o aumento de acetilcolina nas sinapses.¹⁹ Nas espécies mamíferas, estes distúrbios provocam lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e oscilações cardiorrespiratórias. Estas últimas sendo decorrentes de, broncoconstricção, aumento de secreções brônquicas e bradicardia, bem como depressão do sistema nervoso central.²⁰ As estimativas indicam que, aproximadamente, mais de três milhões de pessoas são afetadas por exposição a estes compostos, ocorrendo cerca de 220.000 mortes por ano.¹⁸ A taxa de mortalidade por organofosforados pesticidas agrícolas, ronda os 20 % dos casos.²¹ E, temos ainda, elevado índice de suicídios utilizando compostos OFs neurotóxicos¹⁸, principalmente nos países mais pobres.

Os problemas associados ao acúmulo destes pesticidas agrícolas em solos, subsolos, rios e mares, e a destruição dos agentes de guerra química, despertaram o interesse na química destes compostos.^{5,9} Embora ao longo dos anos diversos métodos de detoxificação química tenham sido desenvolvidos¹⁷, nenhum apresentou total eficiência e sem a produção de efeitos adversos para o meio ambiente. O tratamento de intoxicação por OFs é desafiador e há um contínuo debate sobre a eficácia dos tratamentos padrões que utilizam atropina e oximas.¹⁹ Portanto, existe urgência para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para OFs que minimizem a reabsorção sistêmica e a inativação da AChE, reduzindo a intoxicação. Pesquisas extensivas tem sido conduzidas sobre removedores (scavengers), baseados em enzimas que sequestraram (estequiométrica) ou hidrolisam (cataliticamente) OFs antes de poderem se ligar à AChE sináptica¹⁸. Pesquisas sobre a degradação destes compostos, portanto, se intensificaram a partir da descoberta da alta eficiência de microorganismos, como *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas diminuta* para degradar

OFs.²² Esses organismos possuem enzimas que degradam OFs, principalmente na presença de íons metálicos, que são cofatores no sítio ativo destas metaloproteínas. Assim, o campo da catálise enzimática continua sendo uma área de pesquisa cada vez mais ativa, com grandes esforços sendo feitos para reproduzir a atividade de enzimas naturais, com atenção especial dedicada a fatores que regulam o mecanismo catalítico.

1.2 Estrutura Química de Compostos Organofosforados e Mecanismos para a Clivagem da ligação P-O

Compostos organofosforados (OFs) originários do ácido fosfórico são ésteres de fosfato e apresentam elevada toxicidade nos triésteres de fosfato. Existe uma grande variedade destes compostos, os quais são classificados em mono-di e triésteres de fosfato conforme a quantidade de grupos ésteres presentes. A estrutura química mostrada na figura 1.3 exemplifica a forma geral de um éster de fosfato (quando R^1 , R^2 e $R^3 = H$, temos o ácido fosfórico). Dentre estas espécies somente os triésteres não participam em processos biológicos, por não serem produtos naturais.²³ O átomo central de fósforo é pentavalente, com ligações químicas a grupos funcionais diferentes. De maneira geral, possui uma ligação dupla com o oxigênio ou enxofre (nos tioésteres), porém suas três ligações simples podem ser variadas. O grupo alquiloxila (RO) sempre é presente na estrutura dos compostos OFs, e quando as outras duas ligações simples apresentam este grupo tem-se os fosfatos.²⁴

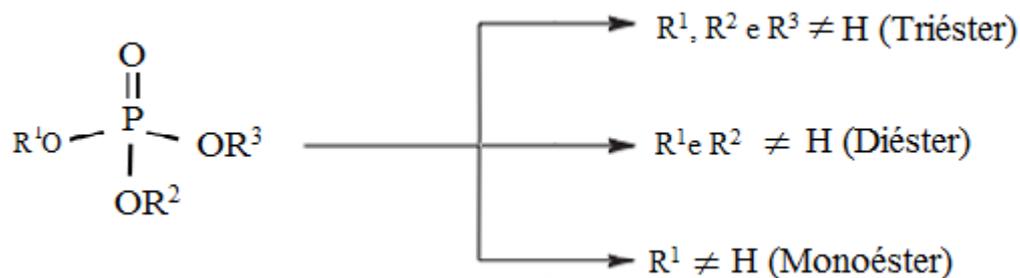


Figura 1.3: Estrutura química geral de ésteres de fosfato

A degradação de compostos organofosforados pode seguir várias rotas em função de condições químicas, como o pH e a ação de enzimas.²⁵ Neste sentido, são difundidas duas propostas para a clivagem da ligação química nos mecanismos químicos através da reação de substituição nucleofílica em ésteres fosfóricos.²⁶ Na primeira proposta, temos o átomo de carbono da ligação P-O-C do éster atuando como eletrófilo, sendo todo o grupo fosfato substituído na clivagem pelo nucleófilo. Na segunda alternativa, o nucleófilo ataca o átomo de fósforo central e desloca o álcool ou alcóxido via a quebra da ligação P-O, mantendo a ligação C-O intacta²³, conforme mostrado na figura 1.4.

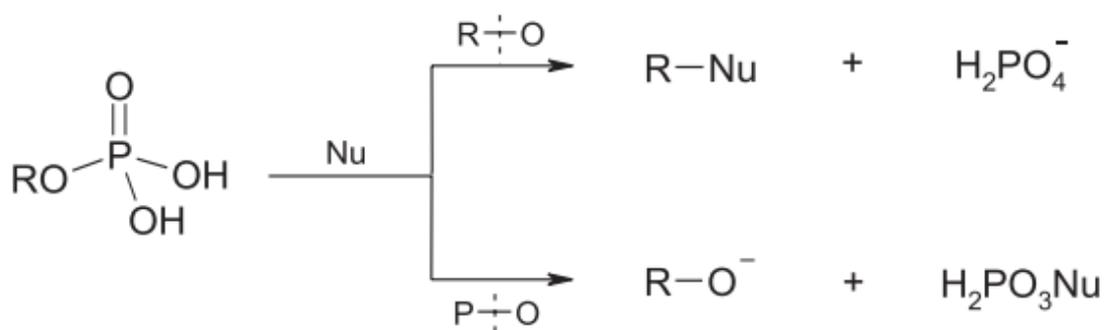


Figura 1.4: Propostas de clivagem via ação nucleofílica, para a reação de substituição envolvida na degradação de ésteres de fosfato. Retirado das referências.^{23,26}

As reações ocorrem, na sua grande totalidade, por ruptura da ligação P-O do éster fosfórico.²⁷ A ruptura da ligação C-O ocorre, em alguns casos, onde se tem transferência de unidades de glicose e fucose e via ação enzimática, quando se tem alcóxidos, a reação também pode ocorrer no carbono.²⁸ A hidrólise de triésteres de fosfato para os respectivos diésteres é catalisada por fosfotriesterases (PTEs)²⁹ e por fosfatases ácidas púrpuras (PAPs).³⁰ Estudos com PTEs tem mostrado potente ação biocatalisadora, tendo sido a proteína bem imobilizada, covalentemente, sobre a superfície de vários tipos de materiais transportadores.^{31,32}

Ainda não existem métodos experimentais para visualizar diretamente os estados de transição para transferências do grupo fosforila ou outras reações em solução aquosa. Portanto, apesar dos esforços e técnicas utilizadas,³² questões importantes permanecem em aberto. Um dos problemas enfrentados pelo leitor moderno que se aventura na literatura destes mecanismos de reação enzimática é se as reações de transferência do grupo fosforila em solução são concertadas ou se elas se processam por mais de uma etapa com a formação de intermediários reacionais.³³

De maneira geral as reações de substituição nucleofílica para ésteres de fosfato envolvendo a clivagem da ligação P-O tem sido associadas de forma mecanisticamente análoga as reações químicas de substituição nucleofílica no carbono tetraédrico, do tipo S_N1 ou S_N2. Estudados, extensivamente, por vários grupos de pesquisa³³⁻³⁷, os dados revelam que as reações químicas podem prosseguir por mecanismos dissociativos (D_N + A_N), concertados (A_ND_N) e associativos (A_N + D_N), como mostrado na figura 1.5.

Seguindo a coordenada de reação dissociativa (A), a reação química segue através da liberação do íon metafosfato hidratado (PO₃⁻) semelhante ao processo S_N1 na química do carbono. Portanto, de maneira equivalente a um carbocátion, esta espécie apresenta uma

geometria trigonal, podendo ser atacada por um nucleófilo por ambas as faces. Entretanto, experimentalmente ainda não foi demonstrada sua existência em reações químicas com mais de uma etapa em solução aquosa. Além disso, sabe-se hoje que para monoésteres de fosfato a clivagem da ligação P-O não acontece com a formação do íon metafosfato como intermediário, pois estudos estereoquímicos indicam a ocorrência de inversão de configuração no átomo de fósforo. Ao passo que se ocorrer a formação do íon metafosfato como intermediário ocorreria racemização. Assim, a incapacidade de detecção da presença do intermediário metafosfato resultaram em propostas de mecanismos alternativos.^{32,33}

A coordenada de reação mostrada em (B) na figura 1.5 mostra a formação de um mecanismo concertado, no qual a saída do grupo abandonador ocorre ao mesmo tempo em que acontece o ataque nucleofílico. Trata-se, portanto, da formação de um estado de transição pentacoordenado, com o ataque em linha do nucleófilo, ocupando com o grupo de saída as posições apicais em relação ao átomo central de fósforo. A reação segue, portanto, por um mecanismo de única etapa.^{32,33}

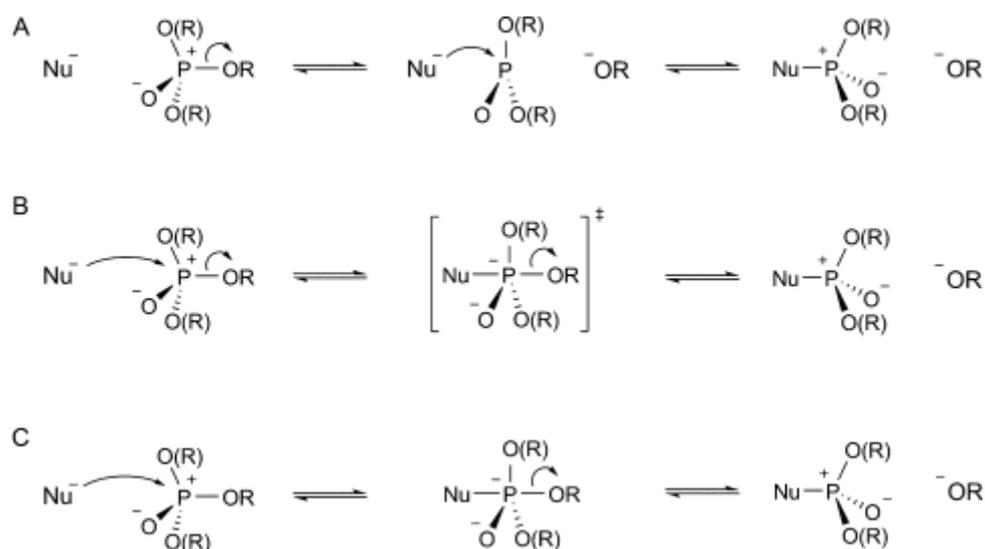


Figura 1.5: Possibilidades de mecanismo, (A) dissoziativo, (B) concertado, (C) associativo, para a hidrólise de ésteres de fosfato.

Na coordenada de reação associativa (C), em ésteres de fosfato ocorre o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo tetraédrico, passando o substrato a apresentar uma geometria pentacoordenada do tipo bipirâmide trigonal (BP.T.), e esta espécie pode ser um intermediário pentacoordenado estável (segundo um mecanismo de duas etapas) ou um estado de transição (segundo um mecanismo de etapa única) apresentando retenção ou inversão de configuração.^{32,33} De forma geral é aceito que monoésteres diânions podem apresentar um mecanismo dissociativo, diésteres aniônicos seguem um mecanismo concertado e triésteres de fosfato apresentam um mecanismo associativo de duas etapas se o intermediário fosforano for suficientemente estável.^{32,38,39}

Estudos mecanísticos apresentados por Kamerlin e Wilkie, por exemplo, revelaram que estas três possibilidades de mecanismos químicos são possíveis caminhos para a hidrólise catalisada por enzimas que contém cofatores metálicos.⁴⁰ Contudo, enquanto o mecanismo da hidrólise não catalisada de ésteres de fosfato depende da estrutura do substrato, seu nível de

esterificação, protonação, efeito do solvente e pKa do grupo abandonador³⁷, nas enzimas a situação apresenta um panorama ainda mais complicado. Por exemplo, além destas questões, o mecanismo nas enzimas sofrem influências determinadas pela presença e quantidade de íons metálicos em seus sítios ativos. Além disso, curiosamente, um grande número destas enzimas são catalisadoras promíscuas. Por exemplo, PTEs e PAPs, exibem atividades de fosfatase e sulfatase no mesmo sítio ativo. Também demonstraram catalisar de forma eficiente a hidrólise de outros substratos adicionais com diferentes graus de eficiência.^{41,42} Portanto, compreender os fatores subjacentes a essa multifuncionalidade é crucial para compreendermos, tanto as evoluções funcionais nas superfamílias enzimáticas, quanto para o desenvolvimento de enzimas artificiais que apresentem maior atividade catalítica e que levem a possibilidade do desenvolvimento de sistemas miméticos.

1.3 Inibição da Acetilcolinesterase (AChE) por Organofosforados

A AChE tem eficiência catalítica para a hidrólise da acetilcolina (ACh) sendo encontrada principalmente nas sinapses colinérgicas. Seu sítio catalítico, que apresenta a tríade Ser-His-Glu, comumente encontrada em hidrolases de serina,⁴³ é apresentado na figura 1.6. A hidrólise da ACh começa pelo ataque nucleofílico do átomo de oxigênio da serina ao átomo de carbono da carbonila da ACh, seguido pela transferência de próton para a histidina por influência do ácido glutâmico. Seguidamente ocorre a formação e eliminação de colina (álcool primário), formando um acil-enzima. Na reação de desacetilação, a enzima acetilada sofre ataque nucleofílico por moléculas de água, resultando na enzima livre, liberação da colina inativa e ácido acético.^{10,13}

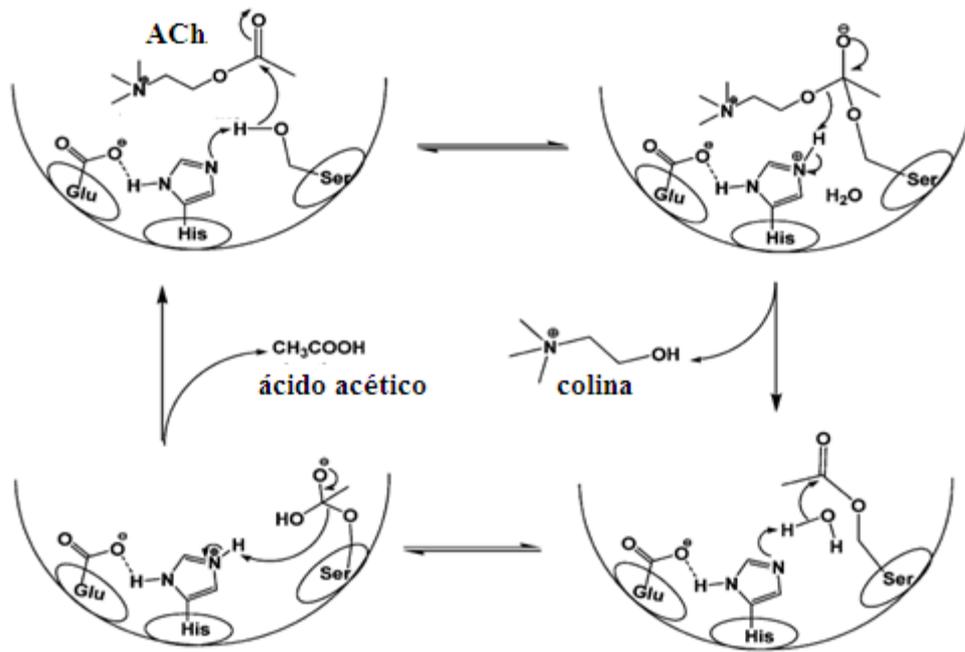


Figura 1.6: Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Retirado das referências.^{10,13}

Os organofosforados são altamente tóxicos para os animais devido a sua capacidade de inibição da acetilcolinesterase. O processo de intoxicação por OFs ocorre no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico. Nestes locais a AChE regula o neurotransmissor acetilcolina, e sua inibição por OFs pode chegar a ser irreversível e levar a morte. O mecanismo de inibição da AChE, por compostos organofosforados, é análogo à reação da enzima com Ach é mostrado na figura 1.7. A exceção está relacionada ao fato de que, após a saída do grupo abandonador do organofosforado, a enzima se torna fosforilada em vez de acetilada.^{10,13}

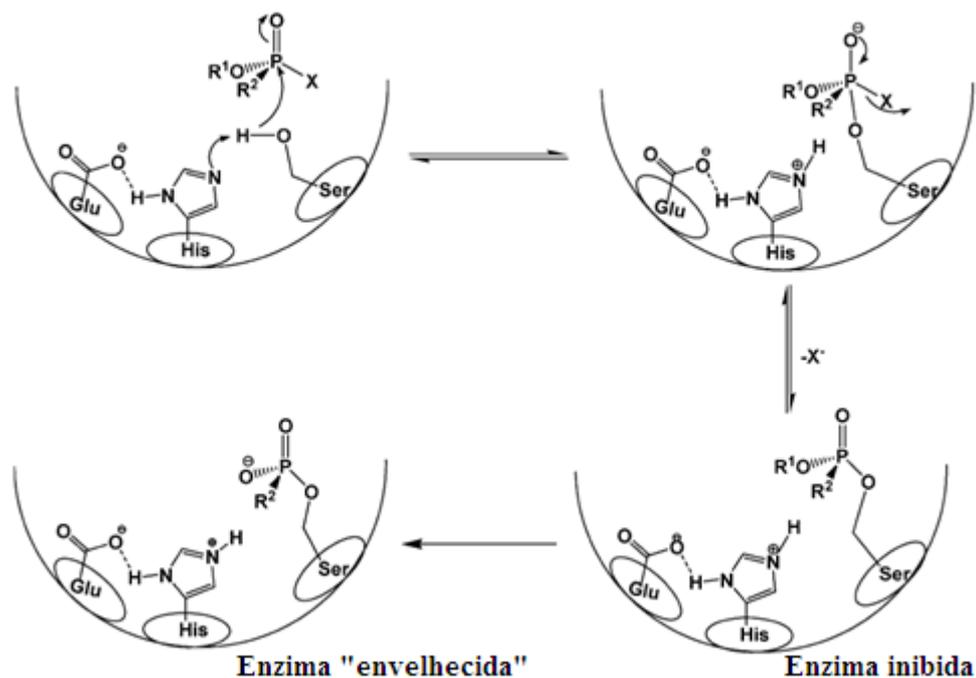


Figura 1.7: Mecanismo de Inibição e "Envelhecimento" da AChE por Compostos Organofosfatos. Retirado das referências.^{10,13}

Existe uma série de estudos teóricos^{10,13} que descrevem o ataque ao sítio ativo da AChE por grupos fosfato. As investigações mostram que a fosforilação acontece através de um mecanismo de adição-eliminação de duas etapas ($A_N + D_N$) no qual a etapa de adição é lenta, enquanto o processo de eliminação é mais rápido¹³. Assim, estes dados sobre a AChE são evidências para a observação de que a fosforilação ocorre através da formação de um intermediário bipiramidal trigonal (fosforano). Já no caso da acetilação espera-se a participação de um intermediário tetraédrico. Com a inibição a enzima não pode mais hidrolisar a acetilcolina⁴³. Isso resulta no acúmulo de acetilcolina nos receptores colinérgicos e conseqüentemente a estimulação contínua da fibra nervosa. A AChE fosforilada é estável, mas é importante mencionar que podem ocorrer processos secundários. O primeiro é a reação de hidrólise para a reativação da enzima fosforilada. Mas a velocidade de hidrólise é muito

mais lenta e insignificante do que para a reativação de uma enzima acetilada. A outra possibilidade é a quebra da ligação PO-C na enzima inibida. Após esta reação, conhecida como "envelhecimento" da AChE, a enzima não pode ser reativada e a inibição é completamente irreversível.^{10,13}

Portanto, o tratamento médico para a reativação da AChE deve ser feito rapidamente e antes de ocorrer o processo de “envelhecimento” de forma a regenerar o resíduo de serina. O mecanismo de reativação da AChE por oximas é mostrado na figura 1.8 (A). A administração de oximas é utilizada e consiste na remoção do grupo fosfato e reativação da AChE, em conjunto com outras drogas anti-colinérgicas e anticonvulsivantes, que agem no sentido de diminuir o acúmulo e sintomas da acetilcolina no sistema nervoso central e periférico. As oximas são substâncias que exibem uma reatividade inusitada em decorrência do efeito α .²³ Este fenômeno consiste no aumento da reatividade de nucleófilos que apresentam pares de elétrons não compartilhados sobre o átomo adjacente ao centro nucleofílico, quando equiparados a espécies nucleofílicas normais.¹ São espécies análogas as oximas, figura 1.8 (B) a hidroxilamina, a hidrazina, o ânion hipoclorito, os ácidos hidroxâmicos, os hidroperóxidos, o nitrito e o sulfito.^{1,23}

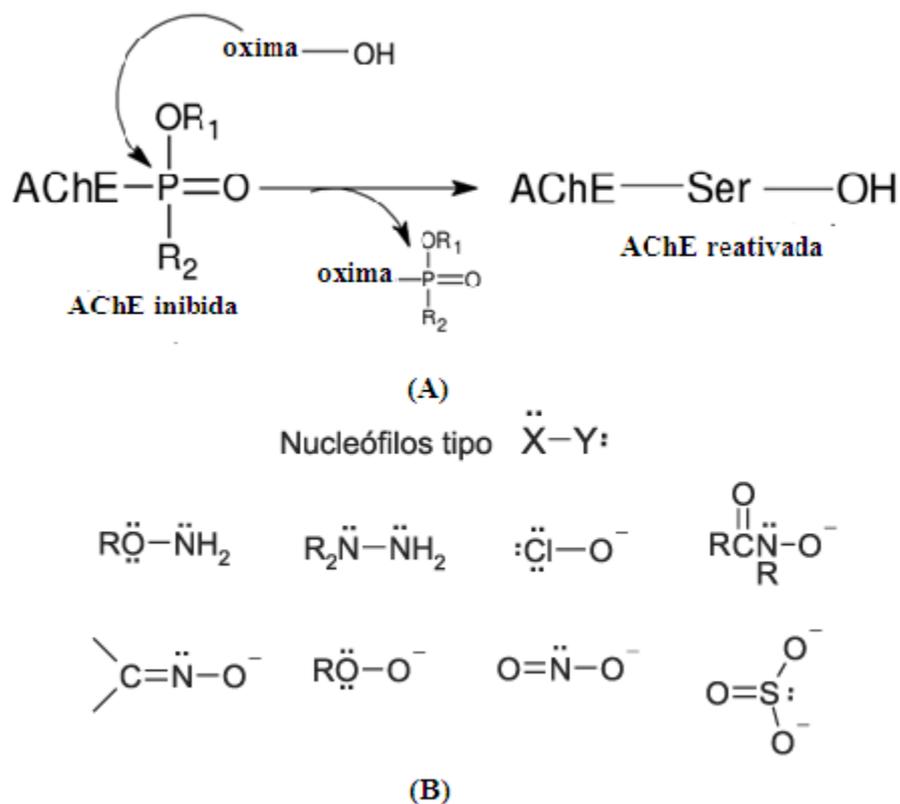


Figura 1.8: (A) Mecanismo de atuação de oximas para o processo de reativação da AchE. (B) Espécies nucleofílicas que apresentam do efeito α .²³

Entretanto, atualmente nenhuma destas substâncias possui um espectro de atividade efetiva considerando os agentes neurotóxicos diferenciados, sendo as melhores eficiências associadas a compostos OFs específicos. Nesta linha de ação, existe o estímulo para o desenvolvimento em síntese e análise para derivados mais eficientes na reativação da AChE. Por exemplo, a busca de um antídoto universal contra todos os tipos de envenenamento por OFs tem sido busca constante em vários grupos de pesquisa.⁴⁴ As áreas farmacêuticas, de alimentos, de descontaminação de ambientes e áreas agrícolas, por exemplo, estão interessadas na inibição ou reativação da AChE^{1,10,13}, pois a contaminação e intoxicação por OFs acontece tanto com armas químicas, quanto por inseticidas e pesticidas.

1.4 Detoxificação Química de Organofosforados e Biorremediação

A detecção e descontaminação de compostos OFs é um desafio importante e envolve a remoção e inibição rápida destes agentes químicos perigosos do meio ambiente, o que pode ser alcançado por métodos físicos e químicos. A descontaminação de ambientes por biocidas potentes foi realizada por métodos físicos, tais como a deposição em aterros terrestres, a queima aberta, a explosão controlada, e foram eventualmente sendo proibidos em virtude de impactos ambientais nocivos e preocupações com a saúde pública.¹⁴ Por métodos químicos a substituição nucleofílica e a oxidação são reações químicas possíveis para uma detoxificação, sob condições brandas dos agentes tóxicos.²³ Assim, agentes oxidativos como o cloro e KMnO_4 estavam entre os primeiros descontaminantes utilizados; soluções alcalinas (Na_2CO_3 , NaOH e KOH) também são utilizadas para detoxificação de OFs letais. No entanto, a ineficácia desses sistemas sobre grandes quantidades de OFs, bem como os subprodutos altamente tóxicos e/ou corrosivos causaram a busca por estratégias alternativas, mais eficientes e ambientalmente benignas.²³ Na busca de catalisadores para a rápida detoxificação, desintoxicação e biorremediação de agentes nervosos, estudos sobre a atividade catalítica de enzimas naturais e sintéticas, para clivagem da ligação P-O em OFs, foram desenvolvidos.^{14,17-18}

Neste contexto estudos empregando fosfotriesterases (PTEs) na degradação de agentes neurotóxicos e pesticidas são relatados a partir dos anos 1980.⁴⁵ As primeiras enzimas que exibiram simultaneamente alta especificidade e eficácia para a hidrólise catalítica de agentes nervosos tinham origem bacteriana. Por exemplo, a hidrólise de triésteres de fosfato para os respectivos diésteres é catalisada por PTEs. Estas enzimas foram descobertas como parte da resistência de alguns insetos a inseticidas e na habilidade de micróbios em degradar pesticidas. As fosfotriesterases apresentam potencial para degradar uma variedade de triésteres OFs, clivando as ligações P-O, P-F, P-CN e P-S com desempenho significativo.⁴⁵

Sua capacidade de catalisar a desintoxicação de agentes de guerra química incluem OFs pesticidas que são intensamente utilizados na agricultura hoje em dia.

As fosfotriesterases de *Pseudomonas diminuta* (*pdPTE*) e *Agrobacterium radiobacter* (*arPTE*) tem sido as mais intensamente estudadas. A *pdPTE* é capaz de hidrolisar paraoxon (dietil *p*-nitrofenil fosfato) com uma velocidade 10^{12} vezes superior a da reação espontânea não-catalisada e exibe uma baixa atividade para a hidrólise de diésteres e monoésteres de fosfato⁴⁶, conforme mostrado na figura 1.9. Suas atividades combinadas podem degradar pesticidas ou agentes nervosos OFs altamente tóxicos em grande parte levando a inofensivos produtos de monoésteres. Estes monoésteres podem ser facilmente metabolizados em fosfato inorgânico usando uma infinidade de monoesterases¹⁴.

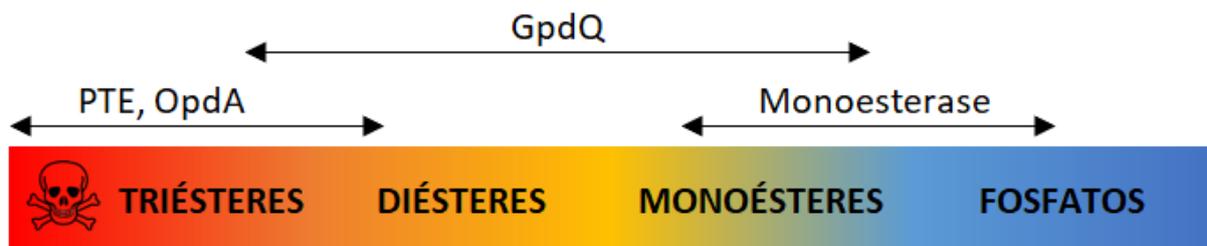


Figura 1.9: Sobreposição de preferências a substratos por fosfotriesterases (PTE e OpdA), diesterases (GpdQ) e monoesterases. Figura adaptada da referência.¹⁴

Todas as fosfotriesterases são hidrolases metal dependentes, isto é, existe a necessidade e requisito para possuírem metais divalentes nos sítios ativos, que se ligam diretamente ao substrato para favorecer o processo de catálise. Porém, para o mecanismo enzimático, o papel de cada metal no sítio ativo destas enzimas apresenta questões em debate e abertas na literatura. As estruturas cristalográficas de *pdPTE* e *arPTE* nas formas livres e ligadas a

inibidores competitivos são conhecidas.^{29,46,47} Várias destas estruturas foram resolvidas com elevada resolução.⁴⁷ As observações estruturais, juntamente com estudos cinéticos, permitiram elucidar vários aspectos do mecanismo destas enzimas. De modo geral, a enzima nativa de *pdPTE*⁴⁷ apresenta um centro dinuclear contendo dois íons de Zn^{2+} , que interagem por meio de um ligante em ponte hidróxido e um carbamato derivado do grupo ϵ -amino da Lis-169 mostrado na figura 1.10. Os dois íons de Zn^{2+} estão situados a uma distância de $\sim 3,4$ Å um do outro. O íon Zn^{2+} mais interno ao solvente é coordenado pela His55, His57 e Asp301 e o íon Zn^{2+} exposto ao solvente é coordenado pela His201, His230 e algumas moléculas de água do solvente, que parece ser uma espécie nucleofílica na reação de hidrólise que realiza. Outros metais divalentes, tais como Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} , também ativam a enzima de modo similar ou mesmo em maior extensão do que o Zn^{2+} .⁴⁸

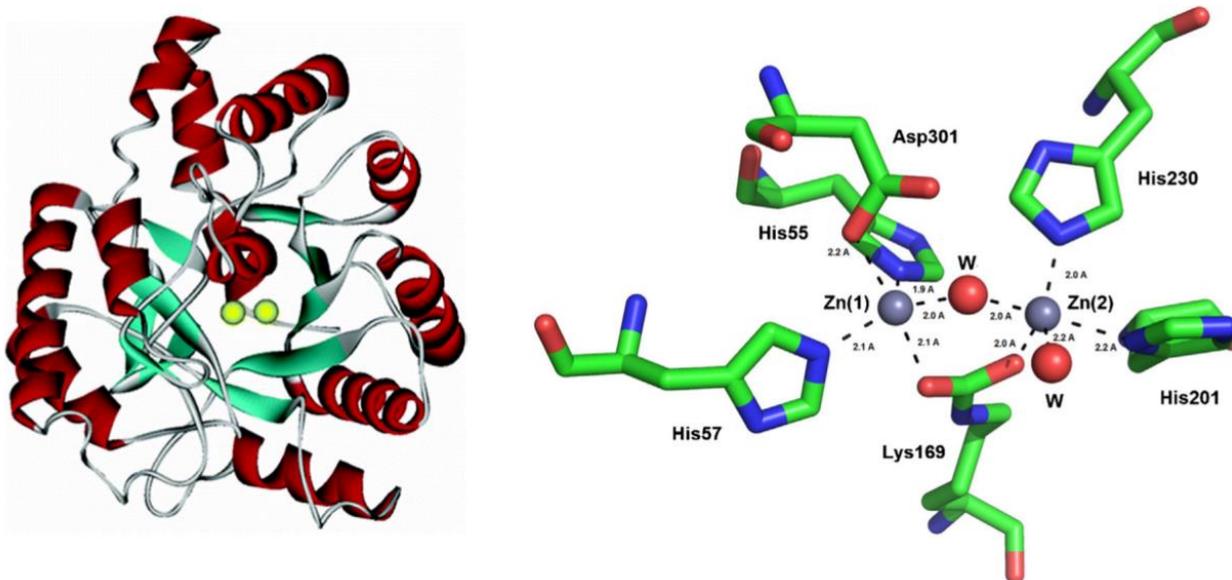


Figura 1.10: Estrutura geral (esquerda) e do sítio ativo (direita) da PTE de *Pseudomonas diminuta*. Os dois íons metálicos divalentes no sítio ativo da enzima nativa (Zn^{2+} neste caso), são mostrados como esferas cinza, e estão ligados através de um resíduo de lisina carboxilado e uma molécula de água (onde W são moléculas de H_2O). A figura foi retirada da referência.⁴⁷

Estudos com ésteres de fosfato quirais indicam que a reação de hidrólise ocorre com inversão da configuração no centro de fósforo.⁴⁹ Este achado indica que a reação procede via uma única etapa, com a expulsão do grupo de saída concertada com o ataque nucleofílico. De outra forma, a reação que envolvesse um intermediário fosforil-enzima, levaria a duas inversões de configurações e, conseqüentemente, a retenção de configuração. A reação em uma única etapa deve envolver a ativação de uma molécula de água. Esta ativação depende do metal no centro dinuclear e no caso do Zn observa-se um valor de pK_a de 6,1, presumivelmente da água ligada a ambos os íons metálicos.⁴⁹ Dessa forma, o nucleófilo é um grupo μ -hidroxo que, de acordo com a arquitetura do sítio ativo, está posicionado do lado oposto ao do grupo de saída. Assim, a reação deve envolver um estado de transição bpirâmidal trigonal.⁵⁰ O mecanismo para esta proposta é mostrado na figura 1.11.

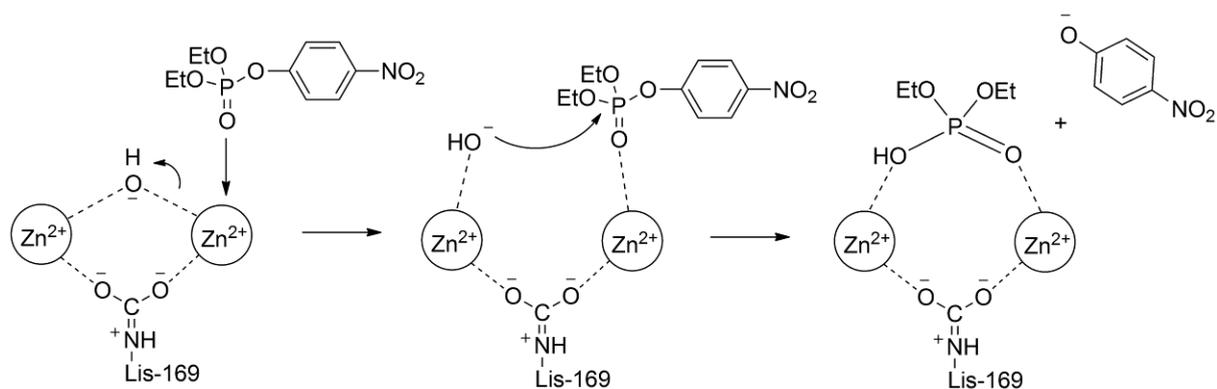


Figura 1.11: Mecanismo proposto para a catálise de paraoxon por PTE. A numeração do resíduo de aminoácido refere-se à estrutura cristalográfica de *pdPTE*.⁵⁰

Este mecanismo de reação catalítica tem sido amplamente investigado. No mecanismo de reação sugerido na figura 1.11 ambos os cátions Zn^{2+} no sítio ativo estão participando

diretamente na reação enzimática de hidrólise. Porém, cálculos de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM), investigando o mecanismo da reação de hidrólise enzimática de paraoxon por *pdPTE*, apontam para outras possibilidades mecanísticas. Nessa proposta não temos mais a formação do produto de Michaelis ligado de forma binuclear. Mostra-se, a ligação e interação do substrato somente ao átomo de zinco, Zn_{β} , mais exposto ao solvente, e a reação se processando por mecanismo de duas etapas.^{10,13,31} Uma das estruturas desta proposta é mostrada na figura 1.12.

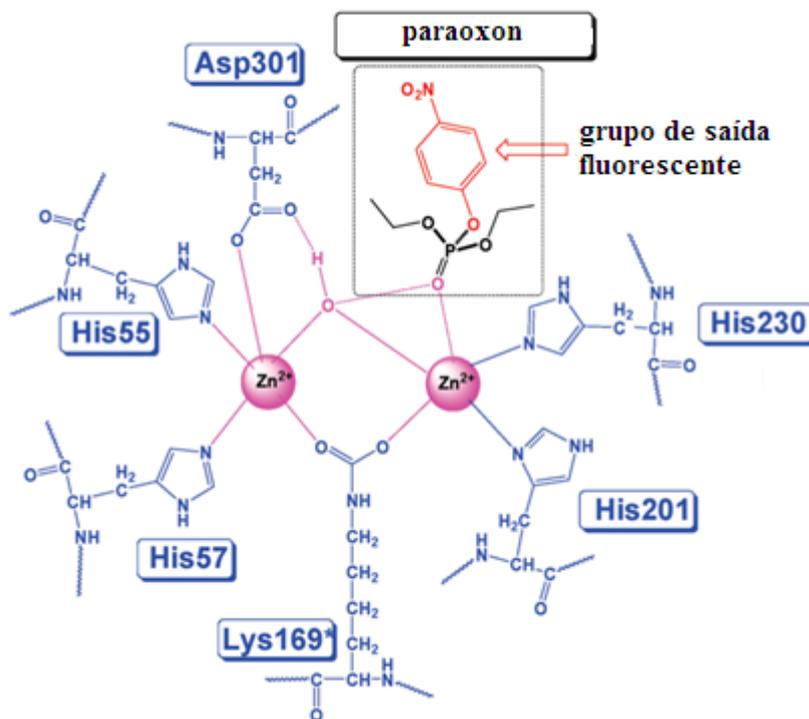


Figura 1.12: Estrutura aproximada do complexo de Michaelis entre paraoxon e o sítio ativo de PTE. Adaptado de Wong *et al.*³¹

Em contraste com os estudos experimentais^{51,52}, a quantidade de trabalhos teóricos para esta classe de enzimas variando-se os metais em seu sítio ativo é reduzida. As propostas atualmente disponíveis apresentam a possibilidade de mecanismos concertados ($A_N D_N$) e associativos ($A_N + D_N$) para a hidrólise de triésteres de fosfato por *pdPTE*⁴⁶. Além disso, há uma busca pela otimização de sistemas enzimáticos que possam ter atividade catalítica e estabilidade protéica melhoradas.⁴⁶ No caso das PTEs isto é altamente desejado, pois o interesse é utilizar estas enzimas em ambientes potencialmente agressivos a proteínas, tais como solos e ambientes aquáticos contaminados por organofosforados. Entre as estratégias mais promissoras estão a mutagênese de resíduos de aminoácidos específicos ou a substituição de cofatores, tais como, os metais presentes no sítio ativo.

Assim, os avanços em biotecnologia estrutural tem permitido o desenvolvimento de novas aplicações para enzimas em vários campos. Podemos, portanto, enumerar uma lista de algumas funções onde às enzimas atuam¹⁴, por exemplo: (i) em remediação biológica, (ii) na transformação de poluentes em compostos de baixo peso molecular, (iii) como biossensores utilizados para monitorar níveis de poluição ambiental e (iv) como bioindicadores de água e qualidade do solo¹⁴. De particular interesse, estudos e novas tecnologias têm sido desenvolvidos, para a desintoxicação e detoxificação de OFs para aproveitar as excelentes velocidades de hidrólises de fosfotriesterases. Nesta linha de ação o CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*), na Austrália desenvolveu um processo de produção para fabricar quantidades comerciais da fosfotriesterase *OpdA* para propósitos de biorremediação, sob o nome comercial de *Landguard*TM. O produto foi utilizado com sucesso em empreendimentos agrícolas na Califórnia e também está sendo testado em outras aplicações. Novas funções para, *Landguard*TM tem sido estudadas onde é diretamente

adicionado à água contaminada. Contudo, embora eficaz e simples, na prática, a enzima é perdida após a sua aplicação⁵³.

A imobilização de enzimas oferece vantagens em relação à aplicação direta sobre os OFs e tem atraído interesse considerável para aplicações industriais⁵³. Quando imobilizados em superfícies sólidas, as enzimas podem ser convenientemente recuperadas da solução ao final do processo, permitindo o uso repetido e custos operacionais reduzidos. Além disso, as enzimas imobilizadas geralmente exibem maiores resistências a temperatura e tolerância a solventes orgânicos. Na figura 1.13 mostra-se a imobilização da fosfotriesterase sobre tecidos de poliéster dentro de células bacterianas.

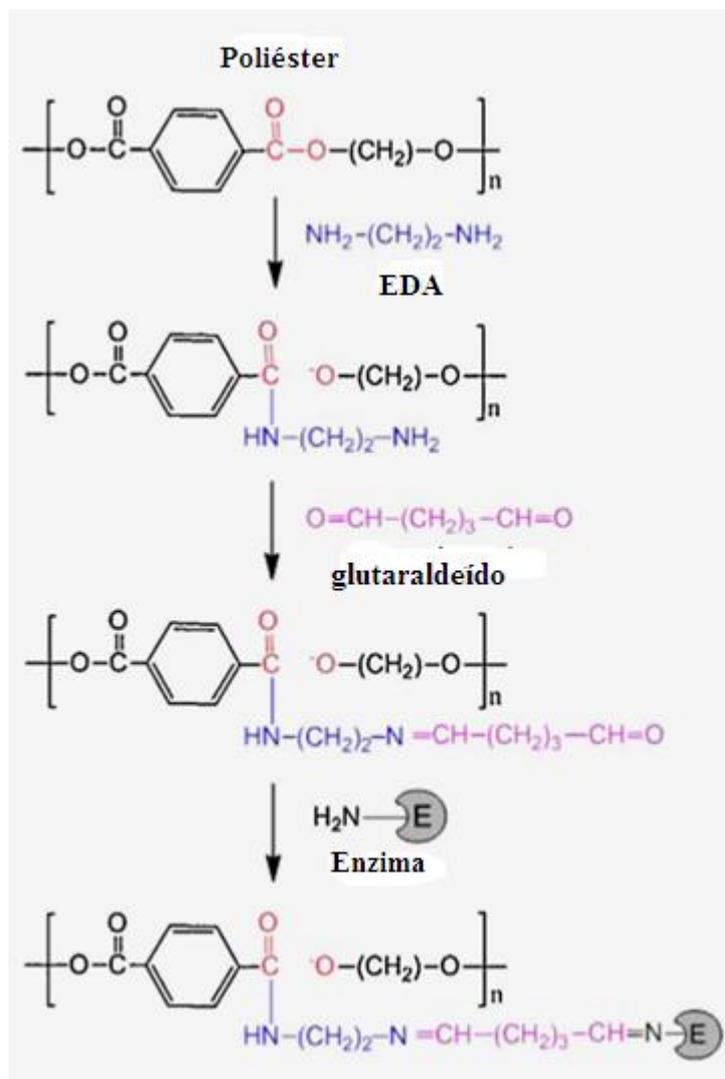


Figura 1.13: Visão geral do procedimento de imobilização covalente de fosfotriesterases. Os tecidos de poliéster são ativados com EDA para introduzir grupos de amina livres e a enzima é ligada covalentemente usando o reticulante glutaraldeído. Figura adaptada da referência.⁵³

Estes novos conhecimentos sobre a atividade de centros metálicos enzimáticos sobre OFs, portanto, estão possibilitando o desenvolvimento de novos materiais para sua catálise heterogênea, como o uso de materiais apresentando metais adsorvidos. Por exemplo, estudos da descontaminação por paraoxon usando nanopartículas de óxido de cério (CeO_2).¹⁷ Outros estudos relatam a descontaminação e degradação de OFs usando óxidos metálicos como

Zr(OH)₄, Ge⁴⁺ dopado com TiO₂, CuO e ZnO.¹⁷ A figura 1.14 apresenta um modelo para este tipo de catálise usando óxidos de metal sobre paraoxon.

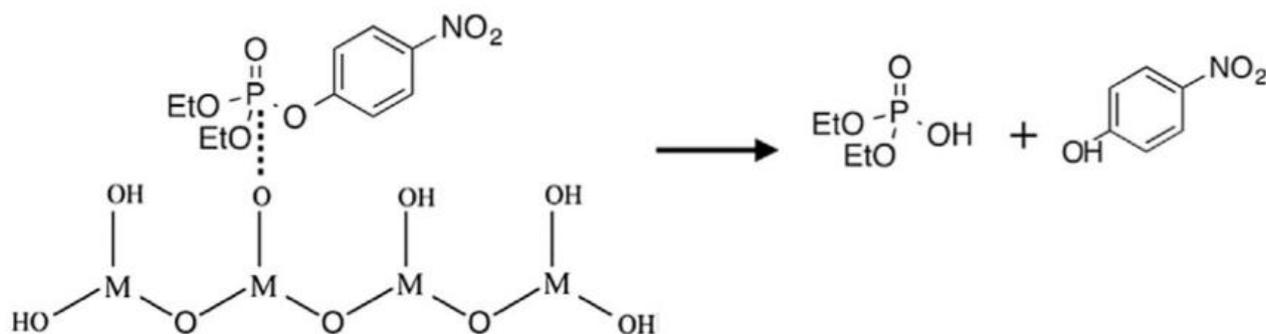


Figura 1.14: Degradação catalítica de paraoxon com um óxido de metal genérico (MO). Retirado de Referência.¹⁷ Os produtos de degradação são: fosfato de dietila e p-nitrofenol.

A capacidade das enzimas PTE para quebrar os OFs de forma eficiente, portanto, de forma geral provoca interesse significativo na comunidade médica e científica. Os tratamentos para intoxicação por OFs usando as drogas anti-colinérgicas, como atropina associadas com oximas para a reativação AchE geralmente são eficientes contra uma dose letal.¹⁸ No entanto, não aliviam as complicações pós-exposição que podem incluir distúrbios nervosos, danos gastrointestinais, dano no rim e no fígado, possíveis defeitos congênitos em mulheres grávidas ou o aparecimento de câncer. Como alternativa pesquisadores médicos e cientistas de diversas áreas estão investigando enzimas como sequestradores naturais (bioscavengers) para uso em tratamentos profiláticos e terapêuticos, e neste quadro incluem-se as PTEs.¹⁸

Especificamente, nesta seção destacou-se uma pequena apresentação do potencial de metalohidrolases dependentes de íons metálicos na degradação de OFs, incluindo pesticidas, inseticidas e agentes nervosos. No entanto, suas atividades catalíticas e a determinação de

seus mecanismos enzimáticos de reação precisam ainda ser melhor estudados. É necessário, portanto, uma compreensão mais profunda do mecanismo de hidrólise enzimática por *pdPTE* que tragam novas ideias para os processo de biorremediação de OFs.

1.5 Importância e Desafios para a Química Teórica Computacional Enzimática

Em geral, as enzimas podem adotar uma variedade de papéis no meio ambiente, como agentes (isolados, celulares ou imobilizados), catalisando a transformação e/ou a degradação de poluentes ao meio ambiente, ou como ferramentas confiáveis e sensíveis para detectar e medir a quantidade e concentração de poluentes antes, durante e após o processo de degradação. Os métodos computacionais fornecem possibilidades eficientes para investigar a atividade enzimática, com informações detalhadas sobre os processos centrais de catálise. Por exemplo, simulações computacionais por modelagem molecular usando métodos híbridos envolvendo mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM)⁵⁴ confirmaram o mecanismo de reativação da AChE.⁴³

A PTE de *Sulfolobus solfataricus* (SsoPox), um organismo que vive em fontes termais, apresenta na sua superfície um grande número de pontes salinas envolvidas em uma rede complexa de interações. Esta característica permite que esta enzima apresente uma temperatura de desnaturação de 106 °C.⁵⁵ Contudo, à temperatura ambiente, SsoPox é cerca de 10⁴ vezes menos ativa do que PTE.⁵⁵ Neste sentido, a mutagênese de resíduos de aminoácidos neutros da superfície de PTE por outros iônicos poderia ser uma forma de construir uma rede de pontes salinas que aumentaria a estabilidade proteica. Experimentalmente, este processo pode ser tedioso e caro, visto que envolve múltiplas etapas desde a construção do mutante até o teste de sua atividade e estabilidade. A utilização de estudos computacionais pode ser um atalho nesta busca, visto que estudos de dinâmica

molecular (DM)⁵⁶ em diferentes temperaturas poderiam oferecer em menor tempo e custo uma gama maior de informações com relação à estabilidade proteica.

As funções das biomoléculas dependem fundamentalmente da sua estrutura e dinâmica. Portanto, descrever adequadamente o perfil energético de biomoléculas é um pré-requisito para qualquer análise mecanística significativa ou trabalho de planejamento racional de fármacos. Devido à importância de amostragem adequada do espaço conformacional para biomoléculas, os campos de força clássicos provavelmente continuarão sendo a forma dominante de função potencial para o futuro próximo devido à sua eficiência computacional. Contudo, a parametrização de campos de força clássicos nem sempre é direta e muitas vezes é considerado como "uma arte" na literatura teórica computacional.^{54,57,58}

A enzimologia computacional pode ser definida de forma ampla como o estudo de enzimas e seus mecanismos de reação por meio de modelagem molecular e simulação computacional.^{59,60} Este campo amadureceu rapidamente nos últimos anos e cada vez mais experimentos computacionais de enzimologia estão colaborando para explicar dados experimentais e fornecendo informações de modelagem para guiar de forma mais adequada os experimentos. Uma série de diferentes tipos de simulações provou serem úteis em enzimologia computacional. Métodos (QM/MM)⁵⁴ combinando mecânica quântica/mecânica molecular são utilizados neste campo desde o trabalho pioneiro de Warshel e Levitt em 1976, que culminaram no prêmio Nobel de 2013 em química. Desde então o desejo de modelar as reações químicas enzimáticas tem sido uma força motriz importante no desenvolvimento de métodos QM/MM.^{42,54}

Sob o ponto de vista teórico, o estudo de processos reativos envolvendo enzimas contendo íons metálicos em sua estrutura e na presença do meio solvente representa

atualmente uma área de fronteira dentro da Química Teórica/Computacional. Estes processos apresentam inúmeros desafios e peculiaridades metodológicas, a saber:

(a) A presença de metais de transição (que possuem elevado número atômico, orbitais d , f etc.) em algumas enzimas faz com que efeitos relativísticos (usualmente não levados em consideração no tratamento teórico de sistemas orgânicos), sejam devidamente tratados.

(b) O sinergismo presente nas ligações M-L (doação e retrodoação de densidade eletrônica), requer o uso de métodos que levem em consideração efeitos de correlação eletrônica dinâmica, que demandam um elevado custo computacional.

(c) Diferentes multiplicidades de spin que os sítios metálicos possam apresentar nos sistemas de camadas eletrônicas abertas e/ou que venham a mudar seu estado de oxidação durante a reação química.

(d) A inexistência de campos de força clássicos (frequentemente utilizados na biofísica computacional) que possam tratar sistemas contendo metais de transição e fenômenos de natureza quântica como, por exemplo, o citado no item (c).

(e) Devido ao tamanho dos sistemas enzimáticos e o elevado número de graus de liberdade, deve-se ajustar uma metodologia teórica adequada para o tratamento destes sistemas (utilizando modelos) visando obter uma estratégia que propicie uma precisão química aceitável, com um esforço computacional compatível.

(f) O uso de simulação híbrida QM/MM requer o uso e/ou desenvolvimento de um esquema computacional adequado para fazer a conexão entre as regiões descritas por mecânica quântica (QM) e por mecânica molecular (MM).

(g) Do apresentado no item (f), situações onde a conexão entre essas duas regiões envolve uma ligação covalente faz-se necessário o uso e/ou desenvolvimento de um esquema computacional ainda mais elaborado.

Por exemplo, muitos sistemas enzimáticos são formados por metais de transição no sítio ativo, e que são, portanto, cofatores catalíticos exclusivos em muitas metaloenzimas e potenciais sistemas a serem mimetizados. O acoplamento complexo de múltiplas rotações nos diferentes centros metálicos leva a estados eletrônicos densamente espaçados que são difíceis de descrever usando uma função de onda de determinante único.⁶¹ Assim sendo, embora os cálculos DFT de simetria quebrada⁶¹ tenham sido usados efetivamente para investigar muitos problemas mecanísticos nestes sistemas, é difícil avaliar a confiabilidade quantitativa dos resultados. Desenvolvimentos recentes em metodologias para a parte QM⁵⁴ que visam sistemas fortemente correlacionados, tais como o grupo de renormalização da matriz de densidade (DMRG)⁶², e a teoria da transformada canônica⁶³ tornou possível tratar clusters contendo metais com uma descrição mais rigorosa sobre efeitos de acoplamento e de degeneração, fornecendo novos conhecimentos sobre os níveis de energia dos estados eletrônicos. Esses métodos, entretanto, permanecem longe de ser simples e seu custo computacional é muito alto. Remover estes entraves é essencial antes que esses métodos possam ser rotineiramente aplicados para analisar a energia e mecanismos de processos bioquímicos.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivos Gerais

Em decorrência do desenvolvimento e considerável progresso dos modelos teóricos e técnicas computacionais fundamentadas na Mecânica Quântica e técnicas de simulação computacional clássicas, aliado ao desenvolvimento de hardware e processos de simulação

em paralelo (CPU e GPU),^{64,65} tem-se possibilitado o estudo da estrutura, dinâmica, reatividade e cinética de processos envolvendo macromoléculas biológicas a um nível sem precedentes. Entretanto, os estudos teóricos dos processos reativos envolvendo sistemas macromoleculares em solução representam um enorme desafio. Desta forma, este projeto de doutorado tem como objetivo geral a aplicação de técnicas modernas de simulação computacional híbrida QM/MM,⁵⁴ em conjunto com métodos modernos da Teoria do Funcional de Densidade (DFT),⁶⁶ Dinâmica Molecular Clássica (DM)⁵⁶ e Docking Molecular,⁶⁷ para o estudo dos sistemas enzimáticos de fosfotriesterases (PTEs) atuando em reações de degradação enzimática de compostos organofosforados.^{18,42,54} Nosso intuito é o de se obter um entendimento detalhado das complexas interações enzima-substrato existente nestes sistemas bem como entendermos o mecanismo de atuação destas enzimas, os efeitos do meio solvente sobre a estrutura, reatividade, e propriedades termodinâmicas.

1.6.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho tem como objetivo central o estudo teórico do mecanismo de ação enzimática envolvida no processo de degradação de compostos organofosforados pelas fosfotriesterases (PTEs), em especial o triéster dietil *p*-nitrofenil fosfato (paraoxon). Temos, assim, como objetivos específicos: i) o estudo da reação de hidrólise do paraoxon em solução aquosa. Com este estudo será possível através de comparação entre as barreiras de energia de ativação mostrar a eficiência catalítica das PTEs; ii) dentro da temática de degradação de compostos organofosforados, também iremos investigar o mecanismo de hidrólise do triéster de fosfato paraoxon utilizando a fosfotriesterase *pd*PTE. Em um primeiro momento o sistema enzimático será estudado utilizando modelos contendo o sítio ativo bimetálico de Zn^{2+}/Zn^{2+} e Cd^{2+}/Cd^{2+} de PTE, e os aminoácidos mais próximos da primeira esfera de coordenação dos metais de transição; iii) avaliar a influência de mudanças conformacionais nas

fosfotriesterases de *Pseudomonas diminuta* (pdPTE) e na reação de hidrólise de compostos organofosforados: triésteres de fosfato. Nesta etapa estudaremos a dinâmica das proteínas em solução, utilizando técnicas baseadas na dinâmica molecular clássica (DM). O efeito da dinâmica da cadeia polipeptídica na interação com os compostos organofosforados será avaliado através da simulação do complexo enzima-substrato. Nesta etapa em virtude da presença dos metais de transição no sítio ativo e do resíduo de aminoácido Lys169 não padrão, processos de parametrização de campos de força clássicos serão realizados para os estudos de dinâmica molecular das enzimas em solvente explícito.

1.7 Referências Bibliográficas

- (1) Castro, A. A.; Assis, L. C.; Silva, D. R.; Corrêa, S.; Assis, T. M.; Gajo, G. C.; Soares, F. V.; Ramalho, T. C. *Microbiology* **2017**, 3, 108-135.
- (2) Wanderlind, E. H.; Medeiros, M.; Souza, B. S.; Fiedler, H. D.; Nome, F. *Rev. Virtual Quim.* **2014**, 6, 632-652.
- (3) "Organophosphorus Compound." McGraw-Hill Dictionary of Scientific & Technical Terms, 6E. 2003. The McGraw-Hill Companies, Inc. 9 Jan. **2018**.
- (4) Kittredge, J. S.; Roberts, E. *Science* **1969**, 164, 37-42.
- (5) Horsman, G. P.; Zechel, D. L. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 5704-5783.
- (6) Hemelsoet, K.; Van Durme, F.; Van Speybroeck, V.; Reyniers, M.-F.; Waroquier, M. J. *Phys. Chem. A* **2010**, 114, 2864-2873.
- (7) Nguyen, M.; Al-Abdul-Wahid, M.; Fontenot, K.; Graves, E.; Chang, S.; Condon, B.; Grimm, C.; Lorigan, G. *Molecules* **2015**, 20, 11236-11256.

- (8) Kamerlin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. *Quart. Rev. of Biophys.* **2013**, 46, 1–132.
- (9) Li, J. N.; Liu, L.; Fu, Y.; Guo, Q. X. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 4453–4462.
- (10) Jang, Y. J.; Kim, K.; Tsay, O. G.; Atwood, D. A.; Churchill, D. G. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 5345–5403.
- (11) Londres, F.; *Agrotóxicos no Brasil*, **2011**.
- (12) Silva, N. A. *Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil-paration e profenofós por Fungos de origem marinha*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, IQSC, **2013**.
- (13) Jang, Y. J.; Kim, K.; Tsay, O. G.; Atwood, D. A.; Churchill, D. G. *Chem. Rev.* **2015**, 115, PR1–PR76.
- (14) Schenk, G.; Matteen, I.; Ng, T. K.; Pedroso, M. M.; Mitic, N.; Jr, M. J.; Marques, R. F. C.; Gahan, L. R.; Ollis, D. L. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 317, 122–131.
- (15) Ely, F.; Hadler, K. S.; Gahan, L. R.; Guddat, L. W.; Ollis, D. L.; Schenk, G. *Biochem. J.* **2010**, 432, 565–573.
- (16) Benschop, H. P.; Dejong, L. P. A. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 368–374.
- (17) Salerno, A.; Devers, T.; Bolzinger, M. A.; Pelletier, J.; Josse, D.; Briançon, S. *Chem. Biol. Inter.* **2017**, 267, 57–66.
- (18) Iyer, R.; Iken, B. *Biochem. Engnee. Jour.* **2015**, 94, 134–144.
- (19) Wille, T.; Scott, C.; Thiermann, H.; Worek, F. *Biocat. Biotrans.* **2012**, 30, 203–208.
- (20) Cremllyn, R. J. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **1991**.

- (21) Camacho, J. A.; Diaz, G. A.; Riquez, M. D.; Jurado, L. B.; Jimenez, J. M.; Quesada, J. *L. Rev. Clín. Españ.* **1995**, 195, 1-623.
- (22) Daumann, L. J.; Gahan, L. R.; Comba, P.; Schenk, G. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 7669–7681.
- (23) Domingos, J. B.; Longhinotti, E.; Machado, V. G.; Nome, F. *Química Nova*, **2003**, 26, 745-753.
- (24) Petronilho, E. C.; Figueroa-Villar, J. D. *Rev. Virtual Quim.* **2014**, 6, 671-686.
- (25) Singh, B. K.; Walker, A. *FEMS Microb. Rev.* **2006**, 30, 428-471.
- (26) Kirby, A. J.; Mora, J. R.; Nome, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1834, 454-463.
- (27) Lum, R. C.; Grabowski, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8619-8627.
- (28) Mitchell, M. L.; Tian, F.; Lee, L. V.; Wong, C. H. *Ang. Chem. Inter. Ed.* **2002**, 41, 3041-3044.
- (29) Scalan, T. S.; Reid, R. C. *Chem. & Biol.* **1995**, 2, 71-75.
- (30) Mitic, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3338-3363.
- (31) Wong, K. Y.; Gao, J. *Biochemistry*, **2007**, 46, 13352-13369.
- (32) Lassila, J. K.; Zalatan, J. G.; Herschlag, D. *Annu Rev. Biochem.* **2011**, 80, 669–702.
- (33) Tarrat, N. *J. Mol. Struc.: THEOCHEM* **2010**, 941, 56–60.
- (34) Duarte, F.; Barrozo, A.; Aqvist, J.; Williams, N. H.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 10664–10673.

- (35) Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Nome, F. *Can. J. Chem.* **2015**, 93, 422-427.
- (36) Ferreira, D. E. C.; Boldt, I. S.; De Almeida, W. B.; Rocha, W. R.; Nome, F. *Comput. Theor. Chem.* **2014**, 1043, 5-12.
- (37) Pereira, E. S.; Da Silva, J. C. S.; Brandão, T. A. S.; Rocha, W. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 18255-18267.
- (38) Kamerlin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. *Q. Rev. Biophys.* **2013**, 46, 1-132.
- (39) Kirby, A. J.; Nome, F. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1806-1814.
- (40) Kamerlin, S. C. L.; Wilkie, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2098-108.
- (41) Pabis, A.; Duarte, F.; Kamerlin, S. C. L. *Biochemistry* **2016**, 55, 3061-3081.
- (42) Purg, M.; Elias, M.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 17533-17546.
- (43) Van der Kamp, M. W.; Mulholland, A. J. *Biochemistry* **2013**, 52, 2708-2728.
- (44) Szinicz, L. *Toxicology* **2005**, 214, 167-181.
- (45) Perezgasga, L.; Sanchez-Sanchez, L.; Aguila, S.; *et. al.* *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 166, 1236-1247.
- (46) Shim, H.; Hong, S. B.; Raushel, F. M.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 17445-17450.
- (47) Benning, M. M.; Shim, H.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry*, **2001**, 40, 2712-2722.
- (48) Koča, J.; Zhan, C. G.; Rittenhouse, R. C.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 817-826.

- (49) Dumas, D. P.; Raushel, F. M. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 21498-21503.
- (50) Aubert, A. D.; Li, Y.; Raushel, F. M. *Biochemistry* **2004**, 43, 5707-5715.
- (51) Jackson, C. J.; Foo, J. L.; Kim, H. K.; Carr, P. D.; Liu, J. W.; Salem, G.; Ollis, D. L. *Jour. Mol. Biol.* **2008**, 375, 1189-1196.
- (52) Aubert, S. D.; Li, Y.; Raushel, F. M. *Biochemistry* **2004**, 43, 5707-5715.
- (53) Gao, Y.; Truong, Y. B.; Cacioli, P.; Butler, P.; Kyratzis, I. L. *Enzy. Microb. Techn.* **2014**, 54, 38-44.
- (54) Cui, Q. *J. Chem. Phys.* **2016**, 145, 140901-1409012.
- (55) Del Vecchio, P.; Elias, M.; Merone, L.; Graziano, G.; Dupuy, J.; Mandrich, L.; Carullo, P.; Fournier, B.; Rochu, D.; Rossi, M.; Masson, P.; Chabriere, E.; Manco, G. *Extremophiles*, **2009**, 13, 461-470.
- (56) Li, P.; Merz, K. M. Jr. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 1564-1686.
- (57) Li, P.; Song, L. F.; Merz, K. M. Jr. *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11, 1645-1657.
- (58) Li, P.; Merz, K. M. Jr. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, 56, 599-604.
- (59) Frushicheva, M. P.; Mills, M. J. L.; Schopf, P.; Singh, M. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 56-62.
- (60) Fuxreiter, M.; Mones, L. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 34-41.
- (61) Ferreira, D. E. C. *Estudo Teórico de Modelos Biomiméticos para a Hidrólise de Ésteres Fosfóricos*. Tese Doutorado, Departamento de Química, UFMG, **2011**.
- (62) Chan, G. K. L.; Sharma, S. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, 62, 465-481.

(63) Yanai, T.; Kurashige, Y.; Neuscamman, E.; Chan, G. K. L. *J. Chem. Phys.* **2010**, 132, 024105-024109.

(64) Cheatham, T. E. III.; Case, D. A. *Biopolymers* **2013**, 99, 969-977.

(65) Salomon-Ferrer, R.; Goetz, A. W.; Poole, D.; Grand, S. L.; Walker, R. C. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 3878-3888.

(66) R. G. Parr and W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, **1989**.

(67) Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, 31, 455-461.

Capítulo 2: Fundamentos Teóricos

2.1 Modelagem Computacional

Os modelos teóricos em química têm por objetivo descrever a estrutura molecular e as propriedades químicas, isto é, ligações químicas, fenômenos espectrais, reatividade molecular, entre outros, dependentes por sua vez de movimentos e interações entre núcleos e elétrons que constituem as moléculas. Os elétrons são partículas cujo comportamento em átomos e moléculas não pode ser descrito satisfatoriamente pelos princípios da mecânica clássica. Novas teorias foram necessárias, por exemplo, para explicar os comportamentos observados através de experimentos usando a radiação eletromagnética sobre a matéria.¹

A modelagem molecular emprega formalismos matemáticos e aproximações físicas, para construir modelos e expressões numéricas para explorar as estruturas e propriedades de moléculas e materiais,¹ que são implementadas através de códigos computacionais nos programas de mecânica molecular e química quântica. As metodologias vão desde os métodos mais rigorosos e, portanto, computacionalmente mais caros, conhecidos como métodos de primeiros princípios *ab initio*, até os menos custosos computacionalmente, e eventualmente menos detalhados, conhecidos como “métodos semi-empíricos”. Os métodos semi-empíricos usam funções aproximadas ou “efetivas” para descrever as forças entre as partículas e para resolver as equações quânticas, enquanto os *ab initio* são baseados na solução da equação de Schrödinger do sistema sem aproximações para resolver as equações para descrever um determinado sistema. No entanto, cálculos *ab initio*, para sistemas reacionais de interesse prático, que possuem um número elevado de átomos, continuam praticamente proibitivos. Hoje em dia o número máximo de átomos que podem ser tratados com métodos quânticos, por exemplo, na Teoria do Funcional de Densidade (DFT), gira em torno de aproximadamente 1000. Neste sentido, para o tratamento de sistemas com dezenas de milhares de átomos,

podemos empregar os métodos semi-empíricos, de dinâmica molecular clássica (DM), química quântica/mecânica molecular (QM/MM) e QM/MM/DM. Portanto, ao definirmos a metodologia a ser utilizada em um determinado estudo, deve-se ter em mente os recursos computacionais acessíveis, e a necessidade ou não, de se tratar um sistema em um nível elevado de teoria.

Com o advento e consolidação da mecânica quântica, surgiram os métodos para a descrição da estrutura eletrônica nos átomos e moléculas. Estes métodos, geralmente, adotam o procedimento do campo autoconsistente (SCF – self-consistent field),² no qual uma suposição inicial sobre a combinação linear dos orbitais atômicos é sucessivamente refinada até que a solução não se altere mais após a repetição de um ciclo de cálculo. O tipo mais comum de cálculo *ab initio* é baseado no método de Hartree-Fock (HF),² no qual um elétron sofre o efeito de outros, através de um potencial médio (uma distribuição contínua de carga), construído considerando às repulsões eletrônicas. Métodos convencionais utilizados para se tratar a correlação eletrônica, usualmente chamados de métodos pós-HF são, por exemplo: a teoria de perturbação de Møller-Plesset (MP_n, onde *n* é a ordem da correção),³ o método da ligação de valência generalizado (GVB),^{4,5} o campo autoconsistente multiconfiguracional (MCSCF),⁶ a interação de configuração (CI)⁷⁻¹⁰ e a teoria de “coupled cluster” (CC).¹¹⁻¹³

Nas últimas décadas a DFT se tornou uma alternativa aos métodos *ab initio* tradicionais, por se constituir um método bastante interessante para a área de estrutura eletrônica, onde a energia total é expressa em termos da densidade eletrônica total $\rho = |\psi|^2$ em vez da função de onda ψ .¹⁴⁻²⁰ Quando a equação de Schrödinger é expressa em termos de ρ , ela se torna um conjunto de equações chamadas de Kohn-Sham,²¹ as quais são resolvidas iterativamente, partindo-se de uma estimativa inicial e continuando-se até que a solução seja autoconsistente.

Os métodos e técnicas utilizados na química computacional podem ser muito úteis para entendermos mecanismos pelos quais as enzimas atuam, e como isso ocorre a nível atômico, uma vez que reduz os custos e o tempo de pesquisa.¹¹ Entre os métodos mais utilizados, podemos citar o Docking Molecular (que calcula a melhor orientação de ligantes no sítio ativo de uma proteína), a Dinâmica Molecular (DM) e os métodos híbridos QM/MM (quantum-mechanics/molecular-mechanics), que podem ser usados para investigar a nível molecular as interações entre ligantes e proteínas.⁷

O estudo de reações enzimáticas por modelos de “cluster” químicos, tratados de forma quântica, é também um método poderoso para investigar as reações enzimáticas.³⁰ Nas últimas duas décadas, um grande número de sistemas foi estudado e uma grande riqueza de detalhes mecanísticos foi desenvolvida usando esta técnica.³⁰ Os exemplos do estado da arte para a modelagem nas enzimas são apresentados em um trabalho de revisão com uma seleção das principais influências na literatura usando modelos de cluster QM, modelos QM/MM e modelos QM/MM/MD.³⁰ Nesta revisão os autores propõem um protocolo computacional, destinado a orientar os principiantes através da quantidade variada de escolhas metodológicas que são necessárias para o sucesso do estudo das reações químicas em ambientes enzimáticos complexos.

Nesta linha os aspectos fundamentais dos métodos teóricos DFT, DM, e QM/MM, que foram utilizados nesta tese, estão discutidos neste capítulo de forma sucinta. Para informações adicionais o leitor interessado pode recorrer às referências bibliográficas contidas ao longo do texto, bem como a outras fontes na literatura correlata.

2.2 Teoria do Funcional de Densidade - DFT

A grandeza física fundamental na DFT é a densidade eletrônica, $\rho(r)$, que descreve a probabilidade de distribuição de carga em uma molécula. Ela deve ser adotada como o “observável” mecânico-quântico. O uso da densidade eletrônica, $\rho(r)$, como variável básica na descrição de um sistema eletrônico remonta o início do século XX, quando Drude aplicou a teoria dos gases a um metal, considerando como um gás homogêneo de elétrons, para desenvolver a sua teoria sobre condução térmica e elétrica.²³ A densidade eletrônica, $\rho(r)$, como variável básica foi rigorosamente legitimada com a publicação de dois teoremas por Hohenberg e Kohn, os quais fornecem os fundamentos da teoria do funcional de densidade moderna. Eles apresentam uma reformulação da mecânica quântica, que não utiliza funções de onda.²³ Por este formalismo a solução exata da equação de Schrödinger de N elétrons e $3N$ variáveis para a função de onda (excluindo-se o spin) é escrita e resolvida como um problema onde o objeto de fundamentação reside na densidade eletrônica total $\rho(r)$ do sistema.²⁴ Assim, a energia para o estado fundamental é mínima para a densidade exata, seguindo o princípio variacional.

2.3 – Fundamentos da Teoria do Funcional da Densidade – DFT

Anteriormente a implementação e o funcionamento, nos códigos de química quântica, da Teoria do Funcional da Densidade, trabalhos desenvolvidos de forma independente por Thomas (1927) e Fermi (1928), consideravam todos os termos componentes da energia como função de $\rho(r)$. Esta prévia formulação ficou conhecida como aproximação do Funcional de Thomas-Fermi (TF). Estruturado sob artifícios estatísticos aproximava a distribuição de um gás de elétrons para compor o funcional da energia.

A energia total como funcional da densidade $E[\rho]$ pelo modelo de TF pode ser escrita na forma:

$$E[\rho] = \lambda \int \rho^{5/3} d^3r - e \int \rho v_N d^3r - \frac{1}{2} e \int \rho v_e d^3r + U_{NN} \quad (2.1)$$

Sendo $\lambda = (3h^2/10m)(3/8\pi)^{2/3}$, v_N o potencial de interação nuclear e v_e o potencial devido a interação dos elétrons. Os quatro termos da direita na expressão, correspondem, respectivamente, à energia cinética dos elétrons, a energia de interação elétron-núcleo, a energia de interação elétron-elétron ou termo de Hartree e o termo U_{NN} a energia de interação núcleo-núcleo. Esse modelo foi melhorado por Dirac para incluir, em adição, a energia de troca (termo de exchange) para um gás de elétrons.²⁵ De maneira que podemos reescrever o funcional de energia $E[\rho]$ de Thomas-Fermi-Dirac (TFD) na forma:

$$E[\rho] = \lambda \int \rho^{5/3} d^3r - e \int \rho v_N d^3r - \frac{1}{2} e \int \rho v_e d^3r + U_{NN} - \frac{3}{4} e^2 \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \int \rho^{4/3} d^3r \quad (2.2)$$

Entretanto, mesmo reproduzindo e sendo capaz de explicar muitas propriedades os termos da equação 2.2 são insuficientes e muito simples para elucidar a estrutura quântica de camadas dos átomos ou ligações químicas. Para contornar este problema e ampliar sua gama de uso, Hohenberg e Kohn em 1964, publicaram dois teoremas alicerçando as bases da Teoria do Funcional da Densidade, ao tornar o uso da densidade eletrônica $\rho(r)$ entidade de variável básica para o formalismo e fundamentos da DFT.²³

2.4 – Teoremas de Hohenberg e Kohn – (HK)

Para tratamos um sistema constituído por M núcleos e N elétrons – na aproximação de Born-Oppenheimer, definimos um Hamiltoniano não relativístico,²⁶ em unidades atômicas, na forma:

$$\hat{H}_{sc} = -\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_A^M \sum_i^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{|r_i - r_j|} + \sum_{B < A}^M \sum_A^M \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|} \quad (2.3)$$

sendo que i e j representam elétrons; A e B os núcleos atômicos; r_i e R_A , as coordenadas, respectivamente, do elétron i e do núcleo A ; e Z_A o número atômico do átomo A . Nesta equação os termos do lado direito são: o primeiro termo o operador energia cinética T , o segundo termo o potencial externo U , o terceiro termo o operador de repulsão elétron-elétron V_e , que inclui a repulsão Coulombiana e os termos não-clássicos (troca e correlação) e o quarto termo o operador da repulsão nuclear E_{rep} . O termo do potencial externo U relacionado aos elétrons, devido à influência às cargas dos núcleos Z_A , segue na forma:

$$\hat{U} = \sum_i^N \sum_A^M -\frac{Z_A}{|R_A - r_i|} = \sum_i^N v(r_i) \quad (2.4)$$

A densidade eletrônica pode ser expressa pela equação:

$$\rho(r) = \int \dots \int \psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N \quad (2.5)$$

Onde $\psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$ representa a solução para o estado fundamental do Hamiltoniano da equação (2.3).

Logo a energia total, tratando-se a princípio estados não degenerados, pode ser apresentada por:

$$E_0 = \int \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) * \hat{H}_{\text{ao}} \psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N = \langle \psi | \hat{H}_{\text{ao}} | \psi \rangle \quad (2.6)$$

Da equação 2.4, o potencial externo pode ser substituído na equação (2.6). Com isso, devido a propriedades de seus correspondentes operadores, o potencial externo pode ser separado dos termos considerados “universais”, em um funcional trivial da densidade eletrônica. Logo a energia total pode ser definida por:

$$E_0 = \langle \psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (2.7)$$

O primeiro termo na equação 2.7 define o funcional universal, também representado por $F(\rho)$, que é válido e pode ser aplicado a todos os sistemas eletrônicos, uma vez que não dependem do potencial externo. O segundo termo da expressão 2.7 depende do sistema em questão. Desta forma o número de elétrons, N, e o potencial externo sob o qual estes se deslocam, determinam totalmente o Hamiltoniano do sistema de muitos elétrons.

2.5 – Primeiro Teorema

O primeiro teorema de HK estabelece que o potencial externo é um funcional único de $\rho(r)$ além de uma constante aditiva. Assim, demonstra-se que a densidade eletrônica determina o potencial externo e o número de elétrons, N , e conseqüentemente, o Hamiltoniano do sistema.

Sendo a energia do sistema obtida através da resolução da equação de Schrödinger, $\hat{H}_{\text{BO}}\psi = E\psi$, a energia de um sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica $\rho(r)$, ou seja:

$$E = E_v[\rho] \quad (2.8)$$

2.6 – Segundo Teorema

A energia do estado fundamental $E_0[\rho]$ é mínima para a densidade $\rho(r)$ exata,

$$E[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}_e | \psi \rangle \quad (2.9)$$

Maiores detalhes e provas destes dois teoremas estão discutidos e apresentados nas referências.²³⁻²⁵⁻²⁶

Em seu trabalho Hohenberg e Kohn demonstraram que os observáveis mecânico-quânticos, quantidades físicas que podem ser medidas sobre um sistema, são determinadas unicamente por $\rho(r)$, constituindo-se em funcionais da densidade. Porém em seu formalismo a DFT exhibe a existência dos funcionais, não expressando sua forma analítica exata segundo HK. Este problema foi contornado em 1965, por Kohn e Sham²¹, ao proporem um método

para obter-se o funcional da energia exato – o método KS - que subsidiam a possibilidade de realizarmos cálculos DFT. Nesta metodologia considera-se um sistema de elétrons não interagentes com densidade $\rho(r)$, de modo a representarem a densidade do estado fundamental do sistema de elétrons que interagem. Deste modo, trataram o problema da formulação variacional da DFT que reside na atribuição imprecisa do funcional de energia cinética $T(\rho)$. Kohn e Sham observando o fato de que as interações de Coulomb são de longo alcance,²³⁻²⁵ manipularam a equação (2.7), tornando explícita a repulsão elétron-elétron presente no funcional universal $F(\rho)$ e definiu-se uma nova função universal $G[\rho]$, tal que:

$$E_v[\rho] = G[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)v(r)dr \quad (2.10)$$

de forma que o funcional $G[\rho]$ pode ser escrito na forma:

$$G[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2.11)$$

Nesta definição, o termo $T_s[\rho]$ equivale ao funcional de energia cinética do sistema de referência de partículas não interagentes e o termo $E_{xc}[\rho]$ inclui, além da energia de exchange e energia de correlação (não-clássicos) de um sistema interagente com densidade $\rho(r)$, a contribuição para a correção da parte residual da energia cinética, $T[\rho] - T_s[\rho]$, sendo $T[\rho]$ o funcional de energia cinética exata para este sistema de elétrons que interagem explicitamente entre si. Contudo, a fórmula funcional exata para $E_{xc}[\rho]$ não é trivial, e nem mesmo conhecida. Considerando, a v -representatividade e N -representatividade, da densidade eletrônica, Kohn e Sham, apresentaram uma estratégia para o cálculo de estrutura eletrônica de sistemas constituídos de muitos corpos, empregando $\rho(r)$.

Nas equações de KS, utiliza-se um sistema fictício de referência, constituído de elétrons não-interagentes, usando no Hamiltoniano equação (2.12), um potencial local efetivo, $v_{ef}(r)$, equação (2.13), obtido minimizando-se a equação (2.10). Impõem-se a restrição de que as funções de onda de um elétron sejam ortonormais, assim sendo, $\langle \psi_i^{KS} | \psi_j^{KS} \rangle = \delta_{ij}$. A priori estas funções de onda (ψ^{KS}), são obtidas utilizando-se a mesma aproximação empregada no método de Hartree-Fock. Resolvendo-se a equação de Schrödinger de um elétron (2.14), portanto, obtêm-se os orbitais Kohn-Sham (KS).²⁷ As seguintes equações exemplificam partes destas etapas:

$$H^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef}(r) \quad (2.12)$$

$$v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r_1)}{|r-r_1|} dr_1 + v_{xc}(r) \quad (2.13)$$

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef} \right) \psi_i^{KS} = \varepsilon_i \psi_i^{KS} \quad (2.14)$$

onde tem-se na equação (2.13) a derivada funcional da energia de troca-correlação, representada pelo termo:

$$v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (2.15)$$

Através desta metodologia as equações (2.13), (2.14) e (2.15) ilustram o método autoconsistente – KS-SCF (Kohn-Sham – Self Consistent Field). A expressão (2.14) é conhecida como equação de Kohn-Sham (KS) e a equação (2.13), o potencial efetivo de Kohn-Sham. O processo de usar a densidade eletrônica $\rho(r)$ como variável básica nas equações KS, tal qual no método de Hartree-Fock, fornecem equações de um elétron, resolvidas iterativamente, tratando sistemas de muitos elétrons. No método KS, a princípio as equações são exatas, pois carregam totalmente informações sobre os efeitos de correlação eletrônica, e suas soluções asseguram a resolução exata do problema variacional da DFT. Contudo, na metodologia KS as equações serão exatas mediante o fato do termo de troca-correlação for exato. Nota-se que, para obtermos o potencial de Kohn-Sham, antes se escolhe o funcional de exchange-correlação, $E_{XC}[\rho]$. Sua estrutura é desconhecida e não existe uma maneira sistemática para sua construção nem mesmo tratamento de melhorá-lo. Todavia, existem várias aproximações para a determinação do funcional de troca-correlação como: Aproximação da Densidade de Spin Local (LSDA – Local Spin-Density Approximation), Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA – Generalized Gradient Approximation), funcionais híbridos e meta-GGA.^{23, 25-27}

2.7 Modelagem de Sistemas Enzimáticos pelo Modelo de “Cluster” Usando a DFT

Nos últimos 20 anos, o uso de modelos do sítio catalítico para estudar os mecanismos enzimáticos, o chamado modelo de “cluster”, foi sendo refinado, e passou a ser hoje um caminho estratégico e muito importante para a busca e elucidação de mecanismos e outras propriedades das enzimas.²⁸ Como ferramenta computacional, nas últimas décadas, a DFT tornou-se o método de escolha para simulações enzimáticas, por mostrar bom acordo com observações experimentais e pelo menor custo computacional para tratar os modelos de

“cluster”.²⁹ Os primeiros modelos enzimáticos contendo átomos de metais de transição contemplavam um número pequeno de átomos, em torno de 20. Hoje em dia, os sistemas podem ser tão grandes, podendo chegar a conter 1000 átomos, dependendo do nível de teoria utilizado via cálculos quânticos e dos sistemas investigados. Em particular, o funcional B3LYP³⁰ vem sendo usado extensivamente ao longo dos anos, uma vez que foi observado que fornece um bom equilíbrio, entre velocidade e precisão nos cálculos, em comparação a dados experimentais.³⁰

A ideia básica na metodologia empregando o modelo de “cluster” para enzimas é fazer um recorte de uma parte relevante para o processo enzimático. Assim, o modelo a ser abordado em nível quântico contém uma parte significativa da enzima.^{28,30} No entanto, o modelo contém apenas um número limitado de átomos, tipicamente algumas centenas, em comparação com milhares ou dezenas de milhares ou centenas de milhares que constituem uma enzima. Tal restrição está diretamente ligada à eficiência dos computadores disponíveis e ao método QM selecionado. Assim, a delimitação do sistema e a região a ser truncada é uma das questões mais importantes na modelagem usando a metodologia de “cluster”.²⁸⁻³⁰

Uma modelagem enzimática eficiente deve conter todos os átomos que participam da quebra e formação de ligações químicas, bem como os resíduos responsáveis pela estabilização e ligação do substrato ou pela manutenção de sua configuração ao redor do sítio ativo, e aqueles com interações eletrostáticas substanciais de curto alcance e longo alcance. De forma prática, um modelo QM de “cluster” é construído a partir de estruturas de proteínas obtidas por difração de raios X, se existente e com a melhor resolução possível, ou dados de ressonância magnética nuclear (RMN).^{31,32} A maior parte das estruturas cristalográficas e de RMN de proteínas é depositada no banco de PDB (PDB – Protein Data Bank). Após obter o arquivo PDB contendo as coordenadas da proteína parte-se para a criação do modelo de “cluster”.²⁹ Para isso usa-se programas de visualização como Pymol,³³ VMD,³⁴ ou Chimera,³⁵

para se realizar o recorte e modelar o sistema reacional. Programas computacionais de estrutura eletrônica como Gaussian09³⁶ e Orca,³⁷ são utilizados para a realização dos cálculos quânticos. Na Figura 2.1 mostra-se um estudo sistemático realizado variando-se o tamanho do modelo de “cluster”.

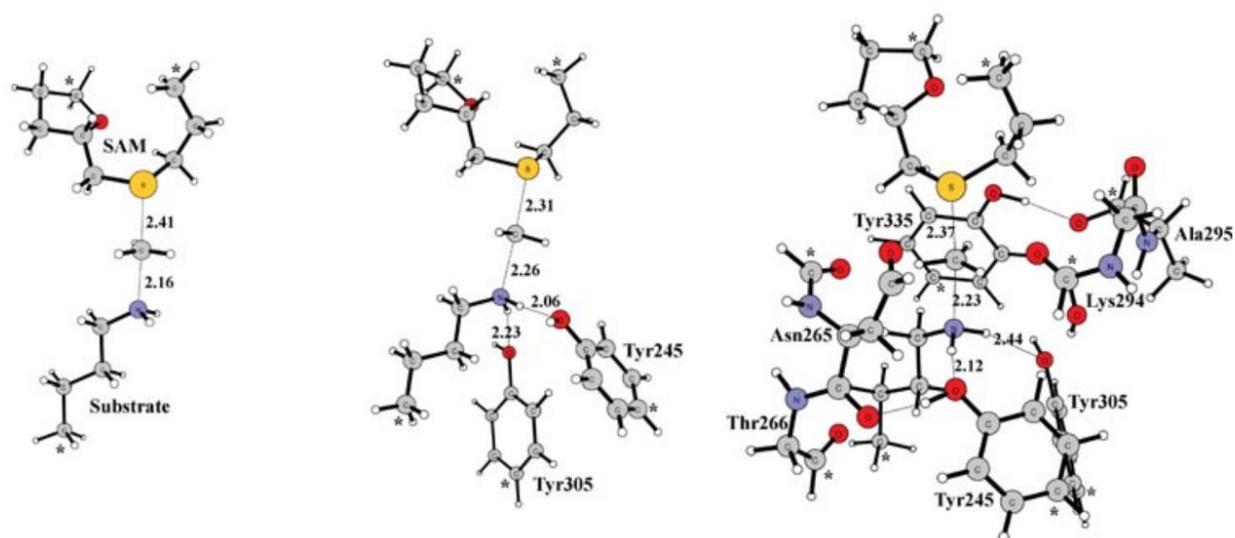


Figura 2.1: Exemplo de investigações por modelos de “cluster”, para o estudo da reação de transferência do grupo metila em histonas por metiltransferase (HKMT). Os asteriscos referem-se a coordenadas de átomos mantidas congeladas nas posições cristalográficas durante o processo de otimização das geometrias. Retirado das referências.^{28,29}

Os efeitos do restante da enzima, não incluídos no modelo, geralmente são tratados por mais duas aproximações no modelo de “cluster”. A primeira está relacionada a influência do efeito estérico que a matriz enzimática provoca no sítio ativo, sendo modelada mantendo-se fixas (congeladas) algumas coordenadas de uma série de átomos em suas posições cristalográficas, tipicamente onde o recorte na enzima é feito.^{28,29} Se o modelo é muito pequeno, o procedimento pode levar a tensões na estrutura que resultam em perfis de energia

incorretos. Modelos maiores geralmente oferecem flexibilidade adequada para acomodar mudanças conformacionais que ocorrem durante a reação e esses modelos reproduzem geralmente bons resultados. Quando se começa a ter modelos próximos aproximadamente de 300 átomos para o “cluster” QM, no entanto, um problema associado a múltiplos mínimos surge, tendo-se a necessidade de ter muito cuidado para garantir que não ocorram movimentos artificiais entre os vários pontos estacionários. Tais eventos podem levar a perfis de energia errados e, finalmente, conclusões equivocadas de mecanismos enzimáticos.

Em estudos recentes isto foi resolvido simplesmente selecionando mais átomos em torno dos pontos de truncamento para permanecer fixo, tipicamente o átomo de carbono e um ou dois dos hidrogênios que substituem os átomos que conectariam o restante da enzima. Portanto, em geral é sempre uma boa ideia para iniciar as investigações mecanísticas com um modelo relativamente pequeno e, seguidamente, ir aumentando-se o tamanho. Desta maneira pode-se observar a estabilidade dos resultados, detectar possíveis erros de mínimos locais, e também se ganha uma visão química sobre os papéis dos vários grupos ao entorno do sítio ativo.²⁸⁻²⁹

A segunda observação na abordagem por modelo de “cluster” é o uso de modelos de solvatação implícitos para racionalizar a influência eletrostática da enzima ao redor do sítio ativo. Este método emprega o “cluster” circundado por um ambiente de contínuo polarizável homogêneo, com uma dada constante dielétrica ϵ , fazendo a função do solvente. Na maioria das aplicações enzimáticas, ϵ tem sido definido como igual a 4.²⁸ No entanto, observações feitas por estudos sistemáticos evidenciaram que o efeito da solvatação implícita satura rapidamente à medida que o tamanho do modelo de “cluster” aumenta e funciona melhor nestas condições. Neste ponto, é importante expressar que se as energias obtidas variarem de forma muito sensível à escolha da constante dielétrica, então, as conclusões envolvendo essas energias devem ser consideradas de pouco valor e fracas. Em geral, as energias de solvatação

são obtidas a partir de cálculos no ponto realizados sobre as geometrias otimizadas na fase gasosa.²⁸⁻³⁰

Nesta linha, outra possibilidade que surge de forma interessante e que tem se tornado possível em virtude do aumento da capacidade de processamento de cálculos e potência dos computadores é o uso de métodos *ab initio* altamente correlacionados para se obter energias mais precisas na abordagem de “cluster”. Através destes cálculos pode-se melhorar os valores obtidos das energias eletrônicas em fase gasosa através de cálculos no ponto e, assim, corrigi-las através de cálculos mais correlacionados.^{38,40} O método de grupo de renormalização da matriz densidade (DMRG),³⁸ e o método DLPNO-CCSD (Domain based local pair natural orbital coupled-cluster method with single and double excitations)³⁹ são duas das possibilidades. Este tipo de procedimento provavelmente se tornará mais frequente no futuro, pois o poder computacional permitirá a tratamento de sistemas cada vez maiores. As energias calculadas são geralmente comparadas aos dados de barreiras experimentais, por meio da teoria clássica do estado de transição, uma aproximação que funciona bem para a maioria das aplicações.⁴⁰

Entretanto, outros cuidados na modelagem ainda tem que ser levados em consideração. Em virtude de sua baixa densidade eletrônica os átomos de hidrogênio usualmente não são resolvidos por cristalografia de raios X. Desta forma, os átomos de hidrogênio devem ser adicionados à estrutura da proteína que se fez o recorte antes do início dos cálculos computacionais. No caso dos resíduos de aminoácidos que podem apresentar diferentes estados de protonação em função do pH do meio, a adição dos átomos de hidrogênio precisa ser especificada e não pode ser efetuada automaticamente.^{28,29} Programas *on line*, como Propka⁴¹ e H++,⁴² são servidores que auxiliam na obtenção e definição dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos nas proteínas em função do pH. Por exemplo, a Figura 2.2 mostra os três possíveis estados de protonação para histidinas.

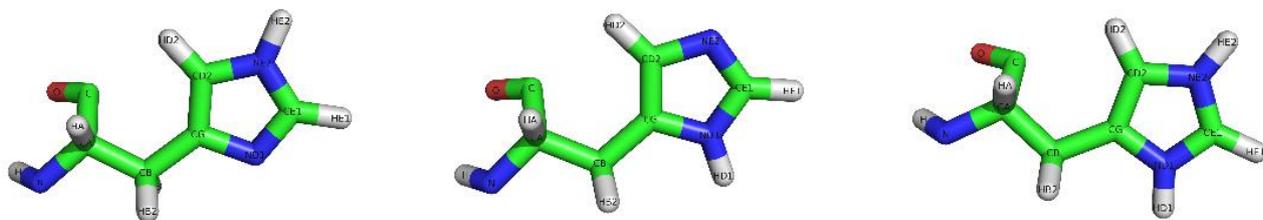


Figura 2.2: Histidina protonada da esquerda para direita nos átomos de nitrogênios: ϵ (épsilon), δ (delta) e em ambas as posições.

Além disso, a incorporação de correções de dispersão empírica (D) dentro da metodologia DFT (DFT-D) tem resultado na melhora de perfis de energia através de sua inclusão por cálculos no ponto, ou na obtenção de geometrias otimizadas de intermediários e estados de transição (TS) de reações enzimáticas.^{30,43,44} Mostram-se, também, casos em que os efeitos de entropia são cruciais e devem ser analisados, por exemplo, quando moléculas de gás participam da reação enzimática. Nestas circunstâncias, a estimativa da entropia é igual à entropia translacional nas moléculas de gás livres.^{45,46} Recentemente, Siegbahn implementou uma maneira de avaliar os efeitos da entropia projetando as coordenadas congeladas da matriz Hessiana.³⁰ Procedimentos análogos já vêm sendo utilizados e desenvolvidos em outros trabalhos utilizando o método de “cluster”.⁴⁷ Através deste procedimento os modos vibracionais das coordenadas congeladas são excluídos e realiza-se uma nova diagonalização da matriz Hessiana e obtem-se uma correção para a energia eletrônica de ponto zero (ZPE), sem a influência das coordenadas congeladas.⁴⁸

Por último, neste breve texto sobre o método de “cluster” segue um comentário final sobre os efeitos de entropia. O procedimento de coordenadas congeladas descrito leva ao aparecimento de algumas pequenas frequências imaginárias (modos normais negativos artificiais), tipicamente na ordem de $<30i \text{ cm}^{-1}$. Na maioria dos casos estes modos

vibacionais imaginários não contribuem para a energia de maneira significativa e podem ser ignorados. Os efeitos entrópicos geralmente são bastante pequenos, exceto em alguns casos muito específicos.^{28,30} Portanto, deve-se ficar atento às conclusões mecanísticas. O processo de projeção da matriz Hessiana além de fornecer uma nova correção para a energia ZPE, elimina estas frequências imaginárias.^{47,48} Assim, em estruturas, por exemplo, de um mecanismo associativo-dissociativo ($A_N + D_N$), no qual temos dois estados de transição, TS1 e TS2, ao realizar este procedimento as únicas frequências imaginárias que prevalecem são as associadas a coordenada de reação investigada no mecanismo enzimático, ou seja, onde estamos tendo a quebra e formação de ligações químicas.

Por último, a adição de resíduos de aminoácidos da segunda esfera de coordenação e moléculas de água explícitas estão se mostrando primordiais para obtenção de uma descrição correta de mecanismos enzimáticos. De modo geral, a metodologia tem sido extremamente bem sucedida e tem contribuído enormemente para a compreensão dos processos catalíticos e o desenvolvimento de novos protocolos experimentais.³⁰

2.8 Dinâmica Molecular (DM)

O estudo da estrutura, reatividade e função de sistemas macromoleculares são hoje um ponto chave na compreensão da biologia, química, física, etc. envolvida em sistemas bioquímicos. A função biológica é baseada em interações moleculares, e estas são consequência de suas interações tridimensionais a nível molecular.⁴⁹ Assim, desde o início das determinações estruturais no início dos anos 50, tem sido contínuos os estudos sobre proteínas, ácidos nucleicos, vírus e demais organismos celulares, que de forma geral, tem contribuído para o aumento do conhecimento de como as estruturas macromoleculares dos organismos vivos foram construídas.⁵⁰ As regras de reconhecimento molecular, tal como

definidas por tais conhecimentos estruturais, compõem a compreensão dos fenômenos biológicos básicos, como mecanismos e regulação enzimática, transporte através das membranas, construção de grandes estruturas, como ribossomos ou capsídeos virais, ou como o DNA é lido e a transcrição é controlada.⁵¹

No entanto, apesar de sua enorme utilidade, as estruturas de proteínas depositadas por difração de raios X, por exemplo, no PDB, fornecem apenas uma visão parcial da estrutura 3D. Tanto as proteínas como os ácidos nucleicos são estruturas com elevadas flexibilidades, e seus movimentos podem desempenhar papel fundamental na sua funcionalidade, pois, por exemplo, as proteínas podem apresentar mudanças significativas de conformação ao executar sua função.⁵² Neste sentido, movimentos internos podem provocar modificações estéricas fora do sítio ativo e que eventualmente desempenham papel essencial nas suas reatividades e papel catalítico.

Atualmente, o estudo computacional de sistemas enzimáticos, por exemplo, envolve uma série de etapas, onde em geral, é necessária a utilização de um conjunto de métodos teóricos para a determinação de propriedades específicas.³⁰ Ou seja, para se realizar um estudo detalhado a nível molecular várias técnicas computacionais podem ser empregadas para estudar sistemas bioquímicos. Dentro das características mais comuns da DM para sistemas biológicos estão a investigação da estabilidade das proteínas, mudanças conformacionais, interação com substratos bem como pode ainda ser utilizada no auxílio ao planejamento racional de novas drogas e na determinação de estruturas de RMN e raios X.^{53,54}

A simulação de dinâmica molecular (DM), desenvolvida pela primeira vez no final dos anos 70, avançou desde inicialmente restrita a centenas de átomos para sistemas com relevância biológica. Portanto, atualmente é possível o estudo de proteínas inteiras em solução com a utilização de solvatação explícita, proteínas embutidas na matriz de membranas ou

grandes complexos macromoleculares como nucleossomas e ribossomos.⁵⁵ As simulações computacionais de sistemas com ~ 50,000-100,000 mil átomos atualmente são rotina, e simulações de aproximadamente 500,000 mil átomos são comuns quando instalações computacionais de processamento de dados apropriadas estão disponíveis. Assim, nas últimas décadas ocorreu um desenvolvimento computacional significativo, bem como grandes avanços nos algoritmos de DM, proporcionando uma maior eficiência das simulações moleculares. Essa melhoria notável é em grande parte uma consequência do uso de computação de alto desempenho (HPC) e a simplicidade do algoritmo de DM.^{56,57}

2.9 Aspectos Básicos de DM

Alguns dos programas mais comuns utilizados nos estudos de DM são AMBER,⁵⁸ CHARMM,⁵⁹ NAMD,⁶⁰ e GROMACS.⁶¹ A metodologia de DM baseia-se nos princípios da Mecânica Clássica, em que cada átomo é considerado como um corpo de massa pontual, cujo movimento é influenciado pelas forças que atuam sobre ele por todos os outros átomos.⁶² Estas forças que atuam em cada corpo são calculadas em cada passo da DM usando campos de força.

Os campos de força são um conjunto completo de potenciais de interação entre os átomos e que determinam a energia total do sistema. Estes modelos matemáticos incluem os potenciais dos termos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e não-ligados (interações de van der Waals e Coulomb). Um modelo de campo de força típico implementado no programa AMBER pode ser descrito através da seguinte equação:⁶³

$$\begin{aligned}
U(\vec{R}) = & \sum_{\text{ligações}} K_r(r - r_0)^2 + \sum_{\text{angulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \\
& \sum_{\text{diédro}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\varphi - \delta)) + \sum_{\text{não-ligados}} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]
\end{aligned} \tag{2.16}$$

Analisando-se esta equação temos que a energia total $U(R)$ do sistema é obtida pela soma das energias dos termos ligados e não ligados. Nesta equação K_r , K_θ e V_n representam as constantes de força de estiramento de ligação química, de deformação angular e o potencial de torção, respectivamente. r , θ e φ são comprimento de ligação, ângulo de ligação e ângulo diédro, e quando estão com subscrito zero representam os valores de equilíbrio para os termos individuais.

No campo de força AMBER, utilizado nesta tese, os termos de estiramento de ligação química e deformação angular são calculados usando equações com potenciais harmônicos descritos por termos quadráticos. Os termos referentes aos potenciais de torção são determinados por expansões em série de Fourier truncadas no sexto termo. As interações de van der Waals são aproximadas pelo potencial 12-6 de Lennard-Jones (LJ). A fórmula de Coulomb é considerada para o cálculo do potencial de interação eletrostático. Os tipos de cargas variam com a versão do campo de força usado, mas para a maioria dos campos de força AMBER as cargas parciais são obtidas usando o método RESP (Restrained ElectroStatic Potential).⁶⁴

Alguns campos de força incluem outros termos com o objetivo de obter um melhor acordo com espectros vibracionais. Por exemplo, termos que melhor especificam as ligações de hidrogênio ou o acoplamento de oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação. Portanto, a escolha do campo de força geralmente depende das propriedades e dos sistemas que serão estudados, sendo um passo muito importante na simulação de DM. No programa

AMBER⁶⁵ existe uma variedade de campos de força, por exemplo, *lipid14* para estudar bicamadas de lipídeos, *GLYCAM_06j* para carboidratos, *ff14SB* para proteínas, *OL15* para DNA, *OL3* para RNA, etc., e que podem ser usados juntos ou não, sendo cada um usado para descrever uma parte do sistema.⁶⁵ Numa simulação de uma proteína com um substrato orgânico é usual a combinação dos campos de força *ff14SB* e *GAFF* para descreverem as interações enzima-substrato.⁶⁵

Uma vez estabelecido o tipo de campo de força para o sistema, é possível calcular as forças que atuam sobre cada átomo, obtendo-se a derivada primeira da energia potencial, fornecida pelo campo de força escolhido, em relação a posição desses átomos. Portanto, pode-se dizer que as simulações de DM consistem da resolução numérica da equação de movimento de Newton, onde cada átomo i do sistema molecular está sujeito a uma força, descrita pelas equações 2.17 e 2.18, representadas por:⁶⁶

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (2.17)$$

$$F_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} \quad (2.18)$$

onde F_i é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . A Equação II fornece a aceleração de cada partícula em cada instante de tempo. A partir desta, integrando-se as equações de movimento, pode-se obter as velocidades, cuja integração, por sua vez, proporciona a mudança de posição dos átomos no sistema. Com as novas posições e velocidades de cada partícula, obtêm-se as energias potencial e cinética do sistema. Aplicando-se sucessivamente esse procedimento, obtém-se o que se denomina de “trajetória”, que nada mais é do que o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo de simulação.⁵⁷

O tratamento tradicional envolve a resolução dessas equações para sistemas com no máximo dois corpos independentes. Portanto, para sistemas maiores, é necessária a aplicação de métodos numéricos e abordagens adicionais para minimizar a complexidade das forças globais atuantes nos sistemas. Assim, a integração das equações de movimento de Newton é realizada por algoritmos baseados nos métodos das diferenças finitas, nos quais a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo, chamados passos de integração (δt), possibilitando simular os movimentos de maior frequência do sistema, que na maioria das vezes são as vibrações das ligações químicas.⁵⁷

Os algoritmos numéricos mais populares são os de Verlet,⁶⁷ o algoritmo Leap-frog,⁶⁸ e ainda outros como Verlet-velocidade e o algoritmo de Beeman.⁶⁹ O algoritmo de Verlet utiliza as posições (r) e acelerações (a) dos átomos no tempo t e as posições do passo anterior, $t-\delta t$, para determinar as novas posições no tempo $t+\delta t$, de acordo com a equação abaixo:

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \frac{F(t)}{m} \delta t^2 \quad (2.19)$$

A solução desta equação depende da posição, da velocidade e da aceleração de cada partícula do sistema. Assim, no método de Verlet, se a posição do centro de massa da partícula i no tempo t é $r(t)$, as posições nos tempos $t\pm\delta t$ são dadas através de expansões em série de Taylor ao redor de $r(t)$: sendo uma expansão para frente (eq. $r(t + \delta t)$) e outra para trás (eq. $r(t - \delta t)$):

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.20)$$

$$r(t - \delta t) = r(t) - v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.21)$$

O intervalo de tempo dos passos de integração, δt , é um parâmetro importante nas simulações de DM. No entanto, intervalos muito curtos levariam os cálculos a se tornarem proibitivos e à imprecisões numéricas. Neste sentido, em sistemas biomoleculares as vibrações de maior frequência estão associadas ao estiramento das ligações químicas envolvendo átomos de hidrogênio. Assim, ligações químicas envolvendo átomos mais leves (por exemplo, a ligação O-H) oscilam com períodos de alguns femtosegundos, fazendo necessário que δt deva estar numa escala de sub femtosegundos para permitir a estabilidade da integração numérica. Então, a variação dos passos de integração, δt , usado geralmente varia de 0,5 a 1,0 femtossegundos (fs) para fornecer corretamente as oscilações dos átomos de hidrogênio.⁵⁷

Os movimentos de alta frequência limitam a magnitude do passo de integração, mas geralmente esses movimentos não afetam o comportamento global do sistema. Pois nos sistemas moleculares os movimentos das partículas apresentam diferentes escalas de tempo, considerando tanto as forças intermoleculares quanto as intramoleculares. Sendo geralmente o movimento destas últimas mais significativas, as vibrações moleculares são muito mais rápidas que os movimentos translacionais e rotacionais. Contudo, se estes movimentos mais rápidos forem restringidos e congelados (excluídos do processo de interações nos cálculos), podemos diminuir os graus de liberdade do sistema em estudo associados a estas oscilações de maior frequência. Por estes artifícios consegue-se uma maior eficiência e a possibilidade da utilização de um passo de tempo maior para o intervalo de integração numérica, o que repercute da diminuição do custo computacional.

A metodologia mais empregada para a manutenção e restrição da geometria ou parte dela numa simulação de DM é o algoritmo SHAKE.⁷⁰ Neste método as equações de movimento dos átomos de interesse (por exemplo, ligações químicas com os átomos de H) são descritas inserindo termos com restrições de força que agem para preservar os comprimentos das

ligações químicas. Usualmente é mais empregado para as ligações de hidrogênio com os demais átomos do sistema.

Outros aspectos que necessitam de atenção ao realizar uma simulação de DM são: a definição do ensemble estatístico, o controle das condições de temperatura e pressão, as condições iniciais de minimização de energia e equilíbrio do sistema, o uso de condições periódicas de contorno, a convenção da imagem mínima e raio de corte, o tratamento das interações de longo alcance e a aplicação dos métodos de solvatação do sistema.⁷¹ Obtidos, portanto, os parâmetros e condições para a simulação iniciam-se o processo de cálculo, passando pelas etapas de minimização, aquecimento e produção da DM. Será abordado a seguir a aplicação de campos de força empregando o modelo ligado para a simulação de metaloproteínas.

2.10 Parametrização do Campo de Força AMBER para a Aproximação do Modelo Ligado (Bonded Model Approach) em Metaloproteínas

Em paralelo ao processo de estudo químico-quântico, envolvendo a investigação com os modelos de “cluster”, realizou-se o desenvolvimento de análises teóricas através de simulações computacionais, por Dinâmica Molecular Clássica (DM), do sistema de *pdPTE* na sua forma nativa, Zn(II)-Zn(II), e substituída formando os sistemas de Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II). Os sistemas foram modelados a partir da subunidade B do dímero das fosfotriesterases 1HZY, 1I0D e 1JGM, respectivamente.⁷³ A princípio o modelo escolhido para a realização das simulações envolvia simulações de DM utilizando o formalismo do modelo não ligado,⁷¹ para se tratar os campos de força para os metais de transição. Neste modelo não são consideradas ligações químicas com os íons metálicos e somente interações eletrostáticas são descritas. No entanto, em virtude da não descrição de forma adequada dos sistemas de

pdPTEs envolvendo simulações longas através do modelo não ligado, como será descrito no capítulo 5, foi iniciado um processo de parametrização do campo de força AMBER ff14SB para a obtenção de parâmetros e uso do modelo ligado para a descrição das ligações químicas nos sítios ativos enzimáticos estudados.^{63,72}

No entanto, mesmo para o início dos estudos envolvendo o modelo não ligado, para a descrição dos metais de transição, tem-se um primeiro problema por falta de parâmetros no sítio ativo de *pdPTE*. Experimentos de mutagênese direcionadas sobre os resíduos de aminoácidos ao entorno dos metais binucleares em fosfotriesterases evidenciaram aspectos imprevisíveis. A primeira surpresa foi a presença de uma lisina carboxilada (Lys 169) que atua como um dos ligantes em ponte aos metais no centro binuclear⁷³. A figura 2.3 apresenta o resíduo de aminoácido de lisina normal e a estrutura modificada em virtude da reação com CO₂.

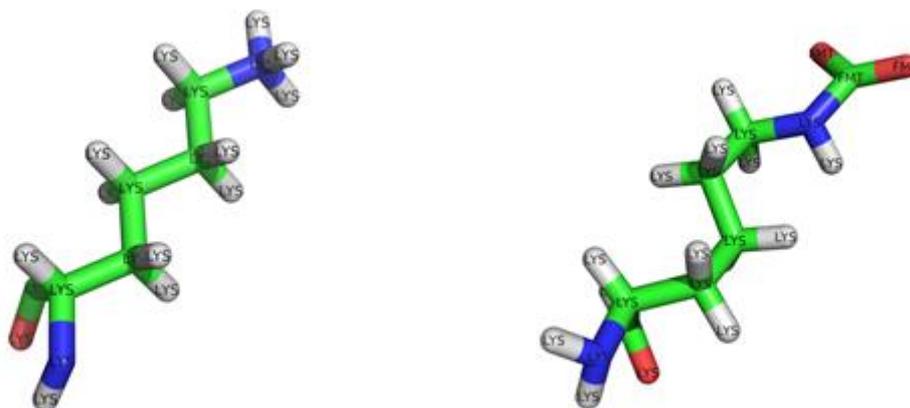


Figura 2.3: Estruturas: I) a esquerda o resíduo de aminoácido Lys169 normal e II) a direita o resíduo lisina carboxilada encontrado no sítio ativo de *pdPTE*.

Consta na literatura trabalhos em que parâmetros utilizados e ajustados para o Modelo do Átomo Catiônico (*Cationic Dummy Atom Model*),⁷⁴ sendo utilizados de forma modificada nos poucos estudos existentes de DM, para o sistema nativo de *pdPTE*, utilizando o modelo de íon não ligado. Através da fundamentação teórica e metodologias baseadas em trabalhos recentes na literatura,^{75,76} iniciou-se um processo de reparametrização da lisina carboxilada, Lys169, para a realização das simulações de DM para os sistemas de *pdPTE*. Assim, iniciou-se a obtenção de parâmetros para o resíduo de Lys169, que se encontra coordenado em ponte aos dois metais pelos átomos de O. Neste sentido, um estudo sistemático de parametrização de potenciais (constantes de força de ligação, de ângulo, cargas e posições de equilíbrio), e obtenção e construção deste resíduo de aminoácido modificado foi realizado com fundamentação nos trabalhos de Marcial *et al.*^{75,76} Os parâmetros obtidos foram inseridos no campo de força ff14SB do programa AMBER, para se realizar as dinâmicas moleculares. As formas de abordagem e resultados desta parte do trabalho são descritas de forma breve no capítulo 5. A princípio, esta metodologia seria utilizada, também, para a obtenção dos parâmetros relacionados aos metais de transição. No entanto, no final do ano de 2015 surgiu a implementação do programa MCPB.py⁷² no programa AMBER2015 o qual sistematizava a obtenção destes parâmetros para o campo de força através do modelo ligado.⁶³

Por apresentar grande oportunidade de aprendizado e, em virtude das longas simulações usando o modelo não ligado não descreverem bem os metais no sítio ativo, optou-se por utilizar o protocolo MCPB.py. Assim, iniciou-se o processo de parametrização para todo o entorno do sítio ativo e realização das simulações de DM, usando o modelo ligado, para os sistemas de Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II) de *pdPTE*. Cabe ressaltar ainda que esta é a primeira vez na literatura que serão tratados os sistemas enzimáticos nativo e as formas substituídas por outros metais de *pdPTE* através do modelo ligado utilizando DM. O formalismo do protocolo MCPB.py é apresentado a seguir.

2.11 MCPB.py um Programa em Python Construtor de Parâmetros para Centros Metálicos

A modelagem de sistemas contendo metais de transição, utilizando campos de força clássicos, é um trabalho desafiador devido a aspectos intrínsecos da química dessas espécies. Pois, eles podem apresentar variados números de ligantes coordenados, e diferentes estados de oxidação também são possíveis.⁷⁷ Assim, os modos e números de ligações dos complexos metálicos são mais numerosos e variados em relação à moléculas orgânicas típicas. Ou seja, necessita-se de uma parametrização específica para cada sistema. Por exemplo, os íons de zinco podem ter quatro, cinco e até seis ligantes em sua esfera de coordenação, variando-se, conseqüentemente, as geometrias locais ao entorno deste metal nos sítios ativos enzimáticos.⁷⁸ Se fosse considerado cada tipo de ligante e modo de ligação possível que potencialmente poderia ocorrer com os íons de zinco, o número de complexos seria bastante grande. Isto implica diretamente em uma modelagem ainda mais desafiadora, havendo a necessidade do desenvolvimento de campos de força, para cada tipo diferente de geometria de coordenação nos sítios ativos enzimáticos e em complexos metálicos.⁷²

Existem diversas maneiras de obter parâmetros de constantes de força para utilização e construção de campos de força clássicos usados em simulações de DM, e podemos destacar as seguintes: utilizando de métodos empíricos,⁷⁹ utilizando métodos e técnicas experimentais⁸⁰ (por exemplo, raios X, RMN, análise de modos normais vibracionais em espectros, etc.), ou utilizando Matrizes Hessianas calculadas teoricamente.^{81,82} De modo geral, o método empírico poderia ser aplicado de forma mais ampla, mas geralmente oferece uma precisão limitada. Derivando-se parâmetros através de experiências têm-se os problemas associados ao refinamento das informações e, conseqüentemente, a demora na construção de um banco de dados, restringindo-se os estudos a sistemas específicos e mais investigados na literatura. Por outro lado, a obtenção de parâmetros baseado em cálculos quânticos oferece uma precisão

considerável sendo amplamente aplicável a uma grande variedade de configurações moleculares.⁷²

Seminario propôs um método que emprega a Matriz Hessiana Cartesiana para obtenção de constantes de força (conhecido como o Método Seminario) e o validou através de uma série de estudos com moléculas orgânicas pequenas.⁸² Nilsson *et. al.* desenvolveu o software Hess2FF para calcular as constantes de força através do método Seminario.⁸³ Eles aplicaram sua metodologia sobre 5 diferentes sistemas sendo alguns contituidos com íons de Fe ou Zn. Lin e Wang aplicaram o Método Seminario e a obtenção de cargas através do método de potencial eletrostático restrito (RESP), para complexos de zinco com o Campo de Força Geral AMBER (GAFF).⁸⁴ Eles mostraram que o uso do campo de força através do modelo ligado com as cargas ajustadas RESP apresentou o melhor desempenho entre os modelos investigados. Peters *et. al.* desenvolveram o software construtor de parâmetros para centros de metal (Metal Center Parameter Builder – MCPB)^{85,86} usando o pacote de software MTK++⁸⁵ e linguagem de programação C++. O MCPB é uma ferramenta semiautomática para parametrização de sistemas contendo íons metálicos. O campo de força ZAFF (Zinc AMBER Force Field) foi desenvolvido para o íon de zinco com quatro ligantes coordenados, em sítios ativos de proteínas, usando a combinação Seminario/ChgModB (relatada como a melhor combinação) usando MCPB. O termo ChgModB esta relacionado a uma das quatro opções de obtenção das cargas RESP. Após a verificação da viabilidade e eficiência do método MCPB, uma extensa variedade de trabalhos e sistemas contendo íons metálicos foi parametrizada usando este pacote. No entanto, mesmo com o ganho de tempo considerável proporcionado por MCPB, o processo ainda era excessivamente complicado para pessoas não experientes. Isto é devido ao número excessivo de etapas e detalhes envolvidos na modelagem computacional destes sistemas através desta metodologia.⁷²

Li e Merz construíram o software MCPB.py, usando programação em Python, simplificando grande parte das etapas e funções do MCPB.⁷² O MCPB.py usa um fluxo de trabalho muito mais otimizado, oferecendo a possibilidade de menos passos e detalhes computacionais e o fornecimento de poucos arquivos de entrada para o usuário do software. Suporta o método matriz Z, Seminario e métodos empíricos para a parametrização. Na versão inicial, no AMBER15, suporta uma variedade de campos de força AMBER, mais de 80 íons e dois pacotes de software QM amplamente utilizados (Gaussian03, Gaussian09 e GAMESS-US⁸⁷), para a geração dos parâmetros. Usando o ParmEd⁸⁸ ou ACPYPE,⁸⁹ os arquivos de topologia e coordenadas AMBER, obtidos na parametrização com MCPB.py, podem ser convertidos nos formatos usados pelo CHARMM, GROMACS, etc., por exemplo. Assim, os autores esperam que a aplicação do MCPB.py seja expandida, e além disso, contribua para acelerar a modelagem de íons em metaloproteínas e compostos organometálicos usando uma variedade de pacotes e campos de força.

A versão atual do MCPB.py suporta os seguintes campos de força AMBER: ff94, ff99, ff99SB, ff03, ff03.r1, ff10, ff12SB, ff14SB e GAFF. O campo de força padrão para proteínas é o ff14SB, enquanto o campo de força GAFF é usado para ligantes orgânicos pequenos. O programa deve ser utilizado com a versão do AmberTools15 ou versões superiores porque usa código, arquivos de dados e o programa resp do pacote de software AmberTools15. Um formato geral para um trabalho de parametrização de um sítio ativo enzimático contendo íons metálicos usando MCPB.py é mostrado na Figura 2.4.

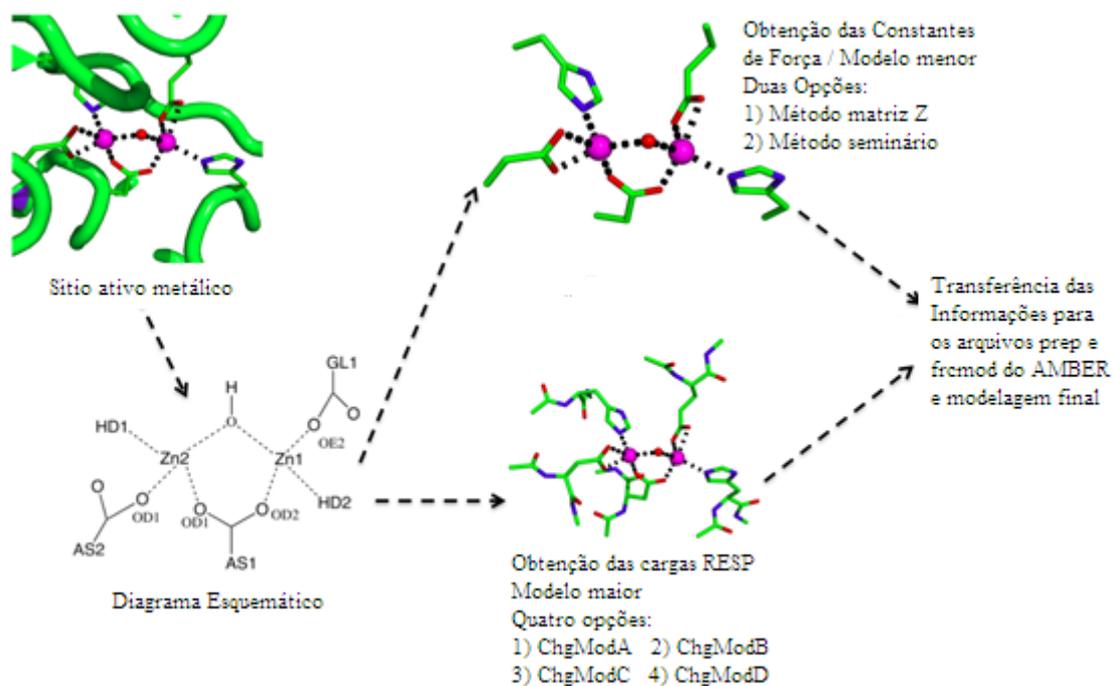


Figura 2.4: Representação de modelos de estruturas e de etapas utilizadas para o trabalho de parametrização de centros metálicos empregando o programa MCPB.py. Figura retirada da referência.⁷²

Semelhante ao MCPB, no MCPB.py dois modelos são criados para se fazer a parametrização no intuito de se encontrar um equilíbrio entre precisão e velocidade para o processo. Como mostrado na Figura 2.4, temos: um modelo menor do sítio ativo enzimático é criado para obtenção dos parâmetros de ligação química associados ao metal, aos parâmetros de ângulos e posições de equilíbrio. A outra estrutura do sítio ativo, também criada durante o início do processo, emprega um modelo maior que é utilizado para obtenção das cargas parciais. A primeira parte é baseada no modelo de cadeia lateral, que considera apenas as cadeias laterais dos resíduos de ligação e terminam com um grupo metila. O segundo passo é baseado no modelo maior, no qual as cadeias laterais e os seus resíduos de aminoácidos

terminais são modelados por ACE (o resíduo N-terminal é tratado por um grupo acetil) e NME (o resíduo C-terminal é tratado como uma N-metil amida) e estão incluídos em suas formas neutras.⁷²

Após serem feitas todas as considerações dos estados de protonação sobre o arquivo PDB da proteína a ser utilizada, usando-se, por exemplo, o programa *on line* Propka, adiciona-se os átomos de hidrogênio através de programas como H++, reduce,⁹⁰ etc.. O processo de modelagem com MCPB.py seguidamente envolve 4 etapas, que são indicadas como etapas 1, 2, 3 e 4, respectivamente: I) criação dos arquivos de entrada através dos molelos pequenos e grandes do sítio ativo enzimático. II) geração do arquivo *frcmol* para o sistema. Este arquivo contém os parâmetros de ligação, ângulo, torção e VDW para o campo de força. Os parâmetros de ligação e ângulo podem ser gerados com base no Método Seminario (modo padrão, etapa 2s), método da matriz Z (usando etapa 2z) e um método empírico (usando etapa 2e, que suporta apenas zinco atualmente). Como no MCPB, o MCPB.py atribui barreiras de torção zero para ângulos diedros. III) A terceira etapa promove a obtenção e ajuste das cargas RESP e construção dos arquivos *mol2* para cada resíduo ligado diretamente ao sítio ativo. O programa renomeia esses resíduos automaticamente para diferenciá-los dos resíduos de aminoácidos padrões contidos nas bibliotecas dos campos de força AMBER. IV) A quarta etapa gera um novo arquivo PDB com os resíduos do sítio ativo renomeados, e cria arquivos de entrada *.prmtop* e *.inpcrd* de topologias de coordenadas e velocidades iniciais, respectivamente. Durante esta etapa podem ser obtidos arquivos de entrada para simulações de DM em fase gás, solvente implícito e solvente explícito, por exemplo. Após a conclusão, é possível aos usuários ainda transferirem a topologia e velocidades iniciais do formato AMBER para outros formatos se forem utilizar programas alternativos para execução dos processos de minimização de energia e as simulações de DM.⁷²

Portanto, a modelagem de íons metálicos em campos de força continua sendo uma questão desafiadora devido a gama de modos de coordenação disponíveis para os íons de metais de transição. Outros aspectos gerais ao desenvolvimento de campos de força podem ser obtidos na literatura correlata, como no artigo de perspectiva de Cui,⁴⁰ onde discutisse vários tópicos de pesquisa relevantes sobre métodos teóricos para aplicações biofísicas e bioquímicas. O programa MCPB.py é uma ferramenta eficiente que facilita a construção de parâmetros de campo de força confiáveis para íons metálicos utilizando o modelo ligado.

2.12 Métodos Híbridos QM/MM

Nas últimas décadas, a combinação de cálculos de mecânica quântica (QM) com cálculos de mecânica molecular (MM) tornou-se o método de tratamento teórico de investigação para reações químicas envolvendo sistemas biomoleculares, sistemas de estado sólido e processos químicos que ocorrem em solventes explícitos de uma forma mais completa. Porque quando estas técnicas são acopladas (QM/MM) temos um método computacional que permite modelar reações dentro das enzimas por associar o poder de um cálculo quântico com a flexibilidade e simplicidade da mecânica molecular clássica, respectivamente. Na verdade, existe agora uma grande literatura que demonstra o valor e poder do tratamento QM ou híbrido QM/MM (ou ONIOM) e até QM/MM MD, para os estudos de simulações computacionais.^{30,49}

Existem três fatores cruciais a serem definidos no estudo de mecanismos enzimáticos por métodos QM/MM: i) como a interação entre as regiões QM/MM são tratadas; ii) como representar, e onde cortar as ligações covalentes entre átomos no limite da fronteira QM/MM e iii) como obter e calcular a energia total. Para exemplificar o primeiro fator, três abordagens têm sido amplamente difundidas e amplamente utilizadas para tratar as interações

eletrostáticas entre as partes QM e MM: i) tratamento eletrostático; ii) incorporação mecânica, e iii) inserção de polarização. A abordagem de tratamento eletrostático permite a polarização da parte QM pela distribuição de carga da região MM desde que seja incorporada no cálculo QM. Ao contrário da abordagem eletrostática, na incorporação mecânica, os átomos de QM são representados como cargas pontuais, dipolos de ligação ou multipolos superiores. Este tratamento é provavelmente menos preciso em comparação com o eletrostático uma vez que a densidade de carga da região QM não está polarizada pela região MM. No esquema de inserção de polarização, ocorre a polarização da região MM em resposta à distribuição de cargas da região QM e as distribuições de carga da parte MM são levadas em consideração.^{30,49}

As escolhas também divergem e têm-se opções diferentes para o tratamento dos átomos nas regiões de fronteira entre as partes QM/MM. Podem ser introduzidos orbitais localizados ou *link* átomos (LAs) quando uma ligação covalente entre as regiões QM/MM precisam ser cortadas ao se definir o limite de separação das fronteiras. Os LAs completam a região QM com a inserção de um átomo para saturar as valências livres. De forma usual tem sido aplicado como um LA o átomo de hidrogênio (H), mas também podem ser usados átomos de pseudohalogênios ou o grupo metila. Os LAs não são visíveis para os átomos da região MM, e eles estão envolvidos apenas no cálculo da parte QM. Como uma descrição alternativa para os LAs, orbitais localizados são introduzidos para substituir a ligação química entre as regiões QM/MM por um orbital molecular duplamente ocupado. Essa alternativa associa-se ao trabalho de Warshel e Levitt, que desenvolveram métodos computacionais efetivos e foram reconhecidos através do Prêmio Nobel de Química em 2013.⁴⁹

Por último destacamos uma breve introdução relacionada à apuração dos dados de energia total do sistema. A energia calculada na estrutura QM/MM contém três tipos de interações: entre os átomos da região QM, entre os átomos da região MM e as interações entre

os átomos QM/MM. Várias alternativas de abordagens foram propostas, no entanto, podem ser agrupadas em seu escopo geral e serem divididas em duas categorias: esquemas de acoplamento aditivo e subtrativo.

I) Acoplamento QM/MM aditivo: Nos esquemas de acoplamento aditivo, a energia total QM/MM é avaliada da seguinte forma: $E_{QM/MM} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM}$; onde o sistema QM está incorporado no sistema maior MM, e a energia total do sistema é a soma dos termos QM, MM e QM/MM. O último termo representa a interação entre os subsistemas e contém as informações para as interações entre as regiões QM/MM. No modelo aditivo as interações ligadas (ligações, ângulos, torções) entre os átomos da região QM e MM são tratados por parâmetros no nível do campo de força. As interações de van der Waals (vdW) entre a parte QM e os átomos da região MM são descritas por potenciais Lennard-Jones. Nos cálculos QM/MM, o uso de parâmetros originais de MM para os potenciais de van der Waals podem levar a erros significantes por dois motivos. Primeiro, os parâmetros vdW foram principalmente otimizados para reproduzir dados termodinâmicos experimentais para moléculas orgânicas pequenas e interações ligadas e não ligadas. Em segundo lugar, a polarização eletrônica da região QM é altamente aproximada, onde os efeitos de polarização são levados em consideração de forma média. Portanto, os parâmetros MM e QM/MM de vdW ótimos tendem a ser diferentes para cada região. Sumarizando, temos que, contrariamente ao esquema subtrativo (a ser definido a seguir), as interações entre as regiões QM/MM no modelo de acoplamento aditivo são tratadas explicitamente.³⁰

II) Acoplamento QM/MM subtrativo: O esquema QM/MM subtrativo pode ser entendido como uma extrapolação de uma região QM pequena (considerada como o sistema modelo) para o sistema maior (referido como real). Na sua formulação original, apenas o sítio ativo, onde ocorre a reação química, é tratado através de métodos QM e o resto do sistema é tratado no nível MM. Nesta abordagem, a energia total do sistema real ($E_{QM/MM}$) é avaliada da

seguinte forma: $E_{QM/MM} = E_{QM}^{QM} + E_{QM/MM}^{MM} - E_{QM}^{MM}$, onde E_{QM}^{QM} e E_{QM}^{MM} representam a energia interna da região QM calculada no nível QM (alto) e MM (baixo), respectivamente. Enquanto $E_{QM/MM}^{MM}$ é a energia do sistema inteiro obtida no nível MM. O aspecto interessante do esquema subtrativo é a simplicidade e o cancelamento implícito de artefatos introduzidos pelos LAs. Contudo, esse cancelamento também se torna uma desvantagem porque é polêmico se a contribuição de LA no nível QM pode ser equilibrado pelo nível MM. Além disso, verifica-se que a energia da região QM foi calculada no nível MM e na parte QM/MM as interações também são calculadas no nível MM (embora implementações mais recentes incluam a polarização da região QM por cargas da região MM através de inserção eletrostática). Estas observações e fatores podem diminuir a precisão da abordagem subtrativa e requerem a preparação de parâmetros MM para a região QM, o que não é necessário no esquema QM/MM aditivo.³⁰

Um dos esquemas subtrativos mais empregados é denominado ONIOM (Own N-layer integrated molecular orbital molecular mechanics). Esta abordagem híbrida foi desenvolvida e implementada através dos trabalhos de Morokuma e colaboradores.³⁰ Esta metodologia permite a combinação de diferentes níveis de teoria para cada subdivisão de um sistema usando múltiplas camadas. Por exemplo, no método ONIOM (QM:QM:MM), duas regiões QM e somente uma região MM são definidas, e podem ser tratadas em diferentes níveis de teoria, inclusive entre as próprias regiões QM. A precisão da abordagem ONIOM depende altamente de dois fatores: primeiro o número e o tipo de partições do sistema real e, em segundo lugar, a confiabilidade do método de baixo nível de teoria usado no ONIOM. Uma delimitação adequada da região modelo é muito importante para diminuir esse erro.³⁰

Portanto, existem muitos estudos focados em desenvolver e aplicar o método ONIOM de multicamadas. Segundo Morokuma o verdadeiro sítio ativo nem sempre coincide com os sítios de ligação de estruturas de estudos de difração de raios-X. Assim, a abordagem ONIOM

(QM/QM) é um método muito útil para investigar geometrias, por exemplo, no estudo de metaloenzimas.³⁰

2.13 Referências Bibliográficas

- (1) Eisberg, R.; Resnick R., *“Física Quântica. Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas”*, Ed. Campus, **1979**, Brasil.
- (2) Levine, I. N., *“Quantum Chemistry”*, Prentice-Hall International, Inc., **1991**, USA.
- (3) Møller, C.; Plesset, M. S., *Phys. Rev.*, **1934**, 46, 618.
- (4) Goldard, W. A.; Dunning, T. H.; Hunt, W. J.; Hay J. P., *Acc. Chem. Res.*, **1973**, 6, 368.
- (5) Brobowicz, F. W.; Goddard III, W. A., *Methods of Electronic Structure Theory*, H.F. Schaefer III (editor), Plenum, **1977**, Vol. 4, p.79.
- (6) Shepard, R., The Multiconfiguration Self-Consistent Field Method. *Advances in Chemical Physics; Ab Initio Methods In Quantum Chemistry – II*; Lawley, K.P.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, **1987**.
- (7) Szabo, A.; Ostlund, N.S., *Modern Quantum Chemistry: An Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Macmillan, New York, **1982**.
- (8) Siegbahn, P.E.M., *Lectures Notes in Quantum Chemistry I*, editor B. O. Roos, Springer-Verlag, Berlin, **1992**, 255-294.
- (9) Jensen, F.; Wiley, J., *Introduction to Computational Chemistry*, **1999**.
- (10) Shavitt, I., *Methods of Electronic Structure Theory*, editor H.F. Schaefer III, Plenum, New York, **1977**, 189 .

- (11) Coster, F., *Nuclear Phys.*, **1958**, 7, 421.
- (12) Kümmel, H.; Lührmann, K.H.; Zabolitzki, J.G., *Phys. Rev.*, **1978**, 14, 35.
- (13) Cížec, J., *J.Chem. Phys.*, 1966, 45, 4256; *Adv. Chem. Phys.*, **1969**, 14, 35.
- (14) Ziegler, T. *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 651.
- (15) Morgon, N. H.; Custodio, R., *Quím. Nova*, **1995**, 18, 44.
- (16) Kohn, W.; Becke, A.D.; Parr, R.G., *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 12974.
- (17) Chermette, H., *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 180, 699.
- (18) Duarte, H. A., *Quím. Nova*, **2001**, 24, 501.
- (19) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W., *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 1793.
- (20) Ziegler, T.; Autschbach, J., *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 2695.
- (21) Kohn, W.; Sham, L. J., *Phys. Rev.*, **1965**, 140, 1133.
- (22) Yoo, S.; Zahariev, F.; Sok, S.; Gordon, M. S., *The J. Chem. Phys.*, **2008**, 129, 144112.
- (23) Morgon, N. H.; Coutinho, K., *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*; Livraria da Física: São Paulo, **2007**.
- (24) Head-Gordon, M., *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 13213.
- (25) Vianna, J. D. M.; Fazzio, A.; Canuto, S., *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos – Simulação Computacional*, Livraria da Física, São Paulo, **2004**.
- (26) Hohenberg, P.; Kohn, W., *Phys. Rev. B*, **1964**, 136, B864.
- (27) Parr, R. G.; Yang, W., *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, 1989 ed.; Oxford University Press, New York, **1989**, Vol. 16.

- (28) Siegbahn, P. E. M.; Himo, F. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, 14, 643-651.
- (29) Siegbahn, P. E. M.; Himo, *John Wiley & Sons, Ltd.*, **2011**, 1, 323-336.
- (30) Ahmadi, S.; Herrera, L. H.; Chehelamirani, M.; Hostas, J.; Jalife, S.; Salahub, D. R. *Int J Quant. Chem.*, **2018**, e25558, 1-34.
- (31) Siegbahn, P. E. M.; Himo, F. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, 14, 643.
- (32) Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 689.
- (33) DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific*, **2002**, San Carlos, CA, USA.
- (34) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14, 33-38.
- (35) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J Comput Chem.*, **2004**, 13, 1605-1612.
- (36) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.;

Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

(37) Neese, F. The ORCA program system, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, **2012**, 2, 73–78.

(38) Chan, G. K. L.; Sharma, S. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2011**, 62, 465–481.

(39) Yury, M.; Giovanni, B.; Christoph, R.; Alexander, A. A.; Frank, N.; Luigi, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 9374-9391.

(40) Cui, Q. *J. Chem. Phys.*, **2016**, 145, 140901-140912.

(41) Li, H.; Robertson, A. D.; Jensen, J. H. *Proteins*, **2005**, 61, 704.

(42) Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, 537-541.

(43) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 3232.

(44) Moa, S.; Himo, F. *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, 175, 259.

(45) Sheng, X.; Lind, M. E. S.; Himo, F. *FEBS J.*, **2015**, 282, 4703.

(46) Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. *Biochemistry*, **2012**, 51, 5173.

(47) Ghysels, A.; Woodcock III, H. L.; Larkin, J. D.; Miller, B. T.; Shao, Y.; Kong, J.; Neck, D. V.; Speybroeck, V. V.; Waroquier, M.; Brooks, B. R. *J. Chem. Theory and Comput.* **2011**, 7, 496-514.

(48) Da Silva, J. C.S.; Pennifold, R. C. R.; Harvey, J. N.; Rocha, W. R. *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 2492-2504.

(49) van der Kamp, M. W.; Mulholland, A. J. *Biochemistry*, **2013**, 52, 2708–2728.

- (50) Kohen, A. *Acc. Chem. Res.*, **2015**, 48, 466–473.
- (51) Zheng, F.; Zhan, C. G. *Commun. Comput. Phys.*, **2013**, 13, 31–60.
- (52) Karplus, M.; Kuriyan, J. *PNAS*, **2005**, 102, 6679–6685.
- (53) Karplus, M.; Mccammon, J. A. *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, 9, 646–652.
- (54) Warshel, A. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35, 385–395.
- (55) McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. *Nature*, **1977**, 267, 585–590.
- (56) Hospital, A.; Goni, J. R.; Orozco, M.; Gelpi, J. L. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.*, **2015**, 8, 37–47.
- (57) Castro, A. A.; Assis, L. C.; Silva, D. R.; Corrêa, S.; Assis, T. M.; Gajo, G. C.; Soares, F. V.; Ramalho, T. C.; *AIMS Microbiology*, **2017**, 3, 108–135.
- (58) Weiner, P. K.; Kollman, P. A. *J Comput. Chem.*, **1981**, 2, 287–303.
- (59) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D., et al. *J Comput. Chem.*, **1983**, 187–217.
- (60) Kalé, L.; Skeel, R.; Bhandarkar, M., et al. *J Comput. Phys.*, **1999**, 151, 283–312.
- (61) Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G., et al. *J Phys. Chem. A*, **1999**, 103, 3596–3607.
- (62) Azevedo, L. S.; Moraes, F. P.; Xavier, M. M., et al. *Curr. Bioinform.*, **2012**, 7, 352–365.
- (63) Liu, C.; Zhang, B.; Zhu, Y.; Tang, M. *Struct. Chem.*, **2016**, 27, 1449–1464.
- (64) Bayly, C.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 10269–10280.
- (65) Case, D.A. et al. AMBER, University of California, San Francisco, **2016**.
- (66) Durrant, J. D.; McCammon, J. A. *BMC Biol.*, **2011**, 9, 1–9.

- (67) Verlet, L. *Phys. Rev.*, **1967**, 159, 98-103.
- (68) Eastwood, J. W.; Hockney, R. W.; Lawrence, D. N. *Comput. Phys. Commun.*, **1980**, 19, 215-261.
- (69) Beeman, D. *J Comput. Phys.*, **1976**, 20, 130-139.
- (70) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J Comput. Phys.*, **1977**, 23, 327-341.
- (71) Li, P.; Song, L. F.; Merz, Jr. K. M. *J Phys. Chem. B*, **2015**, 119, 883-895.
- (72) Li, P.; Merz, Jr. K. M. *J Chem. Inf. Model.*, **2016**, 56, 599-604.
- (73) Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry*, **1995**, 34, 7973-7978.
- (74) Pang, Y. P. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **2001**, 45, 183-189.
- (75) Marcial, B. L.; Sousa, S. F.; Barbosa, I. L.; Santos, H. F. D.; Ramos, M. J. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 13644.
- (76) Marcial, B. L.; Sousa, S. F.; Santos, H. F. D.; Ramos, M. J. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **2014**, 32, 1907.
- (77) Frenking, G.; Frohlich, N. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 717-77.
- (78) Bock, C. W.; Katz, A. K.; Glusker, J. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3754-3765.
- (79) Vedani, A.; Dobler, M.; Dunitz, J. D. *J. Comput. Chem.*, **1986**, 7, 701-710.
- (80) Nakagawa, I.; Shimanouchi, T. *Spectr. Act.*, **1964**, 20, 429-439.
- (81) Pulay, P.; Fogarasi, G.; Pang, F.; Boggs, J. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 2550-2560.
- (82) Seminario, J. M. *Int. J. Quant. Chem.*, **1996**, 60, 1271-1277.

- (83) Nilson, K.; Lecerof, D.; Sigfridsson, E.; Ryde, J. E. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **2003**, 59, 274-289.
- (84) Lin, F.; Wang, R. *J. Chem. Theory. Comput.*, **2010**, 6, 1852-1870.
- (85) Chakravorty, D. K.; Wang, B.; Lee, C. W.; Giedroc, D. P.; Merz, K. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 3367-3376.
- (86) Roberts, B. P.; Miller, B. R., III; Roitberg, A. E.; Merz, K. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 9934-9937.
- (87) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. *J. Comput. Chem.*, **1993**, 14, 1347-1363.
- (88) Case, D. A., et. al. AMBER 2015, University of California: San Francisco, **2015**.
- (89) Souza da Silva, A. W.; Vranken, W. F. *BMC Res. Notes*, **2012**, 5, 1-8.
- (90) Word, et. al. *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285, 1733-1747.

Capítulo 3: Investigação Teórica da Hidrólise Neutra do dietil p-nitrofenil fosfato (Paraoxon) em Solução Aquosa

3.1 Introdução

Ésteres de fosfato são compostos essenciais em sistemas biológicos, uma vez que são componentes tanto do DNA e do RNA quanto de diversos cofatores e metabólitos. A transferência do grupo fosforila nesses compostos tem importantes funções em processos bioquímicos cruciais, dentre os quais estão a formação óssea, a transdução e o armazenamento de informação genética e a reserva de energia para reações bioquímicas (por exemplo, através da hidrólise do ATP).¹⁻³ Dado que muitos processos bioquímicos importantes para a manutenção da vida envolvem a hidrólise de ésteres de fosfato, essa reação é considerada uma das mais importantes em sistemas vivos.^{3,4-6} Consequentemente, a hidrólise de ésteres de fosfato tem sido tema de extensivos estudos teóricos e experimentais.^{5,6,7-13} Os estudos tem focado principalmente na hidrólise de monoésteres e diésteres de fosfato, uma vez que são de ocorrência natural, atuam em processos bioquímicos e são os constituintes de moléculas biológicas importantes como o DNA e o ATP.

A estabilidade da ligação P-O de fosfodiésteres e a resistência desses compostos frente a reações de hidrólise em condições fisiológicas foram demonstradas por diversos autores. Por exemplo, Lad, Williams e Wolfenden¹⁴ estimaram em 1.1×10^{12} anos o tempo de meia-vida para a hidrólise de dianions de fosfatos de alquila a 25 °C. Por sua vez, Schroeder *et al.*¹⁵ estimaram o tempo de meia-vida requerido para a hidrólise espontânea de dineopentil fosfato em 3×10^7 anos a 25 °C, indicando, assim, a estabilidade da ligação P-O nos grupos fosfodiésteres do DNA. Apesar dessa grande estabilidade, diversas enzimas que hidrolisam os ésteres de fosfato e provocam a clivagem da ligação P-O em condições fisiológicas são conhecida como, por exemplo, as fosfodiesterases (PDE)⁵ e fosfatases ácidas púrpuras

(PAP).¹⁶ Nesse contexto, a síntese de compostos que possam imitar o comportamento dessas enzimas para serem usados na clivagem da ligação P-O de ésteres de fosfato torna-se uma importante área de pesquisa.¹⁷

Triésteres de fosfato, por outro lado, foram sintetizados para serem usados como pesticidas e herbicidas.⁶ Esses pesticidas organofosfatos atuam no sistema nervoso inibindo a enzima acetilcolinesterase. A exposição humana a esses compostos pode levar a danos cerebrais e, portanto, seu uso como pesticidas está sob intenso debate¹⁸ e, seus usos na agricultura já são proibidos em alguns países. Paraoxon (dietil 4-nitrofenil fosfato), derivado do inseticida paration¹⁹, é um potente inibidor de acetilcolinesterase, bem como um forte agente neurotóxico, tão forte quanto o agente nervoso sarin.²⁰ Em função da alta estabilidade desse composto (e de organofosfatos em geral) e dos seus efeitos malignos para mamíferos, existe um grande interesse no desenvolvimento de processos químicos para degradar esse composto no meio ambiente. Uma das rotas possíveis passa pelas reações de hidrólise. Outra importante abordagem é o estudo do mecanismo associado às enzimas fosfotriesterases (PTE) para projetar novos compostos bioinspirados.^{17, 21}

O paraoxon é um dos melhores substratos para estudos mecanísticos envolvendo a hidrólise de triésteres de fosfato pelas enzimas fosfotriesterases e, uma visão geral dos estudos até 2013, pode ser encontrada no artigo de revisão de Bigley e Raushel.²² Em solução aquosa, a maioria dos aspectos mecanísticos da hidrólise do paraoxon são baseados nos estudos de hidrólise alcalina. Estudos cinéticos realizados por Dumas *et al.*²³ revelaram que a hidrólise alcalina do paraoxon segue um modelo cinético de segunda ordem, com constante de velocidade de $7,5 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que se traduz em uma energia de ativação de $19,0 \text{ kcalmol}^{-1}$. Purcell e Hengge²⁴ mediram os parâmetros de ativação para a hidrólise alcalina de alguns mono-, di- e triésteres de fosfato e fosforotioato a 312 K. Para paraoxon, os autores obtiveram uma energia livre de ativação de $20,0 \pm 0,3 \text{ kcalmol}^{-1}$ e $21,5 \pm 0,2$ para paration, seu análogo

com o grupo tiol. Caldwell *et al.*²⁵ mediram os efeitos isotópicos primários e secundários de ¹⁸O para a hidrólise alcalina de paraoxon e 0,0-dietil 0-(4-carbamofenil) fosfato. Segundo os autores, os efeitos isotópicos medidos são consistentes com a adição limitante do íon hidróxido e fornecem evidência para um estado de transição similar a S_N2 com a ausência de um intermediário fosforano estável.

Cálculos teóricos corroboram algumas evidências experimentais sobre a hidrólise alcalina do paraoxon. Zheng, Zhan e Ornstein²⁶, investigaram a hidrólise alcalina do paraoxon e outros agentes nervosos tóxicos no nível de teoria MP2/6-31+G*//HF/6-31+G*. Os efeitos do meio solvente foram incluídos através do modelo contínuo polarizável (PCM) e do modelo contínuo eletrostático de superfície e volume polarizável (SVPE). Para o paraoxon os autores mostraram que a hidrólise alcalina ocorre através de um mecanismo S_N2 de uma única etapa, sem a formação do intermediário pentacoordenado fosforano, com uma energia de ativação de 0,8 kcalmol⁻¹ em fase gasosa e 10,1 kcalmol⁻¹ em solução, usando o modelo de solvatação PCM. Este valor em solução está ~ 9 kcalmol⁻¹ menor em relação à barreira de energia de ativação experimental²³. Khan, Bandyopadhyay e Ganguly²⁷ estudaram a hidrólise alcalina de paraoxon, paration e do difenil p-nitrofenil fosfato (PNPDPP) no nível de teoria MP2/6-311+G*//B3LYP/6-311+G* e também incluindo os efeitos de solvente usando o formalismo de equação integral no modelo contínuo polarizável (IEF-PCM). Os autores obtiveram um mecanismo com a formação de um intermediário pentacoordenado. Para o paraoxon, as barreiras de energia livre de ativação para a hidrólise foram calculadas sendo obtidos os valores de 21,8 e 0,6 kcalmol⁻¹ para a primeira e segunda etapa, respectivamente. A barreira energética global computada para a hidrólise do paraoxon apresenta melhor concordância com o valor experimental de 18,9 kcalmol⁻¹.²³ Posteriormente, Tuñón e colaboradores²⁸ estudaram a hidrólise alcalina do paraoxon em solução aquosa e também na enzima, utilizando simulações híbridas de QM(AM1-d)/MM. O meio solvente foi tratado com o modelo de água

TIP3P e os efeitos dinâmicos do meio foram incluídos por simulações de dinâmica molecular (QM(AM1-d)/MM/MD). Os autores verificaram que em solução aquosa a hidrólise alcalina do paraoxon segue um mecanismo concertado $A_N D_N$, sem a formação do intermediário pentacoordenado, com uma energia livre de ativação de $16,9 \text{ kcal mol}^{-1}$, que é apenas $2,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ abaixo do valor experimental. As controvérsias em relação ao mecanismo de duas etapas ou concertado envolvido na hidrólise de triésteres de fosfato foi explorado por Tarrat²⁹ em um estudo teórico, no nível de B3LYP e incluindo os efeitos do solvente dentro do modelo de campo de reação auto-consistente, envolvendo seis diferentes triésteres de dimetilfosfato. Concluiu-se que a hidrólise alcalina de triésteres de fosfato em solução pode seguir uma via ($A_N + D_N$), para grupos de saída ruins ($pK_{\text{alg}} > 8$), enquanto que para bons grupos de saída a reação pode ocorrer via mecanismo concertado sem formação de um intermediário pentacoordenado fosforano.

Os estudos teóricos do mecanismo de reação em solução aquosa discutidos tem em comum o fato de que nenhum deles permitiu a formação de ligações químicas entre os oxigênios fosforilados e as moléculas do solvente. Isto significa que a polarização da ligação P-O e a mudança na ordem de ligação P-O ao longo da coordenada da reação, devido à formação de ligações químicas com o solvente, não é abordada nestes trabalhos de hidrólise alcalina. No entanto, quando moléculas de água reativas são explicitamente incluídas nos cálculos, os processos de transferência de prótons envolvendo o solvente e o fosfato pode ocorrer e, portanto, afetar o mecanismo de reação. Por exemplo, Guo e colaboradores³⁰ estudaram a hidrólise alcalina das espécies dianiônicas do p-nitrofenil fosfato (pNPP), usando um cluster composto por até 14 moléculas de água e trataram todo o sistema no nível de teoria B3LYP/6-31++G(df,p) com efeitos de longo alcance do solvente tratados com o modelo contínuo polarizável PCM. Os autores calcularam uma barreira de energia de $22,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ e, curiosamente, descobriram que o nucleófilo na reação é de fato uma molécula de água e o

íon hidróxido atua como uma base geral. Portanto, as moléculas de solvente podem participar da reação. Nosso grupo também mostrou, através de simulações de dinâmica molecular *ab initio*,¹³ que a formação e estabilidade do intermediário fosforano pentacoordenado na hidrólise de diésteres de fosfato é afetada pelas moléculas de água que solvatam os grupos fosforila. O papel desempenhado pelas moléculas de água do solvente também pode ser observado na hidrólise neutra ou espontânea de ésteres de fosfato. Em um estudo teórico muito elegante, Mora, Kirby e Nome³¹ investigaram a hidrólise espontânea de cinco triaril e dois triésteres de dialquil aril fosfato, incluindo o metilparaoxon, que difere do paraoxon apenas por um grupo metil, e o análogo trifluoretil (-CH₂CF₃) do paraoxon. O estudo foi conduzido no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) incluindo até três moléculas de água explicitamente nos cálculos da mecânica quântica e tratando os efeitos do solvente de longo alcance por meio do modelo contínuo polarizável PCM. Os autores propuseram um mecanismo no qual as moléculas de água podem atuar tanto como base nucleofílica quanto base geral, aceitando um próton de outra molécula de água. Para os triésteres de fosfato investigados, o mecanismo ocorre em duas etapas, com a formação do intermediário pentacoordenado fosforano. As barreiras de energia computadas e as constantes de velocidade, de forma geral, apresentaram boas concordâncias com os valores experimentais. Os autores também mostraram, pela primeira vez, que a transferência do grupo fosforila de triésteres não depende apenas das capacidades dos nucleófilos e estabilidade de grupos de saída, mas também das propriedades dos dois grupos alquila ou arila espectadores.^{9,31}

Assim, nesta parte da tese investigamos a hidrólise espontânea do paraoxon em solução aquosa no nível teórico de DFT³² e MP2³³, usando uma combinação de solvatação local do grupo fosforila com moléculas de água explícitas, associado ao uso do modelo de solvente contínuo para descrever efeitos de solvatação de longa distância. Em contraste com os estudos teóricos anteriores, que investigaram a hidrólise alcalina do paraoxon em solução aquosa,

neste estudo nós usamos a molécula de água como nucleófilo para termos uma ideia de como esse composto organofosfato se degrada em meio aquoso. Pois verificamos que, apesar da hidrólise alcalina do paraoxon ter sido extensivamente estudada na literatura, a hidrólise espontânea em água não recebeu muita atenção. Até onde sabemos, o único estudo teórico sobre a hidrólise neutra, realizado por Nome e colaboradores,³¹ investigou a hidrólise dos análogos do paraoxon, com os grupos espectadores OCH₃ e OCH₂CF₃. Portanto, com esta investigação poderemos comparar nossos resultados energéticos e de mecanismo de reação com os análogos. Como veremos, a reação prossegue através de uma dupla transferência de prótons no estado de transição e, a solvatação local do grupo fosforila tem um papel fundamental na estabilização do intermediário fosforano pentacoordenado. Além disso, os resultados energéticos revelam que a reação prossegue muito lentamente em solução aquosa. Neste sentido, poderemos comparar diretamente a eficiência da enzima Cd²⁺/Cd²⁺-PTE de *Pseudomonas diminuta*^{17,21} na hidrólise do paraoxon iniciadas por moléculas de água presentes no sítio ativo enzimático, que será apresentado no capítulo 4 desta tese de doutorado.

3.2 Detalhes Computacionais

Os cálculos de otimização de geometrias e frequências vibracionais foram executados usando a Teoria Funcional de Densidade (DFT)³², empregando o funcional de troca correlação B3LYP³⁴ e a função de base 6-31+G(d)³⁵ para tratar os elétrons para todos os átomos. Os cálculos foram iniciados com o posicionamento de três moléculas de água solvatando o grupo fosforila. Assim, primeiramente, a estrutura dos estados de transição para o ataque de uma das moléculas de água no átomo de fósforo foi obtida. Após a obtenção dos estados de transição, os cálculos de coordenada intrínseca de reação (IRC)³⁶ foram executados, usando o algoritmo de segunda ordem de Gonzalez-Schlegel³⁷ a partir das

estruturas dos estados de transição otimizadas, com um passo de $0,30 \text{ (a.m.u.)}^{1/2}$ Bohr. As estruturas finais dos cálculos do IRC foram totalmente otimizadas e caracterizadas com cálculos de frequência no nível B3LYP/6-31+G(d). É importante mencionar que o número de moléculas de solvente utilizadas foi baseado em nossos cálculos anteriores de simulações de Monte Carlo e cálculos QM descrevendo a solvatação e hidrólise de mono e diésteres de fosfato,¹³ e também no estudo realizado por Mora *et al.*³¹ que mostrou que três moléculas de água são suficientes para a solvatação local do grupo fosforila dos triésteres de fosfato, produzindo excelentes energias livres de ativação.

Com o objetivo de obter melhores resultados energéticos, foram realizados cálculos de energia no ponto, nos níveis de teoria B3LYP, M06³⁸ e MP2³³, utilizando o conjunto de funções de base estendida 6-311++G(2d,2p). Cálculos de energia no ponto nas estruturas otimizadas em fase gasosa, foram realizados usando o modelo de solvatação implícita SMD⁴⁰ de Thrular e Cramer, nestes três níveis teóricos, e empregando a função de base 6-311++G(2d,2p). A variação das cargas atômicas ao longo do IRC foi obtida usando a abordagem de obtenção de cargas derivadas de potenciais eletrostáticos (CHELPG).⁴¹ Todos os cálculos relatados neste trabalho foram realizados usando o pacote de programas Gaussian09.⁴²

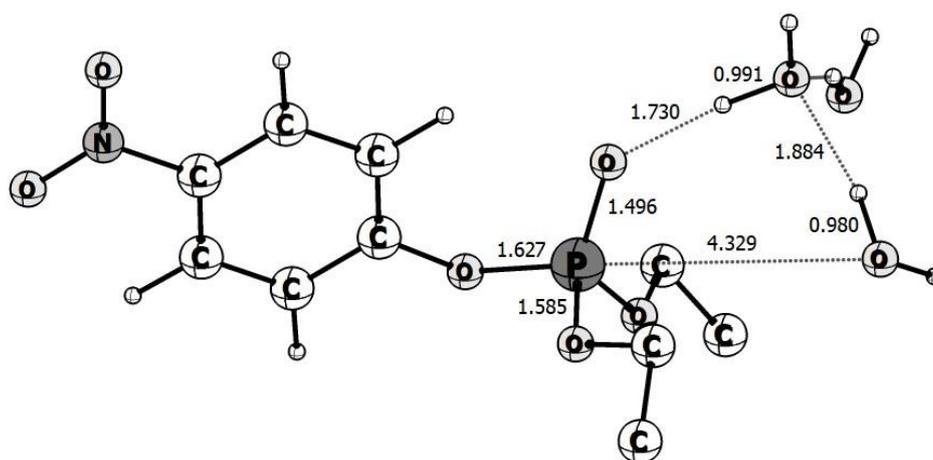
3.3 Resultados e Discussão

As estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) obtidas ao longo do IRC para o ataque da molécula de água no átomo de fósforo do triéster de fosfato paraoxon são mostradas nas figuras 3.1 e 3.2. A reação prossegue em duas etapas e as estruturas obtidas daqui em diante são chamadas de **Reac** para os reagentes, **TS1** para o primeiro estado de transição, **Int** para o intermediário fosforano pentacoordenado, **TS2** para o segundo estado de

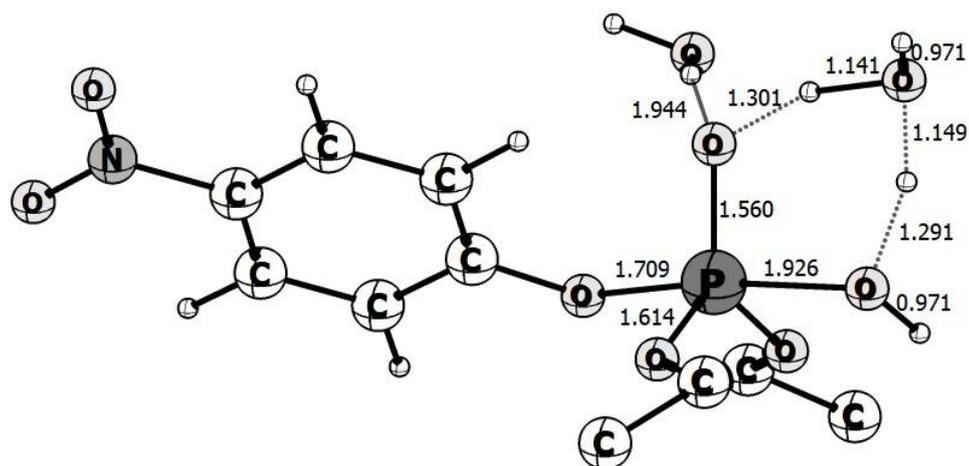
transição e **Prod**, para o produto da reação. Na primeira parte da reação (Figura 3.1), uma molécula de água distante 4,329 Å, aproxima-se em linha com a ligação P-O do grupo nitrofenolato. A estrutura do **Reac** é mantida por ligações de hidrogênio envolvendo a molécula de água que se aproxima e a ligação P=O do fosfato com as outras duas moléculas de água. A ligação de hidrogênio envolvendo a ligação P=O (1,730 Å) é mais curta que as ligações de hidrogênio envolvendo as moléculas de água (1,884 Å). A distância de ligação P-OAr de 1,627 Å e a distância de ligação P=O de 1,496 Å são consistentes para estruturas de fosfato tetraédrico, o que significa que estas ligações de hidrogênio com o solvente não alteram os parâmetros geométricos de forma apreciável.

A interação adicional da molécula de água, ao se aproximar mais do centro reativo de fósforo, gera a estrutura de estado de transição **TS1** apresentando uma estrutura semelhante à bipiramidal trigonal, com o grupo nitrofenolato e o grupo hidroxila ocupando a posição apical. Esta estrutura de estado de transição tem uma frequência imaginária de 1143,9i cm⁻¹ associada à transferência dupla de prótons da molécula de água nucleofílica para a água mais próxima do meio (1,291 Å) e do meio para a ligação P-O (1,301 Å). Este resultado mostra que a molécula de água atua como base geral, isto é, à medida que a molécula de água que ataca se aproxima do átomo de fósforo, é ativada por outra molécula de água do meio, transferindo um próton e gerando o grupo OH⁻ que atua como o nucleófilo efetivo. É importante notar que uma vez que a ligação P-OH está se formando no estado de transição, todos os outros comprimentos de ligação ao redor do átomo de fósforo aumentam. Por exemplo, a ligação P-O aumenta 0,064 Å e a ligação P-OAr aumenta 0,082 Å. O produto gerado nesta primeira etapa da reação é a espécie intermediária pentacoordenada **Int**. Na estrutura do **Int**, podemos ver que o próton da molécula de água nucleofílica é completamente transferido para o meio, apresentando o grupo OH diretamente ligado ao fósforo e, o átomo de oxigênio da ligação P-O é completamente protonado. Vale a pena notar que as ligações P-OAr e P-OH têm quase o

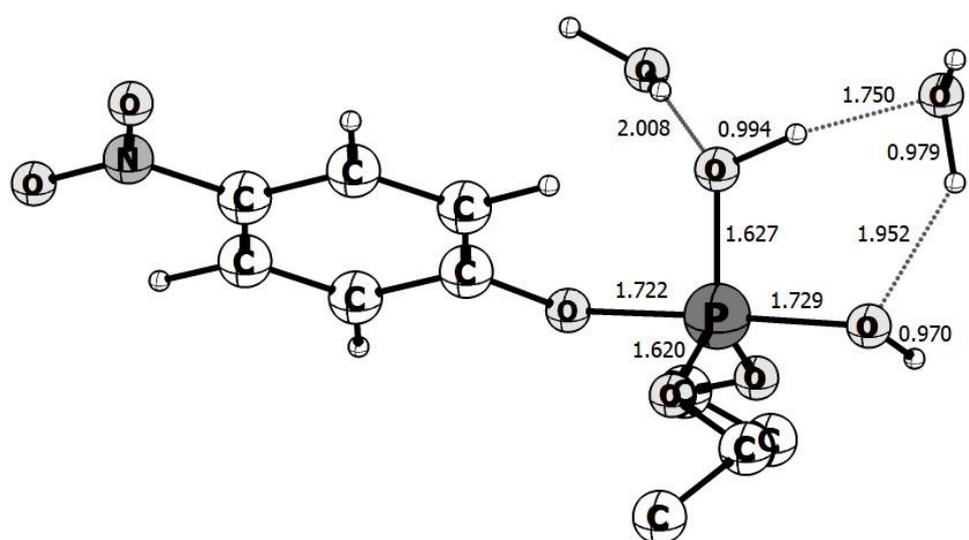
mesmo valor na estrutura do **Int**, com valores de 1,722 e 1,729 Å, respectivamente. As ligações equatoriais P-O, também, têm quase o mesmo valor de 1,620 Å. As ligações de hidrogênio envolvendo as ligações axiais e equatoriais P-OH com a água do meio são essenciais para estabilizar a estrutura do intermediário **Int**. O perfil do IRC para esta primeira etapa da reação revela que uma vez que a molécula de água ataca o átomo de fósforo, o átomo de oxigênio da ligação P-O é protonado simultaneamente. Essa transferência dupla de prótons entre as moléculas do solvente, com a formação *in situ* do nucleófilo, foi obtida em função do tratamento quântico das moléculas explícitas de solvente. É importante mencionar que esse mesmo tipo de transferência dupla de prótons no estado de transição também foi encontrado por Mora *et al.*³¹ em seus estudos de reações de transferência do grupo fosforila em vários triésteres de fosfato, com diferentes grupos de saída, incluindo o composto análogo metil paraoxon.



REAC



TS1



INT

Figura 3.1: Estruturas otimizadas, no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d), dos reagentes (**Reac**), estado de transição (**TS1**) e intermediário pentacoordenado (**Int**) localizados na primeira parte da hidrólise neutra de paraoxon em solução aquosa. Os átomos de hidrogênio dos grupos etila foram omitidos para maior clareza. As distâncias são dadas em Angstroms.

A interação posterior do grupo OH com o átomo de fósforo gera a segunda estrutura do estado de transição **TS2**, com uma frequência imaginária de $104,5i \text{ cm}^{-1}$, mostrado na figura 3.2. Este modo normal reativo está associado a um movimento combinado envolvendo as

ligações OAr-P-OH. A ligação P-OAr de 2,347 Å apresenta um alto grau de alongamento (~44%) em comparação com o valor na estrutura do **Reac** e a ligação P-OH com 1,606 Å está quase formada. Uma molécula de água do meio faz fortes ligações de hidrogênio com o grupo de saída nitrofenolato (1,650 Å) e com a ligação P-OH formada (1,567 Å). Existe também uma ligação de hidrogênio do nucleófilo OH com a outra molécula de água do meio (1,771 Å). Do **TS2** ao produto final **Prod**, outra transferência dupla de prótons ocorre. O próton da ligação P-OH equatorial é transferido para a molécula de água do meio que subsequentemente protona o grupo nitrofenolato, gerando nitrofenol, que se dissocia completamente do átomo de fósforo (4,814 Å). A ligação P-O encurta (1,512 Å) e restaura seu caráter de ligação dupla e a ligação entre o nucleófilo e o átomo de fósforo se forma completamente (1,589 Å). O produto final é um diéster de fosfato, com um arranjo tetraédrico ao redor do átomo de fósforo, e formando ligações de hidrogênio com o meio solvente. A partir dos detalhes do mecanismo de reação discutidos aqui, podemos ver facilmente que as moléculas de solvente explícitas são essenciais para descrever as migrações de prótons que ocorrem ao longo do mecanismo de reação e também para explicar a estabilidade do intermediário fosforano pentacoordenado. Acreditamos que a ausência das moléculas de solvatação de água (moléculas reativas) em torno do grupo fosforila possa ser a fonte da discordância encontrada no mecanismo de reação observado em estudos teóricos anteriores.

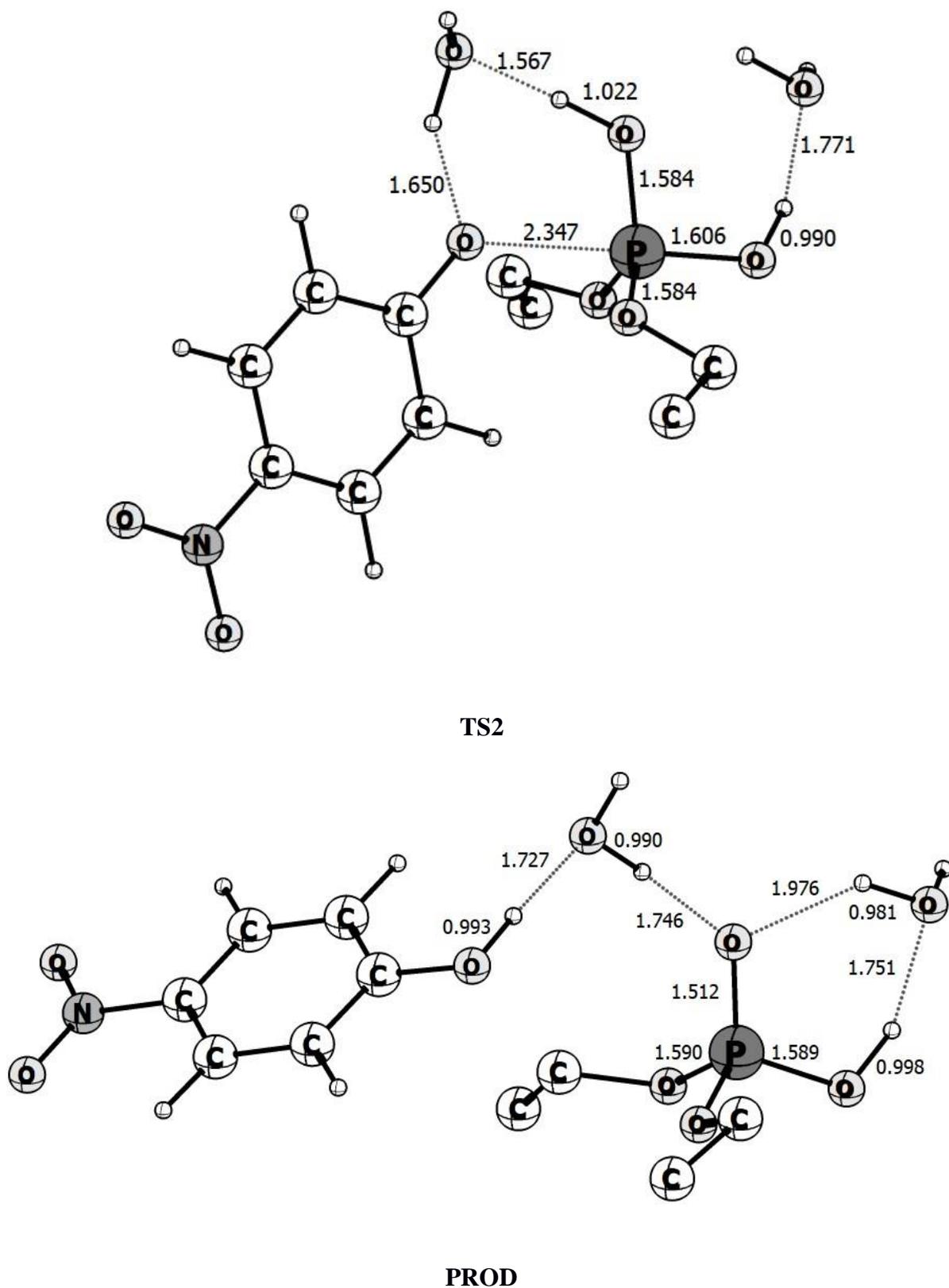


Figura 3.2: Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) do estado de transição (**TS2**) e produtos (**Prod**) localizados na segunda parte da hidrólise neutra do paraoxon em solução aquosa. Os átomos de hidrogênio dos grupos etila foram omitidos para maior clareza. As distâncias são dadas em Angstroms.

A classificação do tipo de mecanismo envolvido na hidrólise espontânea do paraoxon pode ser obtida através da análise da extensão da quebra da ligação P-OAr e da formação da ligação P-OH₂ ao longo da coordenada da reação, fornecendo uma caracterização estrutural do mecanismo. A Tabela 3.1 mostra as distâncias de ligação P-OAr e P-OH₂ ao longo da coordenada da reação.

Tabela 3.1: Variação das distâncias de ligação fósforo-nucleófilo (P-O_{H2O}) e do fósforo-grupo de saída (P-OAr) e percentagem de quebra de ligação P-OAr (% BB) e percentagem de formação da ligação P-O_{H2O} (% BF) ao longo da coordenada de reação.*

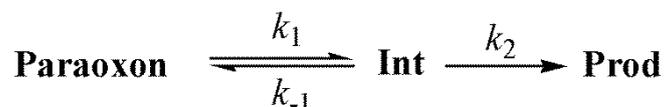
	Reac	TS1	Int	TS2	Prod
P-O _{Ar}	1,627	1,709	1,722	2,347	4,814
%B.B	0	5	6	44	100
P-O _{H2O}	4,329	1,926	1,729	1,606	1,589
%B.F	0	79	91	99	100

* Distâncias de ligação em Å.

Como pode ser visto, a ligação do grupo de saída ao átomo de fósforo permanece quase inalterada até que o intermediário pentacoordenado seja alcançado. Da estrutura do **Reac** até a formação do **Int**, a ligação P-OAr dissocia-se apenas 6% em relação ao **Reac** e, no segundo estado de transição **TS2**, a ligação está 44% dissociada. Ou seja, a ligação P-OAr dissocia-se

significativamente apenas na segunda etapa da reação. Por outro lado, na primeira parte da reação, a ligação do nucleófilo ao átomo de fósforo está quase completa. A ligação P-OH₂ está 79% já formada no **TS1** e 91% no intermediário, **Int**. Esta análise mostra claramente que a hidrólise do paraoxon segue um mecanismo associativo em duas etapas do tipo (A_N + D_N), passando por um intermediário pentacoordenado. É encontrado na literatura que o mecanismo associativo é a principal via para a hidrólise, tiolólise e alcoólise de triésteres de fosfato.^{6,43} Entretanto, a ocorrência em duas etapas com a formação do intermediário pentacoordenado ainda apresenta controversas e nossos resultados corroboram a proposta do mecanismo (A_N + D_N), passando por um intermediário pentacoordenado.

A existência de um intermediário para a hidrólise espontânea do paraoxon sugere um mecanismo consecutivo mostrado no esquema 1:



Esquema 1: Mecanismo para a hidrólise espontânea do paraoxon em solução aquosa.

Se a reação for conduzida em excesso de água, o que geralmente é verdade, ela exibirá uma cinética de primeira ordem em relação ao paraoxon, com uma taxa de velocidade dada por: $k_{obs} = (k_1 k_2) / (k_{-1} + k_2)$

As constantes de velocidade calculadas para a hidrólise espontânea do paraoxon em fase gasosa e em solução, bem como as energias livres de ativação e energia livre de reação, calculadas em diferentes níveis da teoria são mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros termodinâmicos e cinéticos calculados para a hidrólise neutra do paraoxon em solução aquosa.

	B3LYP/6-31++G(2d,2p)		M06/6-31++G(2d,2p)		MP2/6-31++G(2d,2p)	
	<i>Fase Gas</i>	<i>Solução</i>	<i>Fase Gas</i>	<i>Solução</i>	<i>Fase Gas</i>	<i>Solução</i>
$\Delta_r G$	-13,4	-12,8	-14,2	-13,3	-10,2	-9,3
ΔG_1	37,1	35,8	33,2	32,1	33,2	31,8
ΔG_{-1}	11,6	11,1	14,0	13,5	12,6	11,9
ΔG_2	1,5	-0,9	1,4	-1,0	4,1	1,9
k_1	$3,98 \times 10^{-15}$	$3,57 \times 10^{-14}$	$2,87 \times 10^{-12}$	$1,84 \times 10^{-11}$	$2,87 \times 10^{-12}$	$3,05 \times 10^{-11}$
k_{-1}	$1,95 \times 10^4$	$4,54 \times 10^4$	$3,40 \times 10^2$	$7,91 \times 10^2$	$3,61 \times 10^3$	$1,18 \times 10^4$
k_2	$4,94 \times 10^{11}$	$2,53 \times 10^{12}$	$5,85 \times 10^{11}$	$3,36 \times 10^{13}$	$6,14 \times 10^9$	$2,52 \times 10^{11}$
k_{obs}	$3,98 \times 10^{-15}$	$3,57 \times 10^{-14}$	$2,87 \times 10^{-12}$	$1,84 \times 10^{-11}$	$2,87 \times 10^{-12}$	$3,05 \times 10^{-11}$

** Computado nas geometrias otimizadas B3LYP/6-31+G(d). Os resultados em solução foram obtidos usando o modelo de solvatação SMD. ^a $\Delta_r G$ é a energia livre de reação (**Reac** \rightarrow **Prod**); ΔG_1 é a energia livre de ativação para o primeiro passo da reação (**Reac** \rightarrow **TS1**); ΔG_{-1} é a energia livre de ativação para o processo inverso (**Int** \rightarrow **TS1**); ΔG_2 é a energia livre de ativação para o segundo passo da reação (**Int** \rightarrow **TS2**); k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes de velocidade associadas e, k_{obs} é a constante de velocidade calculada para o mecanismo proposto, $k_{obs} = (k_1 k_2) / (k_{-1} + k_2)$. Valores das energias livres de reação e ativação em kcalmol⁻¹.

A análise da Tabela 3.2 revela que ambos os métodos predizem a primeira parte da reação, a formação do intermediário **Int**, como a etapa determinante da velocidade da reação.

Os métodos M06 e MP2 predizem o mesmo valor (33,2 kcalmol⁻¹) para a energia de ativação

da primeira etapa, na fase gasosa, e difere apenas em $0,3 \text{ kcalmol}^{-1}$ em solução. No entanto, o valor computado com o funcional B3LYP é quase 4 kcalmol^{-1} maior em fase gasosa e em solução, quando comparado com os resultados M06 e MP2. Por outro lado, a energia de ativação computada para a segunda etapa da reação, calculada em fase gasosa para ambos os métodos DFT, concordam muito bem entre si, dentro de $0,1 \text{ kcalmol}^{-1}$ de variação, e divergem do resultado calculado MP2 de $4,1 \text{ kcalmol}^{-1}$. Curiosamente, a inclusão dos efeitos do solvente produz uma energia livre de ativação negativa inconsistente de $\sim 1 \text{ kcalmol}^{-1}$ para ambos os métodos DFT. Os resultados MP2 mostram que a barreira para a segunda etapa diminui pela metade com a inclusão dos efeitos do solvente. Tomando os resultados mais consistentes produzidos pelos cálculos MP2/6-311++G(2d,2p), podemos dizer que a hidrólise neutra (ou espontânea) do paraoxon ocorre em duas etapas, com energias livres de ativação de $31,8$ e $1,9 \text{ kcalmol}^{-1}$ para a primeira e segunda etapas da reação, respectivamente, e tem uma energia livre total de reação de $-9,3 \text{ kcalmol}^{-1}$. Mais importante é que a relação k_{-1}/k_2 apresenta o valor de $4,7 \times 10^{-8}$, o que mostra claramente que a formação das espécies intermediárias através do **TS1** é a etapa determinante da velocidade da reação.

No início dos anos 1970, Gomaa e Faust investigaram a hidrólise dos pesticidas paration e paraoxon em solução aquosa.⁴⁴ Os experimentos de hidrólise foram conduzidos em soluções tamponadas com ortofosfato $0,2 \text{ M}$ e os autores descobriram que em pH $7,4$ a reação exibe uma cinética de primeira ordem, com $k_{\text{obs}} = 8,05 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ e tempo de meia-vida de 3450 h (~ 5 meses). Como pode ser visto na Tabela 3.2, a constante de velocidade $k_{\text{obs}} = 3,05 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, calculada no nível de teoria MP2/6-311++G(2d,2p) é pelo menos 1000 vezes menor que constante experimental obtida em solução tamponada, com pequenas quantidades do catalisador OH^- . É importante mencionar que, para se obter resultados cinéticos significativos, é obrigatório o uso de alto nível de teoria (CCSD(T) ou MRCI, por exemplo) e com funções de base muito grandes, uma vez que desvios de $5-10\%$ na barreira de energia computada,

pode levar a grandes desvios nas constantes de velocidade obtidas teoricamente. A energia livre de ativação para o análogo do paraoxon, o composto dimetil 4-nitrofenil paraoxon, também conhecido como metil paraoxon, foi determinada experimentalmente obtendo-se a barreira de 29,6 kcalmol⁻¹.³¹ Esse valor experimental foi reproduzido em excelente concordância no estudo teórico de Mora *et al.*³¹ no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d), no qual três moléculas de água também foram empregadas no mecanismo proposto. Comparando com nosso resultado MP2/6-31++G(2d, 2p) de 31,8 kcalmol⁻¹ para a energia livre de ativação, podemos concluir que a mudança de um grupo metil por um grupo etila altera a energia de ativação em ~ 2 kcalmol⁻¹, levando a uma redução de pelo menos 100 vezes na constante de velocidade global para a hidrólise neutra.

Sumarizando, em uma visão geral através do mecanismo obtido neste estudo é possível ver que a reação prossegue como se um próton proveniente de uma molécula de água fosse transferido para o grupo de saída mediado pelas moléculas de água do meio através de uma protonação intermediária da ligação P=O. A primeira etapa da reação tem um estado de transição semelhante ao obtido em estudos de hidrólise alcalina. No entanto, em contraste com os estudos anteriores sobre a hidrólise alcalina, a espécie intermediária, **Int**, tem uma ligação P-O protonada formando ligações de hidrogênio com as moléculas de água do meio. Acreditamos que esses fatores são cruciais para a estabilização do intermediário pentacoordenado e, portanto, contribuem para que a reação ocorra em duas etapas. A maioria dos estudos teóricos sobre a hidrólise alcalina do paraoxon, e triésteres de fosfato em geral, não incluiu moléculas de água explícitas (reativas) na parte do sistema tratada por cálculos quânticos e, portanto, não permitem os processos de transferência de prótons envolvendo o meio e o grupo fosforila, levando à conclusão de que a reação prossegue em uma única etapa concertada A_ND_N. Como será mostrado no capítulo 4 desta tese de Doutorado, investigamos a hidrólise do paraoxon promovida pelo sítio ativo Cd²⁺/Cd²⁺ da fosfotriesterase.⁴⁵ De forma

análoga, o mecanismo segue a mesma catálise básica geral na qual as moléculas de água coordenadas ao sítio beta de Cd^{2+} atuam como nucleófilo e base geral. Um estado de transição semelhante para a etapa determinante de velocidade, bem como o intermediário pentacoordenado obtido na hidrólise neutra foram encontrados para o mecanismo enzimático. Entretanto, a barreira de energia computada para o processo enzimático é $\sim 2,5$ vezes menor que a barreira para a hidrólise neutra. Essa menor barreira energética pode estar associada ao papel desempenhado pelo metais de Cd^{2+} para orientar o substrato para o ataque nucleofílico, como será mostrado no próximo capítulo

3.4 Considerações Finais

Neste capítulo desta tese analisamos a hidrólise neutra (ou espontânea) do paraoxon em solução aquosa no nível de teoria DFT e usando uma combinação de solvatação local do grupo fosforila com moléculas de água explícitas e, tratando os efeitos do solvente de longo alcance usando o modelo de solvatação contínuo polarizável. Os resultados mostraram que a reação ocorre em duas etapas, através de um mecanismo associativo-dissociativo ($A_N + D_N$), com a formação de um intermediário fosforano pentacoordenado. A reação tem energias livres de ativação de 31,8 e 1,9 kcalmol⁻¹ para a primeira e segunda etapas, respectivamente, e tem uma energia livre total de reação de -9,3 kcalmol⁻¹, calculada no nível de teoria MP2/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31+G(d) nível de teoria. A hidrólise neutra é muito lenta e, tem uma constante de velocidade global de $3,05 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, calculada no mesmo nível de teoria, o que significa que este pesticida permanecerá por vários anos em ambientes aquosos neutros. Em geral, a reação prossegue com transferência de prótons da molécula de água nucleofílica para o grupo de saída. Ou seja, a molécula de água atua como base geral, gerando o nucleófilo OH^- *in situ*. A descrição mecânico-quântica das moléculas de água de solvatação local (reativas) foi essencial para descrever os processos de transferência de prótons ao longo da

coordenada da reação e também para estabilizar o intermediário pentacoordenado formado. Extrapolando para a catálise enzimática, os resultados aqui apresentados mostram que as moléculas de água no sítio ativo da fosfotriesterase podem atuar como base geral e nucleofílica nas reações de hidrólise dos triésteres de fosfato e, de fato, encontramos esse comportamento para a fosfotriesterase substituída com Cd^{2+} . Estes resultados são apresentados no próximo capítulo desta tese de doutorado.

3.5 Referências Bibliográficas

- (1) Knowles, J. R. Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 877-919.
- (2) Westheimer, F. H. Why Nature Chose Phosphates. *Science* **1987**, 235, 1173-1178.
- (3) Cleland, W. W.; Hengge, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3252-3278.
- (4) Lassila, J. K.; Zalata, J. G.; Herschlag, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, 80, 669-702.
- (5) Karmelin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. Why Nature Really Chose Phosphate. *Q. Rev. Biophys.* **2013**, 46, 1-132.
- (6) Kirby, A. J.; Nome, F. Fundamentals of Phosphate Transfer. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1806-1814.
- (7) Prasad, B. R.; Plotnikov, N. V.; Warshel, A. Addressing Open Questions About Phosphate Hydrolysis Pathway by Careful Free Energy Mapping. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 153-163.

- (8) Plotnikov, N. V.; Prasad, B. R.; Chakrabarty, S.; Chu, Z. T.; Warshel, A. Quantifying the Mechanism of Phosphate Monoester Hydrolysis in Aqueous Solution by Evaluating the Relevant Ab Initio QM/MM Free Energy Surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 12807-12819.
- (9) Kirby, A. J.; Mora, J. R.; Nome, F. New Light on Phosphate Transfer from Triesters. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1834, 454-463.
- (10) Kirby, A. J.; Souza, B. S.; Nome, F. Structure and Reactivity of Phosphate Diesters. Dependence of the Nonleaving Group. *Can. J. Chem.* **2015**, 93, 422-427.
- (11) Duarte, F.; Barrozo, A.; Aqvist, J.; Williams, N. H.; Karmelin, S. C. L. The Competing Mechanisms of Phosphate Monoester Dianion Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 10664–10673.
- (12) Ferreira, D. E. C.; Boldt, I. S.; De Almeida, W. B.; Rocha, W. R.; Nome, F. Quantum Mechanical/Effective Fragment Potential (QM/EFP) Study of Phosphate Diester Cleavage in Aqueous Solution. *Comput. Theor. Chem.* **2014**, 1043, 5-12.
- (13) Pereira, E. S.; Da Silva, J. C. S.; Brandão, T. A. S.; Rocha, W. R. Phosphorane Lifetime and Stereo-Electronic Effects Along the Alkaline Hydrolysis of Phosphate Esters. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 18255-18267.
- (14) Lad, C.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. The Rate of Hydrolysis of Phosphomonoester Dianions and the Exceptional Catalytic Proficiencies of Protein and Inositol Phosphatases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, 100, 5607-5610.
- (15) Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. The Time Required for Water Attack at the Phosphorus Atom of Simple Phosphodiester and of DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, 103, 4052-4055.

- (16) Aubert, A. D.; Li, Y.; Raushel, F. M. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry* **2004**, 43, 5707-5715.
- (17) Mitic, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3338-3363.
- (18) Erickson, B. E. Chlorpyrifos Sparks Outcry. *C&EN* **2017**, 95, 27-30.
- (19) Kennedy, D. J.; Mayer, B. P.; Baker, S. E.; Valdez, C. A. Kinetics and Speciation of Paraoxon Hydrolysis by Zinc(II)-Azamacrocyclic Catalysts. *Inorg. Chim. Act.* **2015**, 436, 123–131.
- (20) Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A.; Nerve Agent Stereoisomers: Analysis, Isolation, and Toxicology. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 368-374.
- (21) Kirby, A. J.; Holfelder, F. *From Enzyme Models to Model Enzymes*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2009**.
- (22) Bigley, A. N.; Raushel, F. M. Catalytic Mechanisms for Phosphotriesterases. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1834, 443–453.
- (23) Dumas, D. P.; Caldwell, S. R.; Wild, J. R.; Raushel, F. M. Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas Diminuta*. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 19659-19665.
- (24) Purcell, J.; Hengge, A. C. The Thermodynamics of Phosphate versus Phosphorothioate Ester Hydrolysis. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8437-8442.
- (25) Caldwell, S. R.; Raushel, F. M.; Weiss, P. M.; Cleland, W. W. Transition-State Structures for Enzymatic and Alkaline Phosphotriester Hydrolysis. *Biochemistry*, **1991**, 30, 7444-7450.

- (26) Zheng, F.; Zhan, C. G.; Ornstein, R. L. Theoretical Studies of Reaction Pathways and Energy Barriers for Alkaline of Phosphotriesterase Substrates and Related Toxic Phosphofluoridate Nerve Agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, 2, 2355-2363.
- (27) Khan, M. A. S.; Bandyopadhyay, T.; Ganguly, B. Probing the Simulant Behavior of PNPDP toward Parathion and Paraoxon: A computational Study. *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, 34, 10-17.
- (28) Canut, V. L.; Pernía, J. J. R. P.; Castillo, R.; Moliner, V.; Tuñón, I. Hydrolysis of Phosphotriesters: A Theoretical Analysis of the Enzymatic and Solution Mechanisms. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 9612-9621.
- (29) Tarrat, N. Alkaline Hydrolysis of Phosphate Triesters in Solution: Stepwise or Concerted? A Theoretical Study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2010**, 941, 56-60.
- (30) Zhang, L.; Xie, D.; Xu, D.; Guo, H. Supermolecule Density Functional Calculations Suggest a Key Role for Solvent in Alkaline Hydrolysis of *p*-Nitrophenyl Phosphate. *Chem. Comm.* **2007**, 0, 1638-1640.
- (31) Mora, J. R., Kirby, A. J., Nome, F. Theoretical Study of the Importance of the Spectator Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 7061-7070.
- (32) Parr, R. G.; Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, **1989**
- (33) Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Dover Publications, New York, **1996**
- (34) Becke, A. D. Density- Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.

- (35) a) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 9. Extended Gaussian-type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.*, 1971, **54** (1971) 724. b) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. The influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies. *Theor. Chim. Acta* **1973**, 28, 213-222.
- (36) Fukui, K. The path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 363-368.
- (37) Gonzalez, C.; Schlegel, H. B. An Improved Algorithm for Reaction Path Following. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 2154-2161.
- (38) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-class Functionals and 12 other Functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215-241.
- (39) [Krishnan](#), R.; [Binkley](#), J. S.; [Seeger](#), R.; Pople, J. A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 650-654.
- (40) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6378-6396.
- (41) Breneman, C. M.; Wiberg, K. B. Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials. The Need for High Sampling Density in Formamide Conformational Analysis. *J. Comput. Chem.* **1990**, 11, 361-373.
- (42) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.;

Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

(43) Xia, F.; Tian, K.; Zhu, H. Density Functional Calculations on Alcoholysis and Thiolytic of Phosphate Triesters: Stepwise or Concerted? *Comput. Theor. Chem.* **2013**, 1017, 60-71.

(44) Gomaa, H. M.; Faust, S. D. Chemical Hydrolysis and Oxidation of Parathion and Paraoxon in Aquatic Environments, in: Faust, S. D. (Ed.) *Advances in Chemistry: Fate of Organic Pesticides in Aquatic Environment*, Chapter 10, pp. 189-209, 1972. American Chemical Society, Washington, DC, 1972.

(45) Chagas, M. A.; Pereira, E. S.; Godinho, M. P. B.; Da Silva, J. C. S.; Rocha, W. R. A Base Mechanism to the Hydrolysis of Phosphate Triester Promoted by the Cd²⁺/Cd²⁺ Active site of Phosphotriesterase: A Computational Study. Submitted for publication in *Inorg. Chem.*

Capítulo 4: Mecanismo para a Hidrólise de Triésteres de Fosfato Promovido pela Fosfotriesterase Substituída por Cd(II)-Cd(II)

4.1 Introdução

A enzima fosfotriesterase (PTE)¹⁻⁴ de *Pseudomonas diminuta* é particularmente atraente como biocatalisador, pois pode hidrolisar um grande número de triésteres de fosfato.⁶⁻⁸ Essa enzima, em sua forma nativa, possui um sítio ativo contendo cátions metálicos divalentes de zinco. Os dois íons Zn^{2+} nativos podem ser substituídos por Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} com o restabelecimento completo da atividade catalítica.⁹ O notável aumento da hidrólise dos organofosfatos catalisados através da enzima nativa de PTE pode ser exemplificado com paraoxon (dietil 4-nitrofenil fosfato).^{10,11} Aubert, Li e Raushel⁹ mediram a taxa de constante cinética para a hidrólise do paraoxon pelo tipo nativo de PTE com $k_{cat} = 2300 \pm 60 \text{ s}^{-1}$ a 298 K, que pode ser traduzido em uma barreira de energia livre de ativação de $12,9 \text{ kcalmol}^{-1}$. A hidrólise alcalina do paraoxon em solução aquosa ocorre com uma constante de velocidade de segunda ordem de $7,5 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 298 K com uma barreira de energia livre de ativação de $18,9 \text{ kcalmol}^{-1}$. Portanto, a eficiência catalítica do PTE na hidrólise do paraoxon aproxima-se dos limites de ser controlada por difusão¹² e, a alta especificidade de PTE torna o paraoxon o melhor substrato para estudos mecanísticos.

Os aspectos dos mecanismo de reação envolvidos na hidrólise enzimática de organofosforados são de grande interesse, devido à potencial aplicação na biorremediação, e tem sido objeto de intensa pesquisa.^{13,14} O mecanismo catalítico proposto para a enzima fosfotriesterase, a partir de *Pseudomonas diminuta*, usando diferentes técnicas experimentais sugerem: i) o ataque nucleofílico é dirigido ao centro de fósforo e não ao grupo de saída⁶, ii) um mecanismo associativo com mudanças significativas na ordem de ligação para ambos os átomos de oxigênio fosforilado e fenólico do grupo de saída no estado de transição¹², iii) a

participação do grupo coordenado em ponte, μ -hidroxo, como o nucleófilo para a hidrólise enzimática do paraoxon.^{15,16} No entanto, outras enzimas triesterases que degradam organofosfatos como *Agrobacterium radiobacter* (OpdA) exibem mais flexibilidade em seu mecanismo de ação.¹⁷ As PTEs de *P. diminuta* e OpdA compartilham mais de 90% da identidade na sequência primária entre os resíduos de aminoácidos. Elas têm os mesmos aminoácidos coordenados aos metais e a única variação significativa para a catálise é encontrada em três resíduos no bolsão de ligação do substrato nas posições 254 (Arg/His), 257 (Tyr/His) e 272 (Phe/Leu) de OpdA/PTE de *P. diminuta*, respectivamente. Verifica-se que, apesar da alta similaridade, essas duas enzimas exibem variações significativas no mecanismo de reação e na especificidade do substrato. O mecanismo proposto para a enzima PTE de *P. diminuta* sugere a coordenação do substrato no íon metálico β mais exposto ao solvente e posterior hidrólise iniciada pelo ataque do grupo hidróxido que une os dois centros metálicos por uma coordenação em ponte.⁹ Jackson *et al.*²⁰, baseados em suas análises cristalográficas de OpdA de bactérias com os íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ no sítio ativo, mostraram que o ligante em ponte μ -hidroxo não é nucleofílico, mas atua auxiliando a desprotonação de uma molécula de água nucleofílica, terminalmente coordenada ao metal localizado no sítio α que inicia a reação de hidrólise. Estudos com compostos biomiméticos mostram, também, a coordenação no sítio do metal α por $\text{OH}^-/\text{água}$ e que atuam como nucleófilos para a reação.²¹ Schenk e colaboradores¹⁸ descobriram que para os derivados de Zn^{2+} e Cd^{2+} de OpdA apenas um equilíbrio de protonação relevante foi encontrado ($\text{pK}_a \sim 4\text{-}5$), consistente com o ligante μ -hidroxo atuando como nucleófilo. No entanto, os autores também encontraram para a OpdA com Co^{2+} dois equilíbrios de protonação ($\text{pK}_{a1} \sim 5$ e $\text{pK}_{a2} \sim 10$) que foram identificado como relevantes para a catálise, sugerindo que um íon hidróxido terminal atua como o nucleófilo. Schenk e colaboradores²² também demonstraram que na OpdA existe uma extensa rede de ligações de hidrogênio que conecta o bolsão de ligação do substrato ao centro

metálico, envolvendo três aminoácidos (Arg254, Tyr257 e Phe272) que é responsável pela especificidade do substrato e por flexibilidade no mecanismo de reação. Na enzima homóloga *pdPTE* essa rede de ligação de hidrogênio não está presente uma vez que os resíduos His254 e His255 estão presentes em vez de Arg254 e Tyr257. Em princípio, a falta desta rede de ligações de hidrogênio na enzima *pdPTE* torna o mecanismo menos influenciado pelos resíduos da segunda esfera de coordenação e mais dependente do ambiente químico local ao redor do sítio ativo, especialmente no sítio β . Assim, embora *pdPTE* e *OpdA* compartilhem ~ 90% da identidade de sequência primária, a diferença em relação a esses resíduos chave em torno do sítio ativo pode produzir variações consideráveis em relação à sua eficiência e seletividade catalítica. Portanto, estas descobertas experimentais mostram que o mecanismo envolvido na degradação de organofosfatos por PTEs é dependente do pH e da composição do metal.

Estudos computacionais confirmaram algumas propostas mecanicistas para as PTEs. No entanto, a maioria dos estudos teóricos sobre o mecanismo de hidrólise de triésteres de fosfato por PTEs tem sido focada na fosfotriesterase nativa contendo dois íons Zn^{2+} no sítio ativo. Entretanto, é importante mencionar que outras classes de triesterases, contendo diferentes íons de metais de transição, também foram objeto de estudos computacionais recentes.²³⁻²⁵ Isso pode ser atribuído em parte à falta de parâmetros de campo de força para descrever o sítio ativo de PTEs, substituídas por Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} , em cálculos QM/MM e também porque a configuração eletrônica de camada fechada do Zn^{2+}/Zn^{2+} da enzima PTE torna este sistema mais atraente para cálculos completos por mecânica quântica ou através de modelos de cluster.

Utilizando um modelo de cluster do sítio ativo da enzima Zn^{2+}/Zn^{2+} nativa de PTE, composto por 82 átomos, Chen, Fang e Himo²⁶ investigaram a reação de hidrólise do metilparaoxon e obtiveram um mecanismo de duas etapas, com a formação de um

intermediário pentacoordenado. A etapa determinante da velocidade de reação calculada apresentou uma barreira de energia de ativação de $10,8 \text{ kcalmol}^{-1}$, no nível de teoria B3LYP/6-311++G(2d,2p), para o ataque direto do hidróxido em ponte ao substrato, comparado favoravelmente com o valor experimental de $12,9 \text{ kcalmol}^{-1}$. A capacidade do ligante em ponte OH^- para atuar como base, foi investigada por Kim *et al.*²⁷ adicionando uma molécula de água ao íon de Zn_α e usando a mesma abordagem de cluster. Os autores descobriram que a molécula de água não fica coordenada com o metal Zn_α , e que adota uma geometria pentacoordenada. A molécula de água prefere interagir com o ligante OH^- em ponte, que atua como base, desprotonando a molécula de água, que por sua vez ataca o substrato. Em contraste com o trabalho anterior, os autores obtiveram um mecanismo de etapa única com barreira de energia de ativação de $17,3 \text{ kcalmol}^{-1}$ calculado no mesmo nível da teoria. Portanto, a diferença nas barreiras energéticas mostra que o ligante em ponte OH^- atuando como nucleófilo pode ser a via preferencial.

Em outro estudo computacional, Wong e Gao²⁸ investigaram a hidrólise do paraoxon pela enzima $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -PTE nativa incluindo a enzima inteira por meio de cálculos híbridos QM/MM, e levando em consideração os efeitos dinâmicos da proteína tratados por simulações de dinâmica molecular (QM/MM/MD). Os autores mostraram a importância da segunda esfera de resíduos de aminoácidos, não incluída nos estudos anteriores via os modelos de cluster. Em seu mecanismo, o resíduo His254 é protonado e perde o próton para o solvente, à medida que o grupo de saída se afasta do sítio ativo. A His254 também atua como base ativando e desprotonando uma molécula de água nucleofílica. Verificou-se que o produto permanecia protonado e coordenado apenas no átomo metálico de Zn_β . É importante mencionar aqui que Pedroso *et al.*¹⁹ mostraram que o aminoácido da segunda esfera na posição 254 (Arg em OpdA e His em PTE de *P. Diminuta*) desempenha um papel crucial na modulação da preferência e ligação do substrato nestas enzimas. No caso de OpdA, a posição

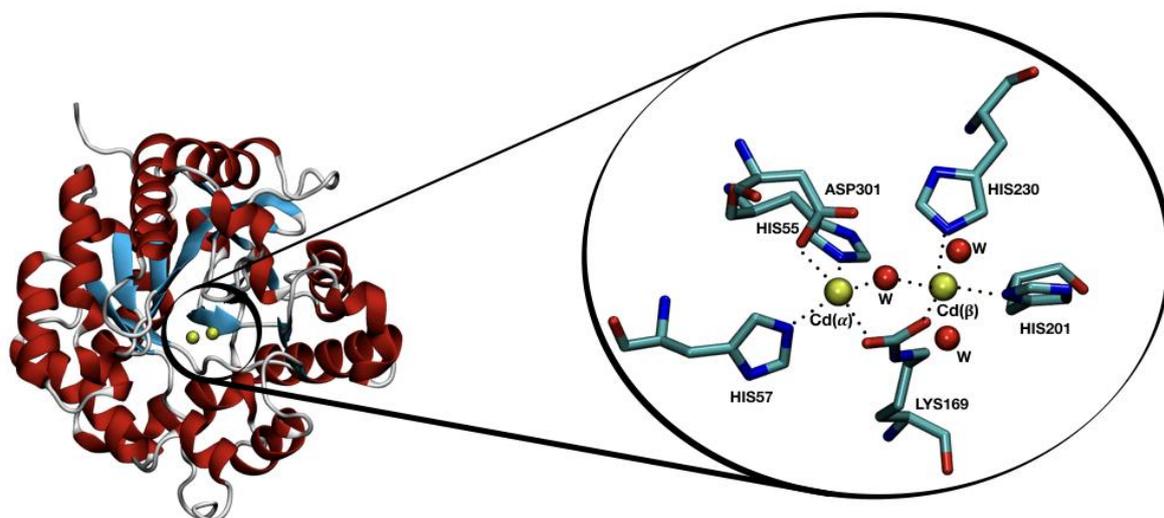
254 é ocupada por um aminoácido de arginina, envolvido em uma extensa ligação de hidrogênio que conecta o bolsão de ligação ao substrato e que está associado à especificidade da enzima, tendo, por isso, um papel diferente do encontrado por Wong e Gao para a enzima nativa Zn^{2+}/Zn^{2+} de PTE. Demonstrou-se também que os efeitos de segunda esfera de resíduos de aminoácidos desempenham um papel importante na atividade catalítica de compostos biomiméticos, como foi mostrado recentemente por Camargo *et al.*²⁹ com compostos biomiméticos de fosfatase ácida púrpura. Wong e Gao encontraram um mecanismo com um único estado de transição. No entanto, foi encontrado um platô de estado de transição na superfície do potencial de força média da reação, semelhante em natureza ao estado intermediário obtido com o modelo de cluster.²⁶ A barreira de energia computada de $18,3 \text{ kcalmol}^{-1}$, no nível de teoria B3LYP//AM1:MM, apresentando cerca de $\sim 6 \text{ kcalmol}^{-1}$ maior energia do que o valor derivado da constante de velocidade experimental para a enzima nativa.⁸ Mo e colaboradores³⁰ empregaram simulações moleculares QM(PM3)/MM/MD para investigar a hidrólise do paraoxon também pela enzima Zn^{2+}/Zn^{2+} -PTE, usando parâmetros PM3 re-otimizados para o átomo de fósforo. Os autores também descobriram que o substrato se liga ao átomo de Zn_{β} mais exposto ao solvente e o ligante μ -hidroxo atua como o nucleófilo. Curiosamente, os autores descobriram que o a etapa limitante da taxa de velocidade da reação está associada à distorção do paraoxon para acessar o nucleófilo em ponte OH^- e a reação subsequente S_N2 prossegue rapidamente. A barreira de energia foi calculada obtendo-se $18,7 \text{ kcalmol}^{-1}$, que também foi alta em comparação com os dados experimentais disponíveis para a catálise enzimática. Posteriormente, Tuñón e colaboradores³¹ estudaram a hidrólise do paraoxon por Zn^{2+}/Zn^{2+} -PTE e também em solução aquosa, utilizando simulações híbridas de QM(AM1-d)/MM/MD. Os autores descobriram que, tanto em solução aquosa como no sítio ativo de PTE, a hidrólise do paraoxon segue um mecanismo A_ND_N ou associativo, com o ligante OH^- atuando como nucleófilo. A barreira de energia de

ativação foi calculada em $10,1 \text{ kcalmol}^{-1}$, que é apenas $2,8 \text{ kcalmol}^{-1}$ abaixo do valor experimental. Além disso, outros estudos mostraram que a natureza dos íons no sítio ativo de PTEs pode ter um impacto significativo na reatividade para a hidrólise de triésteres.^{9,31} Por exemplo, Aubert, Li e Rauschel⁹, mostraram que a enzima PTE substituída por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ tem uma eficiência catalítica em torno de 5 vezes maior que a eficiência da enzima nativa. Este aumento catalítico promovido pela substituição por Cd^{2+} também é observado em OpdA^{19} e na enzima glicerofosfodiesterase de *Enterobacter aerogenes* (GpdQ).³³ Portanto, um estudo do mecanismo de reação, em nível atômico, é de grande interesse e pode fornecer informações importantes sobre os efeitos de diferentes íons metálicos no mecanismo e desempenho catalítico das PTEs.

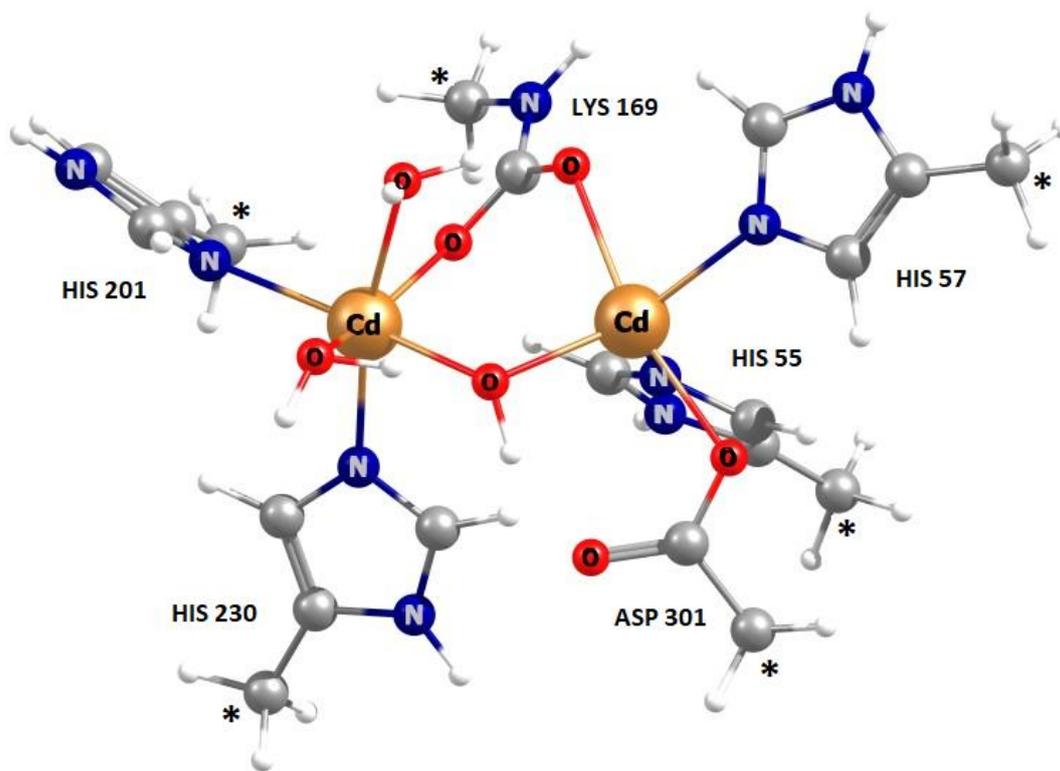
Neste capítulo da tese, realizamos um estudo sistemático da hidrólise do organofosfato paraoxon (dietil 4-nitrofenil fosfato), promovido pela fosfotriesterase substituída por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$. Detalhes do mecanismo de reação enzimática foram obtidos por cálculos mecânico quânticos, no nível da Teoria Funcional de Densidade (DFT)³⁵, usando um modelo estrutural do sítio ativo da enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE. Aspectos estruturais do sítio ativo e comparações com a enzima nativa de $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE foram realizados e suas interações com o substrato paraoxon foram analisadas. Como veremos a interação do substrato com o sítio ativo é bem diferente para essas duas PTEs. Em contraste com o mecanismo aceito para o $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE, que envolve o ligante μ -hidroxo como nucleófilo, propomos um novo mecanismo para a hidrólise do paraoxon promovida pela enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE na qual as espécies nucleófilas são formadas *in situ*, através da ativação de uma molécula de água presente no sítio ativo da enzima. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo computacional sobre o mecanismo da fosfotriesterase substituída por Cd^{2+} .

4.2 Detalhes Computacionais

O modelo de cluster do sítio ativo da enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE foi construído com base na estrutura cristalina de alta resolução relatada por Benning *et al.*³⁴ (código PDB 1JGM). Como pode ser visto na figura 4.1, os cinco aminoácidos da primeira esfera de coordenação (His55, His57, His201, His230 e Asp301) coordenados diretamente aos íons Cd^{2+} estão incluídos no modelo. Os metais são ligados pelo grupo carboxilato de lisina (Lys169) e um ligante μ -hidroxo. Os dois íons metálicos são designados como α e β . O metal β é mais exposto ao solvente e coordenado por duas moléculas de água. Os resíduos de histidina foram modelados como metilimidazóis, a Lys169 como metilamina carboxilada e o Asp301 como acetato. Portanto, o modelo de cluster do sítio ativo apresenta um total de 74 átomos, 370 elétrons, carga +1 e estado de spin singlete.



(A)



(B)

Figura 4.1: (A) Estrutura cristalográfica da fosfotriesterase de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de *Pseudomonas diminuta*²⁸ com zoom no sítio ativo mostrando os resíduos e moléculas de água coordenadas aos centros metálicos. (B) Modelo estrutural do sítio ativo da fosfotriesterase $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ utilizado neste trabalho. Átomos de carbono marcados com asterisco foram mantidos congelados durante as otimizações geométricas para levar em consideração os efeitos estéricos do ambiente enzimático.

As otimizações de geometria foram realizadas empregando-se a DFT²⁹ e usando o funcional híbrido GGA B3LYP^{36,37} incluindo a correção de dispersão D3 proposta por Grimme e colaboradores³⁸ empregando o conjunto de funções de base 6-31+G(d)³⁹⁻⁴¹ para os elétrons dos átomos de C, H, O, P e N. Os elétrons internos de Cd^{2+} e Zn^{2+} foram tratados com pseudopotencial LANL2DZ⁴² e os elétrons de valência tratados com o conjunto de

funções de base duplo- ξ LANL2DZ⁴². Restrições de coordenadas congeladas foram aplicadas às coordenadas atômicas dos átomos de carbono terminais do modelo, como mostrado na Figura 4.1, a fim de levar em conta os efeitos estéricos do ambiente protéico. Os efeitos eletrostáticos do ambiente protéico foram modelados usando o modelo de solvatação contínuo SMD⁴³ com uma constante dielétrica igual a 4. Os cálculos de frequência foram realizados nas estruturas otimizadas para caracterizar os pontos estacionários e também para obter as propriedades termodinâmicas dentro das aproximações do oscilador harmônico e do rotor rígido.

A fim de verificar a aplicabilidade do nosso modelo de cluster para descrever os parâmetros estruturais do sítio ativo, comparamos os cálculos DFT no modelo de cluster com um cálculo híbrido QM/MM do tipo ONIOM^{44,45}, realizado em toda a enzima Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE. A parte QM do cálculo ONIOM foi descrita pelo mesmo nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ empregado no sistema modelo e, a parte MM foi descrita com o campo de força universal UFF.⁴⁶ A parte QM incluiu os mesmos resíduos e moléculas de água do modelo de cluster. Átomos de hidrogênio foram usados como átomos de ligação conectando as duas partes QM e MM. Além disso, a fim de verificar a flexibilidade do modelo de cluster para descrever os parâmetros estruturais do sítio ativo, otimização de geometria com um modelo de cluster maior também foi realizada. Neste modelo, os resíduos de aminoácidos completos da primeira esfera de coordenação foram incluídos, gerando um modelo com 142 átomos, 550 elétrons, carga +1 e estado de spin singlete, com as mesmas restrições de coordenadas congeladas aos átomos de carbono terminais durante a otimização da geometria.

Dado que as posições de alguns átomos foram mantidas congeladas durante o procedimento de otimização, a matriz Hessiana total foi obtida a partir de um cálculo de frequência padrão, mas apenas o sub-bloco correspondente aos N átomos cujas posições

foram otimizadas foi ponderado em massa e diagonalizado usando o procedimento de Hessiana em blocos.⁴⁷ Essa análise foi realizada por meio de um software próprio desenvolvido no grupo do Prof. Jeremy Harvey.⁴⁸

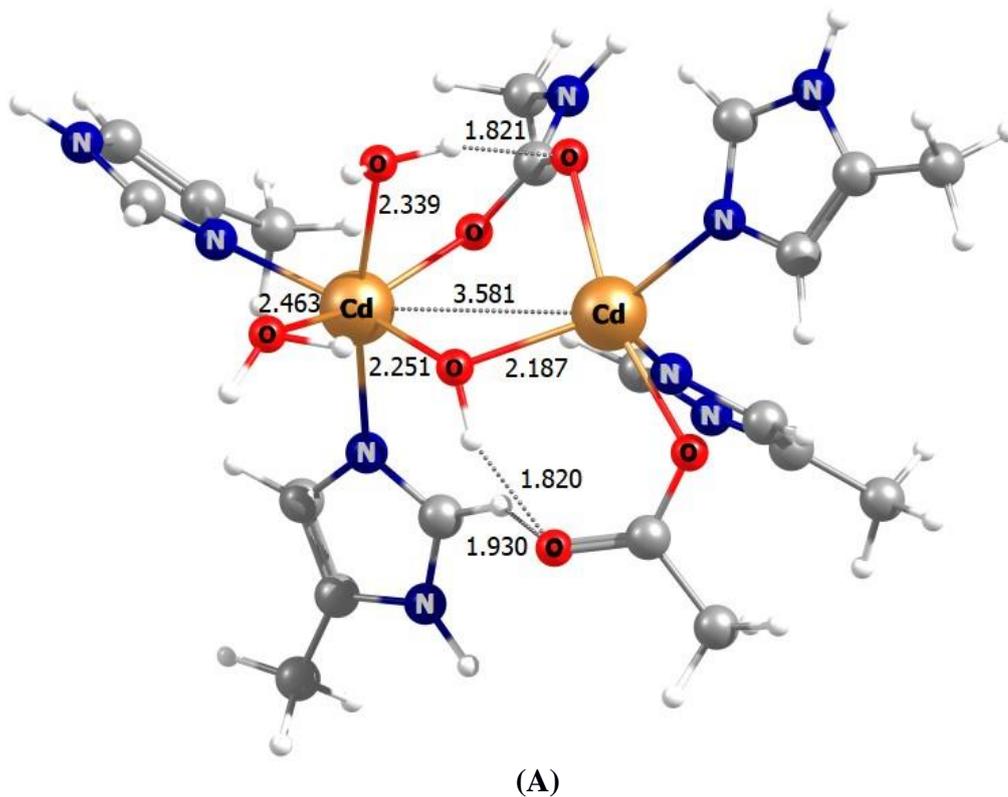
Os detalhes do mecanismo da reação de catálise enzimática foram obtidos através de cálculos de coordenadas de reação intrínseca (IRC)⁴⁹, realizados com o algoritmo de busca de segunda ordem de Gonzalez-Schlegel⁵⁰ a partir das estruturas de estados de transição otimizadas, com um passo de 0,10 (a.m.u.)^{1/2} Bohr. As estruturas finais dos cálculos do IRC foram então totalmente otimizadas e caracterizadas com cálculos de frequência no mesmo nível de teoria. Visando obter melhores resultados energéticos, cálculos de energia no ponto sobre as estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP-D3/6-31+G(d)/LANL2DZ foram realizados com o conjunto de funções de base estendido 6-311++G(2d,2p) e também incluindo os efeitos do solvente com o modelo contínuo do SMD. Todos os cálculos de otimização de geometria e frequência foram realizados usando a versão C.01 do programa Gaussian 09.⁵¹

4.3 Resultados e Discussão

Estrutura do Sítio Ativo

A Figura 4.2 mostra a estrutura inicial dos sítios ativos de Cd²⁺/Cd²⁺ e Zn²⁺/Zn²⁺ da PTE, obtidos das estruturas de raios X.³⁴ A principal diferença entre elas é a presença de duas moléculas de água coordenadas no átomo de Cd mais exposto ao solvente, Cd_β, com distâncias de ligação de 2,339 e 2,463 Å. Isso faz com que o Cd_β adote uma geometria octaédrica distorcida composta pelos resíduos His230, His201, Lys169, duas moléculas de água e o ligante em ponte μ-OH. Por outro lado, o Zn_β adota uma geometria bipiramidal trigonal composta pelos resíduos His230, His201, Lys169, uma molécula de água distante a

2.097 Å do metal e o ligante hidróxido de ligação em ponte. Para ambas as enzimas, o sítio metálico menos exposto ao solvente (Zn_{α} e Cd_{α}) apresenta uma geometria bipiramidal trigonal distorcida composta por His55, His57, Asp301, Lys169 e o ligante em ponte hidróxido. Como veremos adiante, a presença desta segunda molécula de água coordenada ao de Cd_{β} terá um grande impacto na reatividade da enzima.



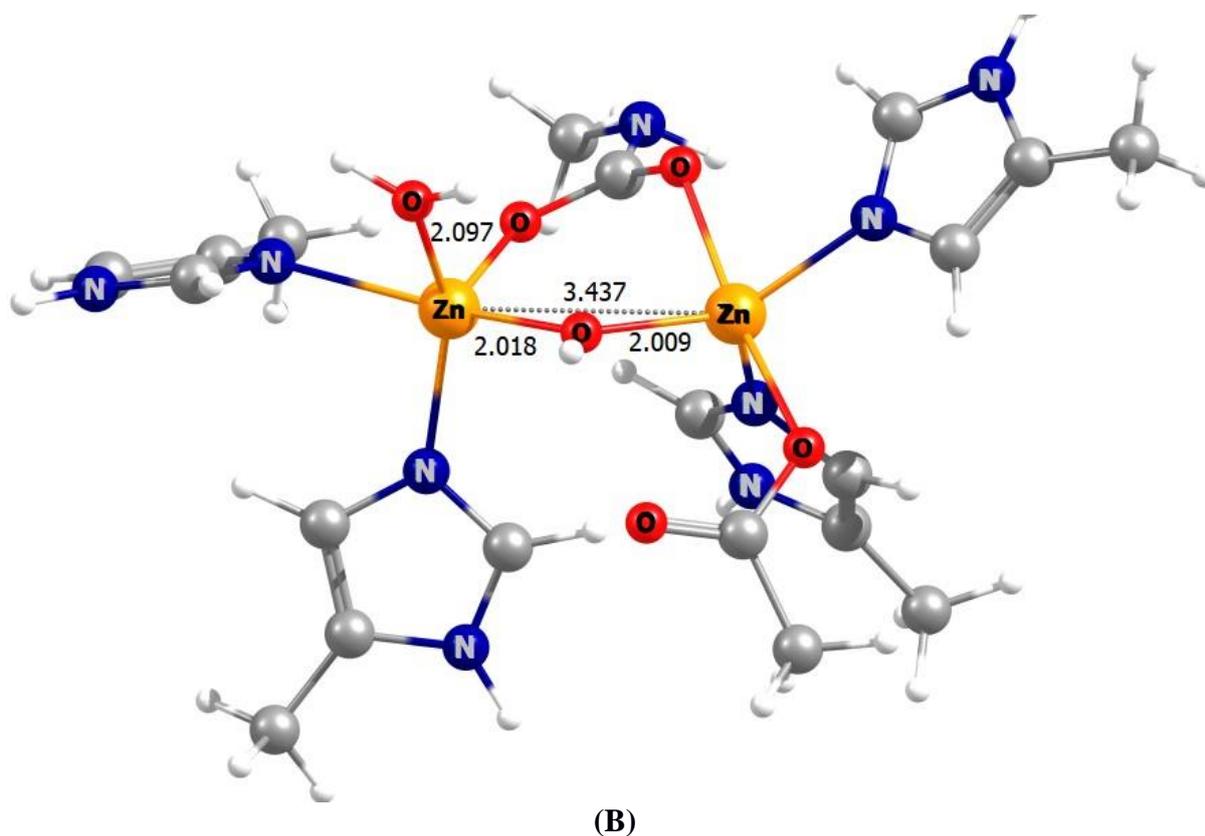
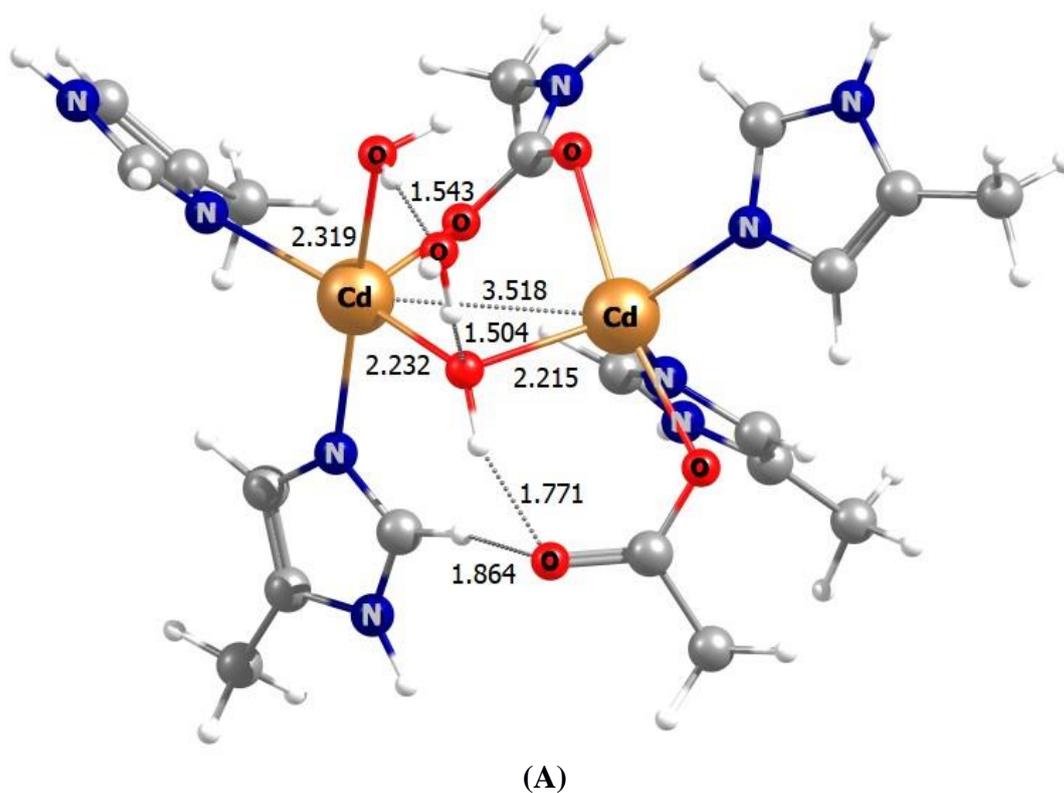


Figura 4.2: Estruturas cristalográficas do sítio ativo da fosfotriesterase de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ (A) e $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (B) de PTE, realçando as principais características estruturais dos sítios ativos. As distâncias das ligações químicas são dadas em Angstrom.

A otimização dos sítios ativos no nível de teoria B3LYP-D3/6-31+G(d)/LANL2DZ, leva à liberação de uma molécula de água. Como também pode ser visto na Figura 4.3, a molécula de água coordenada ao átomo de Zn_β deixa a esfera de coordenação do metal e faz ligação de hidrogênio com o ligante μ -hidroxo, com uma distância HO--H de 1,836 Å. Na otimização do sítio ativo de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE, uma molécula de água coordenada localmente ao átomo de Cd_β deixa a esfera de coordenação e faz uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo o ligante μ -hidroxo (com distância HO--H de 1,504 Å) e a outra molécula de água que permaneceu coordenada ao metal (com distância H_2O -- H_2O de 1,543 Å) e ao resíduo de Asp301. A geometria ao redor do centro metálico β muda drasticamente, assumindo uma geometria tetraédrica para a enzima $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE e uma geometria bipiramidal trigonal distorcida, com alto grau de piramidalidade, para a enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE. Krauss e

colaboradores⁵² também obtiveram uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo a molécula de água coordenada ao sítio metálico de Cd_β, o ligante μ-hidroxo e o resíduo de aminoácido Asp301 na investigação das geometrias de coordenação de Zn²⁺ e Cd²⁺ em PTE de *P. diminuta*, usando a abordagem de potencial de fragmento efetivo para representar o ambiente proteico. Os autores também obtiveram uma geometria bipiramidal trigonal distorcida em torno do sítio metálico α e uma geometria piramidal de base quadrada em torno do sítio β.



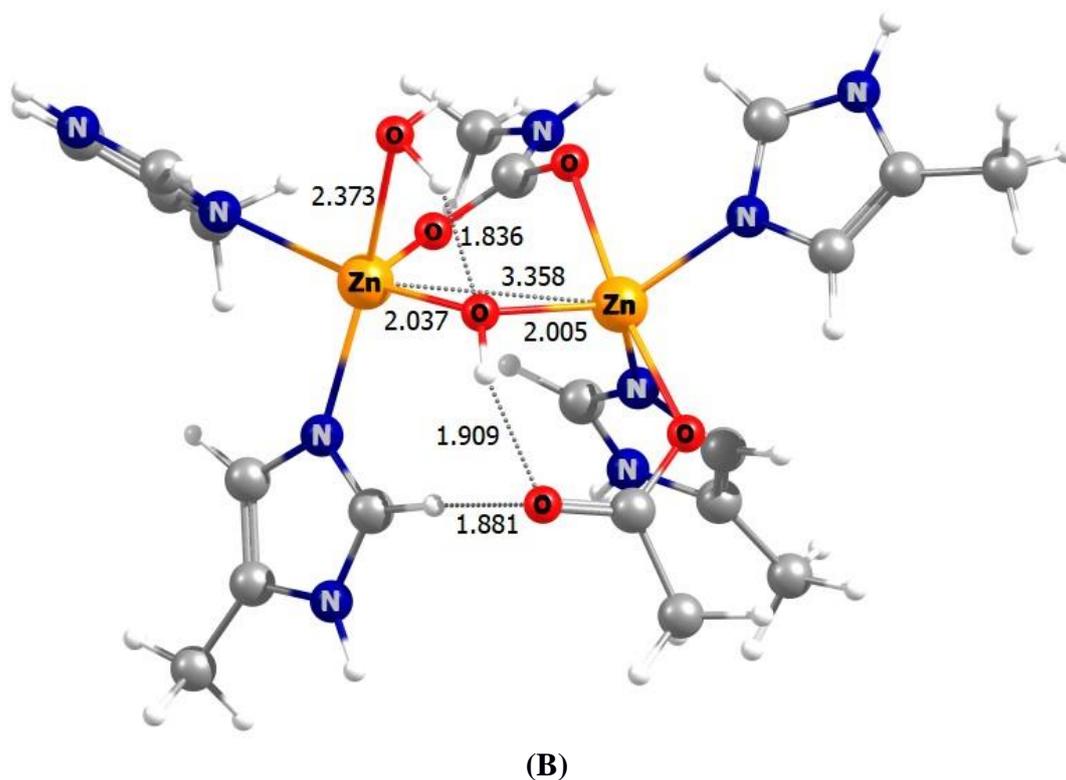


Figura 4.3: Estrutura otimizada no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ para os modelos estruturais dos sítios ativos: (A) $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ e (B) $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE. As principais características estruturais foram destacadas. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

Vale a pena notar que o átomo metálico β mais exposto ao solvente é onde o substrato se coordena à enzima. A mudança de geometria octaédrica para piramidal de base quadrada nesta posição, abre uma posição de coordenação para a ligação do substrato e, portanto, como veremos mais adiante, pode afetar mecanismo de reação enzimático. A enzima $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE, por outro lado, pode ter que apresentar uma penalidade de energia adicional para alterar a geometria local do tipo tetraédrica no átomo de Zn_β para acomodar o substrato. Através de cálculos de scan realizados no modelo de sítio ativo com os íons Zn^{2+} , observamos que a aproximação do paraoxon, diferente da enzima substituída por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$, apresenta uma barreira de energia.

Uma discussão recorrente e importante quando se trata de modelagem molecular teórica de reações enzimáticas é se o modelo de cluster pode de fato reproduzir as características estruturais do sítio ativo da enzima como um todo, já que o ambiente enzimático não é devidamente considerado. Uma maneira de introduzir tais efeitos é usar as abordagens QM/MM nas quais a parte não reativa da enzima é descrita por campos de força empíricos apropriados.^{53,54} Como foi apontado por Siegbahn e Himo⁵⁵, a otimização da geometria é um ingrediente fundamental quando o modelo de cluster do sítio ativo é usado para descrever reações enzimáticas. Portanto, a fim de verificar a adequação do nosso modelo de cluster para descrever a estrutura do sítio ativo da enzima, foi realizada uma otimização da geometria ONIOM em toda a enzima, com a parte QM descrita no nível de teoria B3LYP-D3/6-31+G(d)/LANL2DZ e a parte MM descrita com o campo de força UFF. Além disso, a fim de verificar a flexibilidade do modelo utilizado, também foi realizada a otimização da geometria com um modelo de cluster maior com 142 átomos. Além disso, também comparamos a estrutura obtida com a otimização geométrica do cluster sem qualquer restrição no processo de otimização da geometria do sítio ativo. A Tabela 4.1 mostra o RMSD obtido quando se compara a otimização do cluster do sítio ativo de Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE, com e sem coordenadas congeladas com as estruturas experimentais e otimizadas através do método ONIOM.

Tabela 4.1: Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD) entre o modelo de cluster otimizado do sítio ativo Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE, a estrutura de difração de raios X experimental e a estrutura otimizada através do método ONIOM.

	Experimental ^a		ONIOM	
	Ligações	Ângulos	Ligações	Ângulos
Modelo (<i>frozen</i>) ^b	0,105	6,3	0,056	5,6
	(0,144) ^c	(15,4)	(0,085)	(12,0)
Modelo (<i>free</i>) ^d	0,095	16,6	0,080	13,1
ONIOM ^e	0,181	7,6	-	-

^a Estrutura experimental de raios X retirada da referência 28. ^b Modelo de cluster otimizado no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) com coordenadas congeladas dos átomos de carbono periféricos, conforme descrito no texto. ^c os valores entre parênteses foram obtidos para o modelo de cluster maior com 142 átomos, também com coordenadas congeladas. ^d Modelo de cluster totalmente otimizado no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d) sem coordenadas congeladas. ^e Otimização geométrica da enzima completa com o método híbrido ONIOM(DFT/6-31+G(d):UFF), conforme descrito no texto.

Os dados na Tabela 4.1 mostram claramente que o uso da abordagem de cluster, com coordenadas congeladas dos átomos de carbono periféricas, produz essencialmente a mesma geometria local no sítio ativo como no cálculo ONIOM onde apresenta o RMSD sobre as ligações químicas e ângulos de 0,056 Å e 5,6 graus, respectivamente, quando comparados entre si. Ambos os métodos produzem essencialmente o mesmo desvio em relação aos ângulos de ligação da estrutura experimental, com RMSD de cerca de 7 graus e, o desvio ao longo das ligações químicas é ligeiramente melhor usando o modelo de cluster do sítio ativo, com RMSD de 0,105 Å contra 0,181 Å para o método ONIOM. Ambos os métodos produzem essencialmente o mesmo desvio em relação à estrutura experimental, com RMSD sobre as

ligações químicas e ângulos em torno de 0,3 Å e 7 graus, respectivamente. Claramente, a utilização de um modelo de cluster sem restrições adequadas no processo de otimização, para reproduzir o ambiente da enzima, produz desvios nas ligações químicas e ângulos maiores, como pode ser visto através do maior RMSD obtido quando se compara as geometrias experimentais e ONIOM. Portanto, o uso dessa abordagem pode levar à representação incorreta do sítio ativo e afetar a energia e a descrição correta do mecanismo da reação química enzimática. Como pode ser visto na Tabela 4.1, o aumento de tamanho do modelo de cluster não promove uma melhoria substancial na descrição de parâmetros estruturais no sítio ativo de Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE em comparação com os resultados obtidos usando o modelo menor de cluster. Na verdade, o RMSD calculado sobre os ângulos e ligações químicas é pior. Os dados reportados na Tabela 4.1 para o RMSD calculados em relação à estrutura de raios X indicam que nosso modelo de cluster menor descreve satisfatoriamente os principais parâmetros estruturais do sítio ativo da PTE.

Resumindo, nossos resultados mostram que as moléculas de água coordenadas ao centro metálico reativo β mais exposto ao solvente podem ter um papel importante na reatividade de PTE. Após a otimização, uma molécula de água deixa a esfera de coordenação, alterando a geometria local no centro metálico β , abrindo uma posição de coordenação para a ligação do substrato. Para a enzima Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE, a geometria muda de octaédrica para piramidal de base quadrada, deixando uma posição de coordenação pronta para a coordenação do substrato. Por outro lado, para o sistema nativo Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE, uma penalidade de energia adicional pode estar envolvida na coordenação do substrato no sítio metálico Zn β . A molécula de água que sai do sítio β realiza fortes ligações de hidrogênio com o ligante μ -hidroxo e, como veremos, pode estar envolvida nas reações de transferência de prótons, formando espécies nucleofílicas *in situ* e, portanto, alterando a reatividade e o mecanismo de reação enzimático.

O próximo passo foi analisar a interação do substrato com o sítio ativo e explorar o papel dessas moléculas de água no processo de ligação do substrato.

Interação do Substrato Paraoxon com o Sítio Ativo da Enzima PTE Substituída por Cd^{2+}/Cd^{2+}

Para analisar as mudanças estruturais ocorridas ao longo da coordenada de reação para a interação do paraoxon com o sítio ativo de Cd^{2+}/Cd^{2+} de PTE, construiu-se uma superfície de energia potencial (PES) variando a distância entre o átomo de oxigênio fosforilado do paraoxon ao átomo metálico β do sítio ativo de 4,0 a 2,2 Å em intervalos de 0,2 e 0,5 Å. Essa distância foi baseada em dados cristalográficos⁵⁶ que mostram que a distância mais próxima entre o átomo de oxigênio fosforilado do inibidor análogo dietil 4-metilbenzilfosfonato e o átomo de zinco da PTE nativa é de ~ 3,4 Å. As distâncias de interação substrato/sítio ativo foram mantidas congeladas e todos os outros parâmetros geométricos foram totalmente otimizados, mantendo os átomos de carbono terminais do sítio ativo fixados, como foi citado anteriormente. A Figura 4.4 (A) mostra a PES para a interação do paraoxon com o átomo de Cd_{β} do sítio ativo de Cd-PTE.

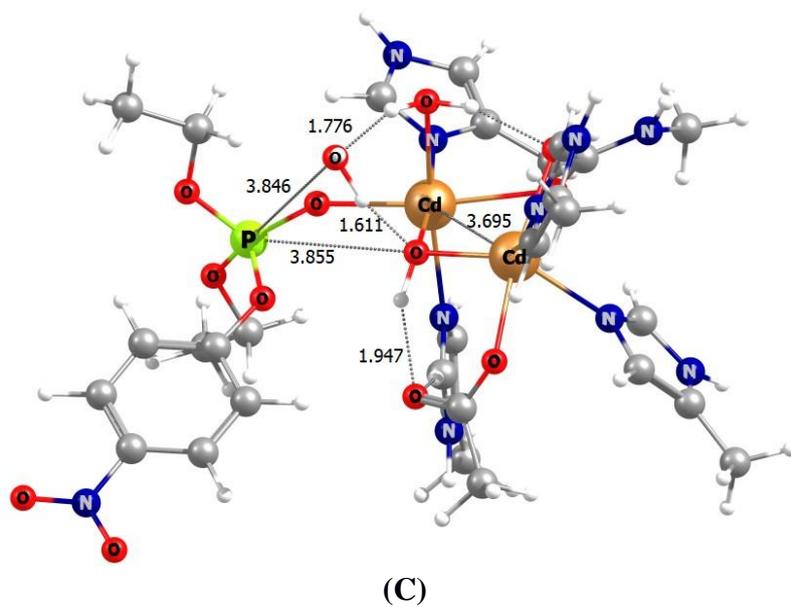
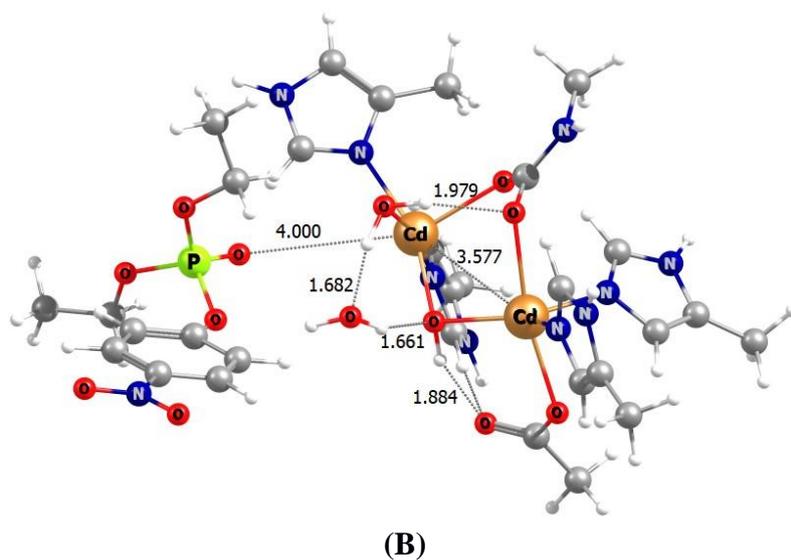
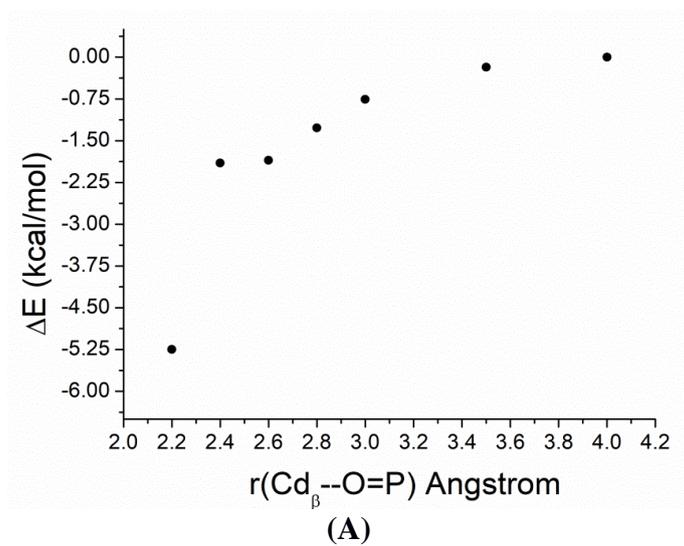
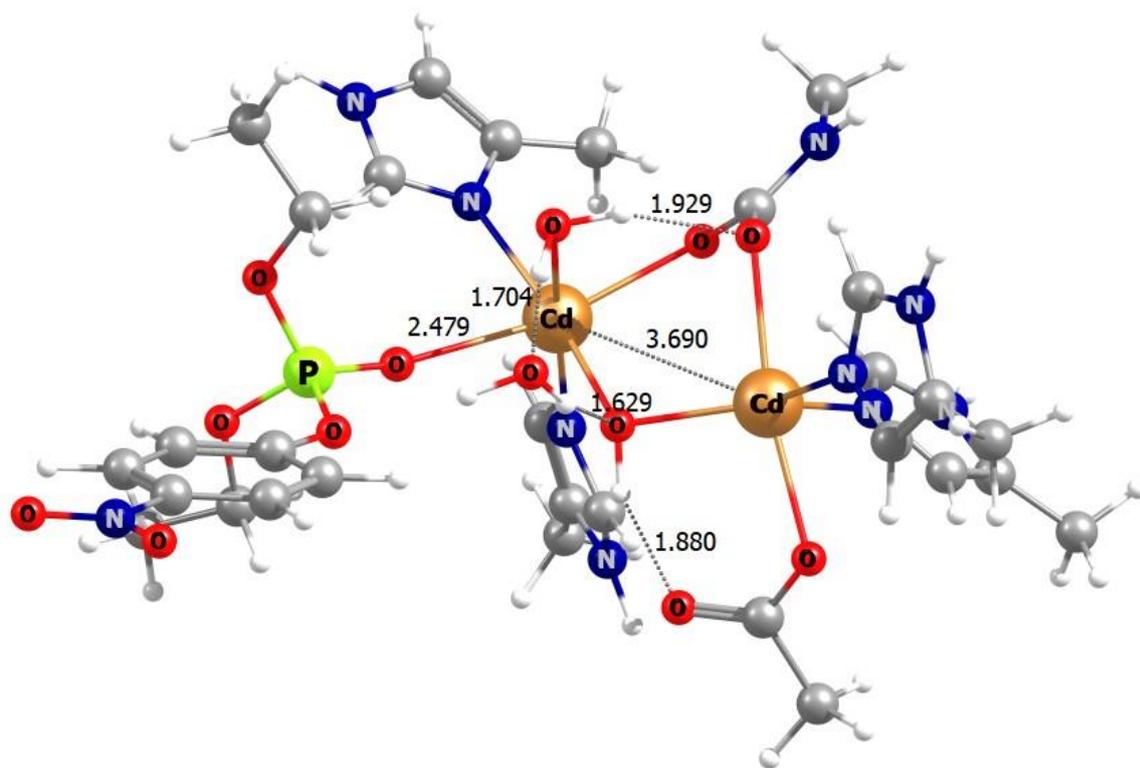


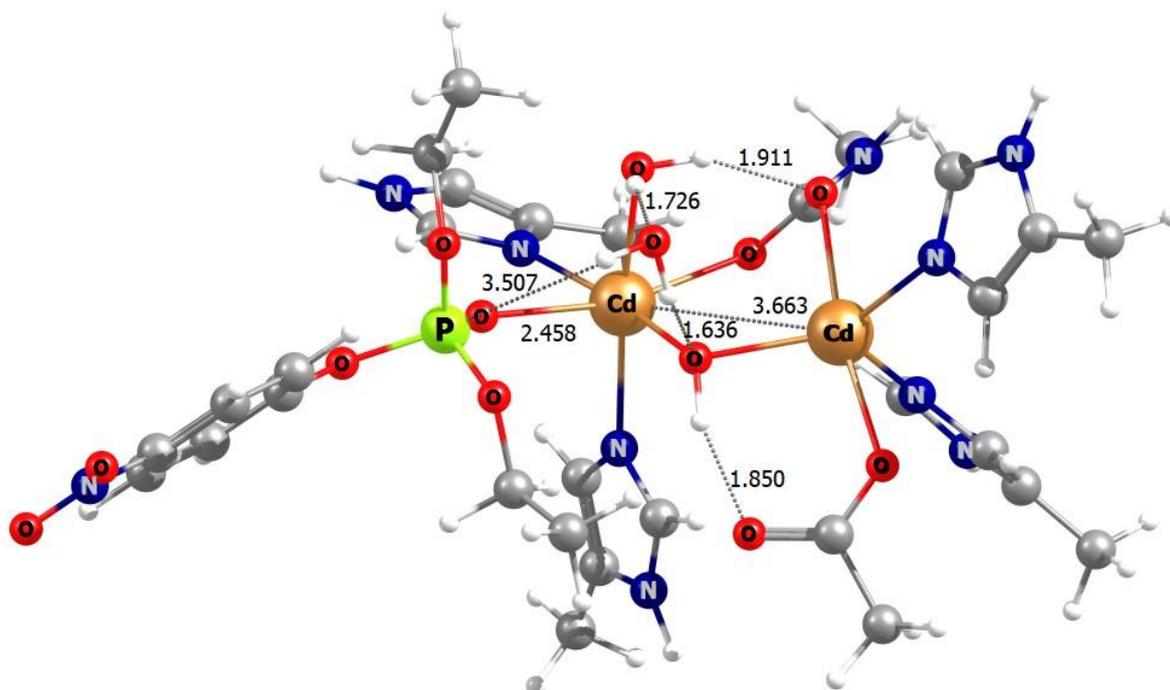
Figura 4.4: Superfície de Energia Potencial para a interação do substrato paraoxon com o modelo estrutural da fosfotriesterase de Cd^{2+}/Cd^{2+} (A). Estruturas obtidas com $r(Cd_{\beta}-O=P) = 4.0 \text{ \AA}$ (B) e $2,2 \text{ \AA}$ (C) são mostradas.

Como pode ser visto, a interação é descendente conforme o substrato se aproxima do sítio ativo e a geometria ao redor do átomo de cádmio β muda de piramidal de base quadrada para octaédrica distorcida, sem barreira de energia. Para todas as estruturas obtidas ao longo da PES, observa-se que uma molécula de água permanece coordenada ao centro metálico β com uma distância média de $2,360 \text{ \AA}$. A outra molécula de água também permanece envolvida na rede de ligações de hidrogênio envolvendo o ligante em ponte μ -hidroxo, com uma distância média de $1,640 \text{ \AA}$, e com a molécula de água coordenada ao átomo de Cd_{β} , com uma distância média de $1,690 \text{ \AA}$. Essas ligações de hidrogênio são importantes para estabilizar as moléculas de água nestes locais no sítio ativo. Nossos resultados, portanto, mostram que, mesmo após a interação com o substrato, a molécula de água permanece coordenada ao centro de Cd_{β} e a outra molécula de água ainda permanece fazendo fortes ligações de hidrogênio com o ligante hidróxido em ponte.

Como pode ser visto na figura 4.4 (c), a estrutura final da PES, com distância $Cd_{\beta}-O=P$ de $2,200 \text{ \AA}$, mostra o oxigênio da molécula de água e o ligante μ -hidroxo quase a mesma distância ($\sim 3,8 \text{ \AA}$) do átomo de fósforo do substrato. Além disso, esses grupos não têm orientação favorável para atacar o substrato em linha com o grupo de saída, passando por um arranjo geométrico do estado de transição bipirâmide trigonal. Portanto, o ângulo diédrico $\angle(Cd-O-P-O)$ foi girado em 180 graus e o sistema foi otimizado novamente sem qualquer restrição na distância de ligação química $Cd_{\beta}-O$ fosforílico do paraoxon.



(A)



(B)

Figura 4.5: Estrutura otimizada do complexo substrato-enzima sem rotação do ângulo diédrico $\angle(\text{Cd-O-P-O})$ (A) e após rotação (B).

A estrutura final otimizada, mostrada na figura 4.5 (B), é ~ 3.5 kcal/mol mais estável que a estrutura anterior sem rotação do ângulo diedro. A distância entre o átomo de oxigênio do grupo fosforila e o cádmio β é de 2,458 Å. Nesta nova estrutura, a molécula de água e o ligante μ -hidroxo são 3,507 e 3,800 Å distantes do átomo de fósforo do substrato, respectivamente. A nova orientação do ângulo $\angle(\text{Cd-O-P-O})$ permite uma configuração mais favorável para o ataque em linha do nucleófilo com o grupo de saída e favorecendo o arranjo do estado de transição bipiramidal trigonal. Também importante, é o fato de que a molécula de água permanece coordenada com o átomo de cádmio β e a outra molécula de água também permanece envolvida na rede de ligações de hidrogênio. Ely *et al.*²² aplicaram a técnica de dicroísmo circular magnético (MCD) para investigar as estruturas eletrônica e geométrica da enzima $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ de OpdA. Os autores observaram uma redução no número de ligantes coordenados para ao sítio metálico β e uma redução da constante de acoplamento de troca na ligação do substrato. Estes dados foram interpretados como um desvio do ligante em ponte μ -hidroxo para uma posição de ligação pseudo-terminal que por sua vez ataca o substrato. Nossos resultados para a enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE mostram que o íon hidróxido em ponte permanece coordenado ao átomo metálico β , com apenas um pequeno aumento de 0,033 Å na distância em relação a este metal após a coordenação do substrato paraoxon.

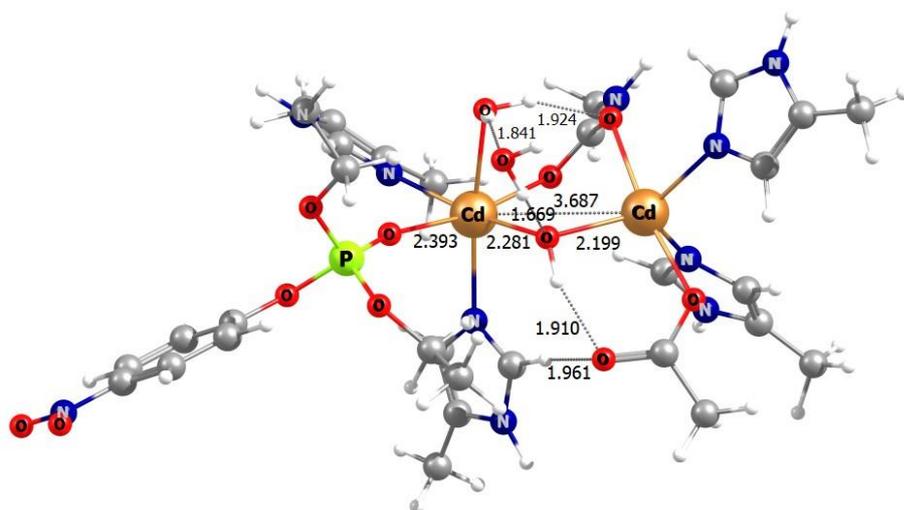
O posicionamento do substrato no sítio ativo é um importante fator relacionado às possíveis interações envolvendo os grupos espectadores do substrato e também o grupo de saída. Ornstein e colaboradores⁵¹ em suas simulações de DM e estudos por cálculos QM sobre os complexos de substrato e PTE com zinco mostraram que a enzima exibe dois bolsões hidrofóbicos relacionados às interações com os grupos espectadores alquila e um terceiro bolsão para o posicionamento correto do grupo de saída. O bolsão no qual o substrato está localizado exibe flexibilidade e interage com o substrato com ajustes conformacionais. Os

resultados da dinâmica molecular⁶⁵ também mostraram que a orientação do grupo de saída é um fator chave que determina a seletividade de substratos quirais derivados do paraoxon. Mo e colaboradores²⁵ mostraram que a etapa limitante da reação está de fato associado a distorções do paraoxon para o ataque do nucleófilo. Portanto, a fim de verificar a orientação do substrato no sítio ativo, uma busca conformacional em torno do ângulo $\angle(\text{Cd-O-P-O})$ foi realizada e foi confirmado que a estrutura otimizada apresenta a geometria de menor energia. Esta estrutura foi então usada para analisar o mecanismo de hidrólise.

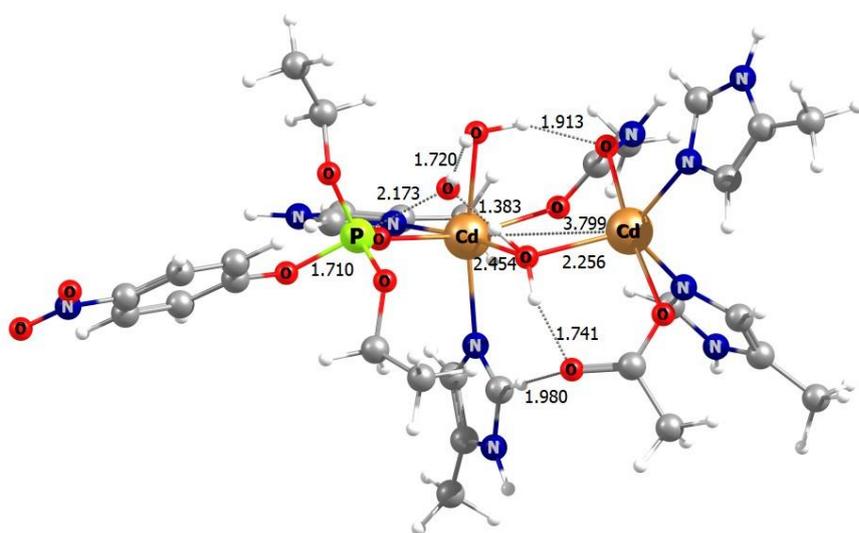
O Mecanismo de Reação Enzimática por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE Proposto para a Hidrólise do Paraoxon

As figuras 4.6 e 4.7 mostram as estruturas dos pontos estacionários obtidos ao longo da coordenada de reação para a hidrólise do paraoxon catalisada pelo sítio ativo $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE. A reação começa com a formação do complexo enzima-substrato, através da coordenação do paraoxon com o centro de cádmio β , formando o reagente, **Reac**, espécie, mostrado na figura 4.6. O paraoxon coordena-se ao átomo metálico β de forma monodentada através do oxigênio fosforílico com uma distância de 2,393 Å. A geometria local do centro de cádmio β muda de piramidal de base quadrada para octaédrica e o átomo de cádmio α permanece com um arranjo bipiramidal trigonal distorcido. Nesta estrutura do **Reac** a molécula de água se aproxima em linha ao grupo de partida com uma distância de 3,935 Å para o átomo de fósforo e ângulo de ataque $\angle(\text{H}_2\text{O-P-OAr})$ de 167°. A distância do grupo de saída ao átomo de fósforo, P-OAr, é de 1,618 Å. A molécula de água atacante faz uma forte ligação de hidrogênio com o ligante em ponte $\mu\text{-OH}$, com uma distância de 1,669 Å e com a molécula de água coordenada, com uma distância de 1,841 Å. A molécula de água também faz ligação de hidrogênio com o grupo carboxilato do outro ligante em ponte Lys169 com

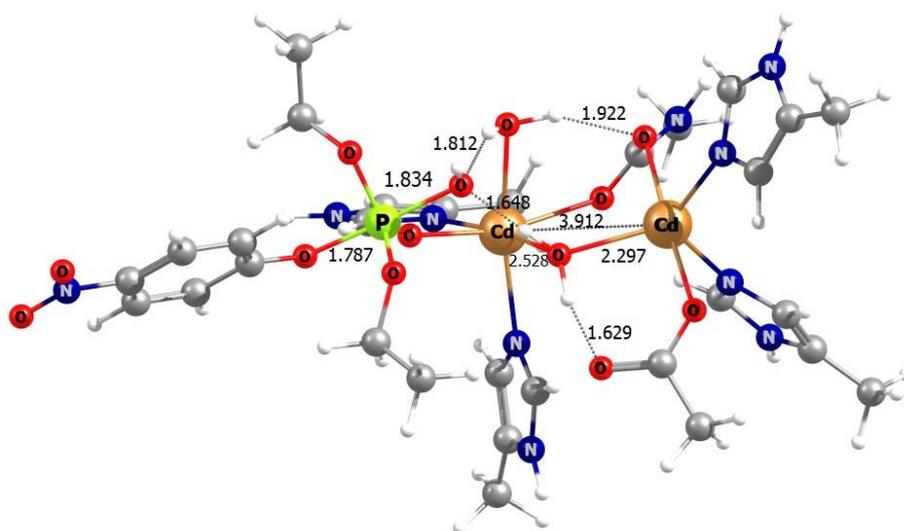
uma distância de 1,924 Å. Na estrutura do **Reac** os átomos de cádmio estão distantes a 3,687 Å um do outro. Vale a pena notar que o substrato coordena-se apenas ao átomo de Cd_β, em contraste com a enzima nativa Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE, para a qual foi proposto um modo simétrico de coordenação bidentada do paraoxon para os dois átomos de zinco⁹, o que facilita o ataque nucleofílico do ligante central OH⁻. Para a enzima substituída por cádmio, esse modo de coordenação bidentado é proibido através de impedimento estérico devido a presença das moléculas de água no modelo de cluster. A principal alteração estrutural que impede esse modo de coordenação é a presença de duas moléculas de água coordenadas no átomo metálico de cádmio β³⁴ na enzima Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE em um ambiente de coordenação octaédrico. Comparando com a enzima nativa Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE existe apenas uma molécula de água coordenada terminalmente formando uma geometria local bipiramidal trigonal. Após a coordenação do paraoxon com o sítio metálico β, a molécula de água mais lábil é deslocada e passa a fazer forte ligação de hidrogênio com o ligante em ponte hidróxido, como mostrado na figura 4.6. A presença desta molécula de água altamente estabilizada através da ligação de hidrogênio com o ligante em ponte OH⁻ evita a ligação do substrato de forma a não adotar uma segunda coordenação com o átomo metálico α. Portanto, uma das moléculas de água coordenadas no átomo metálico β tem um papel catalítico muito importante na geração de espécies nucleofílicas, e de alguma forma influenciando, também, na orientação do substrato. A única maneira do substrato adotar uma coordenação bidentada seria remover as moléculas de água próximas do sítio ativo.



Reac



TS1



Int

Figura 4.6: Estrutura otimizada obtida ao longo da primeira etapa na coordenada de reação para a hidrólise do paraoxon através do sítio ativo da fosfotriesterase de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$. Espécies reagentes, **Reac**, primeiro estado de transição, **TS1** e o intermediário Pentacoordenado, **Int**. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

A interação adicional da molécula de água com o átomo de fósforo leva à formação do primeiro estado de transição da reação (**TS1**), como pode ser visto na figura 4.6. Essa estrutura exibe uma frequência imaginária de $230.2i \text{ cm}^{-1}$ associada ao movimento sincronizado envolvendo a transferência de um próton da molécula de água para o ligante em ponte OH^- e ataque ao átomo de fósforo. Portanto, essa transferência de prótons gerará o nucleófilo OH^- *in situ*, que atacará o átomo de fósforo do substrato, alinhado com o grupo de saída, com um ângulo $\angle(\text{HO-P-OAr})$ de 180° . A ligação OH da molécula de água aumenta para $1,383 \text{ \AA}$ e a distância ao átomo de fósforo diminui para $2,173 \text{ \AA}$. Ao mesmo tempo, a distância do grupo abandonador ao centro de fósforo aumenta para $1,710 \text{ \AA}$. É importante enfatizar o papel importante da molécula de água que se mantém coordenada no átomo de Cd_β na estabilização da estrutura do estado de transição e na orientação do nucleófilo para o ataque, mantendo ligações de hidrogênio com o carboxilato de Lys169 e o nucleófilo em formação OH^- , com distâncias de $1,913$ e $1,720 \text{ \AA}$, respectivamente. No estado de transição **TS1** a distância entre os átomos de cádmio aumenta para 3.799 \AA e, todas as distâncias de ligação em torno dos átomos de fósforo também aumentam.

A estrutura do estado de transição **TS1**, leva à formação de um intermediário pentacoordenado **Int**, mostrado na figura 4.6. No intermediário, o próton da molécula de água já está completamente transferido para o ligante em ponte hidróxido e o nucleófilo formado OH^- se liga ao fósforo, ocupando a posição axial de uma geometria bipiramidal trigonal, com uma distância de $1,834 \text{ \AA}$. A outra posição axial é ocupada pelo grupo de saída, com uma distância P-OAr de $1,787 \text{ \AA}$, com os ligantes espectadores alquila e o oxigênio fosforilado formando o plano equatorial. Vale ressaltar que, apesar de ser coordenado a dois íons Cd^{2+} , o

átomo de oxigênio do ligante em ponte OH^- tem uma carga líquida de $-0,983e$ na estrutura do reagente, o que ajuda a promover a transferência do hidrogênio da molécula de água. O próton transferido para o OH^- em ponte, também, tem uma alta carga positiva de $+0,653e$. O intermediário pentacoordenado **Int** é estabilizado por fortes ligações hidrogênio com o ligante hidróxido em ponte, com uma distância de $1,648 \text{ \AA}$ e com a molécula de água coordenada com uma distância de $1,812 \text{ \AA}$. A distância Cd-Cd aumenta para $3,912 \text{ \AA}$ na estrutura do **Int**. Vale a pena notar, também aqui, o papel importante da molécula de água coordenada para estabilizar o intermediário pentacoordenado, mantendo ligações de hidrogênio com o carboxilato e com o nucleófilo. É importante mencionar que a existência desse intermediário pentacoordenado é uma questão de debate.^{58,59} De fato, o intermediário fosforano aparece em alguns estudos teóricos de compostos biomiméticos de fosfatase ácida púrpura^{60,61}, em modelo cluster de PTE²⁶ e também em investigações QM/MM da enzima nativa $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE, onde um platô de estado de transição na coordenada da reação, similar em natureza ao estado intermediário, foi encontrado.²⁸ No entanto, até onde sabemos, este intermediário nunca foi experimentalmente detectado em reação de enzimas degradantes de organofosfatos.^{34,62,63} Uma das razões pode ser devido ao curto tempo de vida deste intermediário. Como foi demonstrado pelo nosso grupo, através de estudos de dinâmica molecular *ab initio* sobre a hidrólise de mono e diéster de fosfatos em solução aquosa⁶⁴, este intermediário fosforano tem uma vida útil curta de $\sim 1 \text{ ps}$.

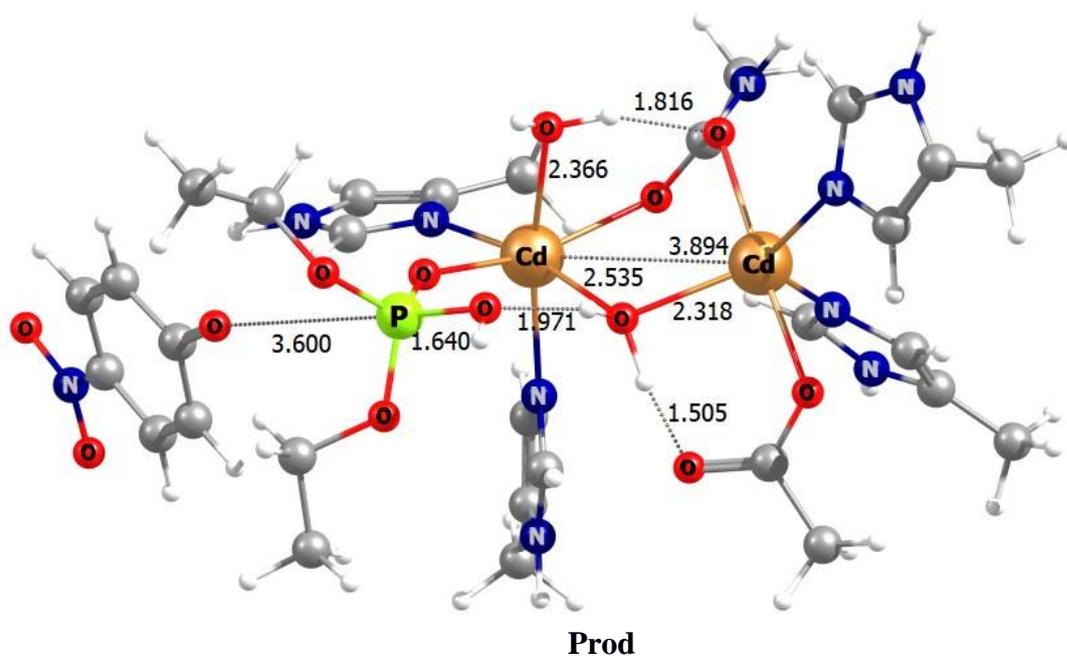
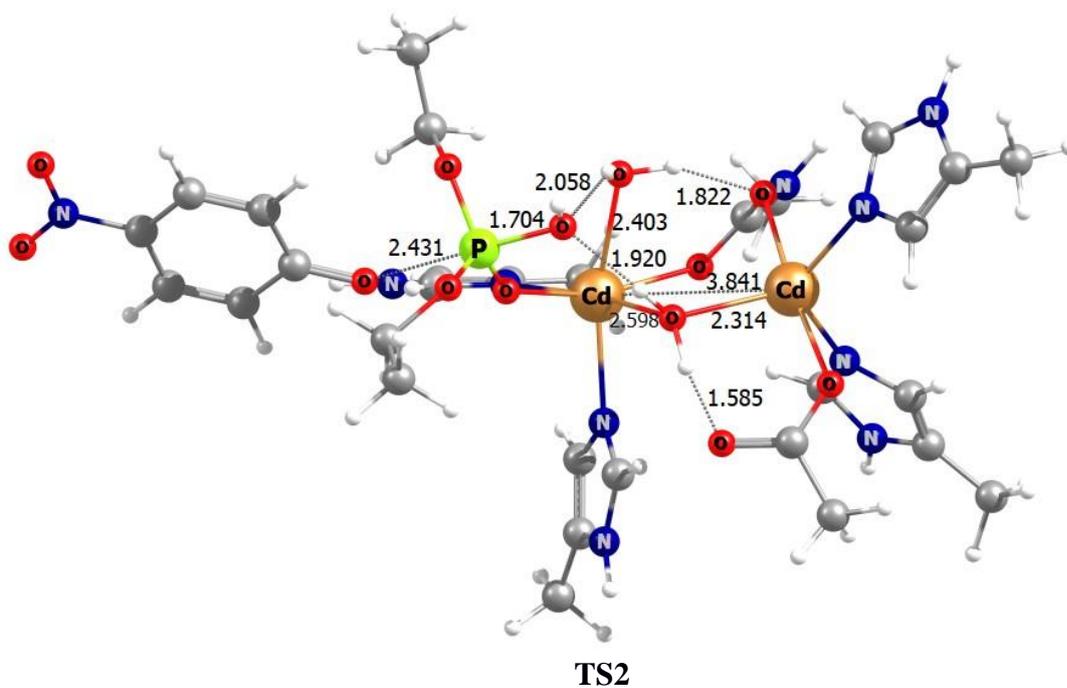


Figura 4.7: Estrutura otimizada obtida ao longo da segunda etapa na coordenada de reação para a hidrólise do paraoxon através do sítio ativo da fosfotriesterase de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$. Segundo estado de transição, **TS2** e o produto final, **Prod**. As distâncias de ligação química são dadas em Angstrom.

Maiores interações envolvendo com o nucleófilo leva ao segundo estado de transição da reação (**TS2**), mostrado na figura 4.7, e tendo uma frequência imaginária de $63,8i \text{ cm}^{-1}$, relacionada ao estiramento da ligação P-OAr. A ligação P-OAr de $2,431 \text{ \AA}$ apresenta $\sim 50\%$ de quebra de

ligação química quando comparada com a mesma ligação na espécie reagente **Reac**. Por outro lado, a ligação P-OH de 1,704 Å mostra ~ 96% de formação de ligação química no **TS2**, em comparação com a mesma distância de ligação na estrutura do produto da reação de hidrólise enzimática. As ligações de hidrogênio envolvendo o nucleófilo, o ligante hidróxido em ponte e a molécula de água coordenada enfraquecem, mostrando distâncias de 1,920 e 2,058 Å, respectivamente, e a geometria ao redor do átomo de fósforo muda para tetraédrica distorcida. O produto final da reação, **Prod**, mostrado na figura 4.7, é caracterizado pela quebra completa da ligação envolvendo o grupo de saída, com distância de ligação de P-OAr de 3,600 Å e a formação completa da ligação envolvendo o nucleófilo, com distância de ligação P-OH de 1,640 Å. A ligação P-O do grupo fosforila restaura seu caráter de ligação dupla, com uma distância de ligação P=O de 1,487 Å. As ligações de hidrogênio envolvidas com o difosfato formado são enfraquecidas. É importante enfatizar que, durante toda a coordenada de reação química, o substrato permanece coordenado apenas ao átomo de cádmio β de forma monodentada.

Um possível mecanismo para restaurar o sítio ativo ao estado original pode ser inferido pela análise das distâncias envolvendo o ligante em ponte OH^- , e o átomo de oxigênio do grupo fosforila ao átomo de Cd_β , e também a transferência de prótons para o resíduo de aminoácido Asp301. Como pode ser visto nas figuras 4.6 e 4.7, à medida que o ligante em ponte μ -hidroxo desprotona a molécula de água nucleofílica, a sua distância de ligação ao átomo de Cd_β aumenta, variando 0,254 Å do reagente para o produto. Isso pode ser explicado pela mudança do caráter aniônico do ligante em ponte OH^- no **Reac** para o caráter neutro da água no produto, **Prod**. À medida que a reação prossegue a ligação de hidrogênio envolvendo o ligante μ -hidroxo e o resíduo do aminoácido Asp301 torna-se mais forte, e a distância da ligação de hidrogênio varia de 0,405 Å do reagente ao produto. A ligação P=O-- Cd_β , por outro lado, aumenta 0,080 Å do segundo estado de transição para o produto. Portanto, um possível mecanismo para a restauração do sítio ativo pode está associado à protonação do resíduo Asp301 pela molécula de água em ponte, restaurando o ligante μ -hidroxo e contribuindo para diminuir a polarização da ligação P=O-- Cd_β . Assim, liberação do produto e a

coordenação de uma molécula de água do meio solvente restaurariam o estado inicial do sítio ativo. O Asp301 pode está envolvido em um mecanismo de liberação de prótons para o meio, envolvendo o resíduo Asp301 e His254, que é orientado para o resíduo Asp301, na enzima. O papel desempenhado pelo resíduo Asp301 no sítio ativo de PTE foi demonstrado por Aubert, Li e Raushel⁹ através da queda da atividade catalítica de 2 a 3 ordens de magnitude quando este resíduo de aminoácido sofre mutação por alanina ou asparagina. Portanto, nossa proposta mecanicista está alinhada com os estes dados experimentais.

A classificação do tipo de mecanismo envolvido na hidrólise enzimática do paraoxon pela enzima Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE pode ser obtida através da análise da extensão da quebra da ligação P-OAr e da formação da ligação P-nucleófilo ao longo da coordenada da reação, fornecendo uma caracterização do mecanismo de reação enzimático. A Tabela 4.2 mostra as distâncias de ligação P-OAr e P-OH₂ ao longo da coordenada da reação.

Tabela 4.2: Variação das distâncias de ligação fosforoso-nucleófilo (P-O_{H2O}) e do fósforo-grupo de saída (P-OAr) e a percentagem de quebra de ligação P-OAr (% BB) e a percentagem de formação da ligação P-O_{H2O} (% BF) ao longo da coordenada de reação. *

	Reac	TS1	Int	TS2	Prod
P-O _{Ar}	1,62	1,71	1,79	2,43	3,60
% B.B	0	6	10	50	100
P-O _{H2O}	3,93	2,17	1,83	1,70	1,64
% B.F	0	67	88	96	100

* Distâncias de ligação química em Å.

Como pode ser visto, a ligação química do grupo de saída ao átomo de fósforo permanece quase inalterada até que o intermediário pentacoordenado seja alcançado. Da estrutura do **Reac** ao **Int**, a ligação P-OAr se dissocia apenas 10% em relação ao **Reac**, e no segundo estado de transição **TS2**, a ligação química apresenta-se 50% dissociada. Ou seja, a ligação P-OAr dissocia-se significativamente apenas na segunda etapa da reação. Por outro lado, na primeira parte da reação, a ligação do nucleófilo ao átomo de fósforo está quase completa. A ligação P-OH₂ está 67% já formada no **TS1** e 88% no intermediário **Int**. Cálculos DFT sobre a hidrólise do composto análogo metilparaoxon, promovido na enzima nativa Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE, prevê que a reação enzimática apresenta duas etapas (mecanismo A_N + D_N) com a formação do intermediário pentacoordenado.²² No entanto, cálculos QM/MM/MD sobre a hidrólise de paraoxon na mesma enzima Zn²⁺/Zn²⁺ de PTE mostram um mecanismo associativo A_ND_N²⁶ de etapa única ou um mecanismo S_N2 com um platô de transição.²⁸ A análise estrutural mostrada por nós através do modelo de cluster do sítio ativo da enzima substituída Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE mostra claramente que a hidrólise do paraoxon segue um mecanismo associativo de duas etapas do tipo A_N + D_N, passando por um intermediário pentacoordenado, com significativa quebra de ligação química do grupo de saída e formação de ligação química do nucleófilo. A diferença é que, em nosso estudo com o modelo do sítio ativo, mostramos que as espécies nucleofílicas são formadas *in situ* através da transferência de prótons de uma molécula de água para o ligante em ponte hidróxido. As moléculas de água inicialmente coordenadas no átomo de cádmio β no sítio ativo de Cd-PTE, desempenham, assim, um papel importante no mecanismo enzimático proposto neste trabalho. As energias envolvidas no mecanismo proposto para a hidrólise do paraoxon por Cd²⁺/Cd²⁺ de PTE são mostradas na Tabela 4.3. Os valores de energia foram obtidos no nível de teoria B3LYP-D3/6-311++G(2d,2p) através de cálculos de energia no ponto sobre as estruturas otimizadas B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ. A inclusão dos diferentes efeitos, D3 e SMD, nos resultados finais de energia são comparados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Energias relativas (em kcalmol⁻¹) obtidas para a reação de hidrólise do paraoxon promovida através do sítio ativo da enzima PTE substituída por Cd²⁺/Cd²⁺, em diferentes níveis de cálculo.*

Método	Espécies				
	Reac	TS1	Int	TS2	Prod
B3LYP/6-311++G(2d,2p)	0,0	19,3	16,4	24,2	14,4
B3LYP/6-311++G(2d,2p) + D3	0,0	14,2	12,7	19,2	13,3
B3LYP/6-311++G(2d,2p) + D3 + SMD	0,0	12,9	9,9	11,8	4,8

* D3 corresponde a inclusão de correção de dispersão D3 de Grimme.³⁸ SMD inclui as energias livres de solvatação das espécies obtidas com o modelo contínuo polarizável SMD de Thrular e Cramer⁴³, com a constante dielétrica de 4,0. Os resultados com as funções de base 6-311++G(2d,2p) foram obtidos através de cálculos no ponto sobre as geometrias otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ .

Como pode ser visto na Tabela 4.3, a primeira etapa do mecanismo é a etapa determinante da velocidade de reação com energia de ativação de 19,3 kcalmol⁻¹ na fase gasosa. Os efeitos de dispersão D3, por si só contribuem para reduzir drasticamente essa barreira de energia em ~ 26%, e a inclusão dos efeitos do solvente proporcionam um valor final de 12,9 kcalmol⁻¹. Os efeitos de dispersão também afetam drasticamente a estabilidade do intermediário pentacoordenado, **Int**, de 16,4 a 12,7 kcalmol⁻¹, representando um aumento de ~ 23% na estabilidade do **Int**, e também reduzem em 0,9 kcalmol⁻¹ (~ 12,6%) a segunda barreira de energia do **Int** para o **TS2**. Os efeitos de dispersão são menos pronunciados na estabilidade do produto, **Prod**, representando um aumento na estabilidade de 1,2 kcalmol⁻¹ (~ 8,0%). A partir desses resultados, percebe-se o papel importante desempenhado pelos efeitos de dispersão em todo o perfil energético da reação e, como também apontado por outros autores⁵⁴, torna-se essencial a inclusão desses efeitos no estudo das reações enzimáticas, independentemente de qual abordagem seja usada (QM, Modelo de Cluster, QM/MM,

etc.). Nossos resultados energéticos finais, no nível de teoria B3LYP-D3/6-311++G(2d,2p) e incluindo os efeitos de dispersão e do solvente, mostram que a hidrólise do paraoxon através da enzima substituída por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE segue um mecanismo de duas etapas (AN + DN), com barreiras de energia de 12,9 e 1,9 kcalmol^{-1} para a primeira e segunda etapas, respectivamente. Cálculos através de modelo de cluster do sítio ativo de Zn-PTE, realizados por Kim *et al.*²⁷, revelaram uma barreira de energia de 17,3 kcalmol^{-1} para o mecanismo no qual o ligante hidróxido atua como base, desprotonando uma molécula de água. Para o ataque nucleofílico direto do ligante em ponte de hidróxido, os cálculos realizados por Chen *et al.*²⁶ produziram uma barreira energética de 12,9 kcalmol^{-1} . Vale ressaltar que nossa proposta para o mecanismo enzimático mostra uma barreira energética que é quase metade da barreira energética de 23,9 kcalmol^{-1} obtida através de modelos biomiméticos de fosfodiesterase $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, realizado por Brown *et al.*⁶¹, para o ataque de um hidróxido coordenado terminalmente.. Também é interessante notar que nossa barreira de energia computada é apenas 0,7 kcalmol^{-1} maior do que o valor de 12,3 kcalmol^{-1} calculado para um modelo biomimético da Fosfatase Ácida Púrpura para o ligante hidróxido coordenado terminalmente. Experimentalmente, a hidrólise de paraoxon por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE possui uma constante catalítica $k_{\text{cat}} = 2500 \text{ s}^{-1}$, medida em pH 9,0 e 20% de metanol.⁹ Essa constante de velocidade experimental se traduz em uma energia de ativação de 12,8 kcalmol^{-1} . Rochu e colaboradores³² também determinaram a atividade catalítica de PTEs e descobriram que a hidrólise de paraoxon por PTE substituída com Cd^{2+} tem $k_{\text{cat}} = (3900 \pm 300) \text{ s}^{-1}$ a pH 9,0 e 25 ° C, o que dá uma energia de ativação de 12,5 kcalmol^{-1} .

Em nossa proposta para o mecanismo enzimático, o ligante em ponte hidróxido age como uma base, que desprotona uma molécula de água previamente coordenada ao átomo de Cd_β , que por sua vez ataca o átomo de fósforo do substrato. O papel do hidróxido em ponte para atuar como um nucleófilo, atacando diretamente o substrato, ou para atuar como base, gerando o nucleófilo OH^- que ataca o substrato, é de fato um aspecto importante do mecanismo de reação das fosfotriesterases. Gouré *et al.*⁶⁶, investigando a hidrólise promovida por um complexo de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$,

mostraram, por meio de espectroscopias Mössbauer e de RMN de prótons, que a entrada do substrato transforma o nucleófilo μ -hidroxo em um nucleófilo terminal. Esse deslocamento do ligante μ -hidroxo para um ligante terminal foi também observado por Ely *et al.*²² para a enzima $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ de OpdA.

A principal diferença entre nossa proposta de mecanismo de reação enzimática para a enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE é que, neste caso, o sítio ativo contém duas moléculas de água coordenadas no átomo de Cd_β mais exposto ao solvente, e que não está presente na enzima nativa com os íons Zn^{2+} . Uma das moléculas de água coordenada dissocia-se da esfera de coordenação do átomo de Cd_β , para permitir a ligação do substrato, passando a fazer forte interação por ligação de hidrogênio com o ligante em ponte hidróxido, o que facilita a desprotonação através deste ligante da molécula de água resultando na formação do nucleófilo OH^- . A barreira de energia computada de $12,9 \text{ kcalmol}^{-1}$ está em excelente concordância com o valor experimental.⁹ É interessante notar ainda que se compararmos essa barreira de energia com a barreira de $17,3 \text{ kcalmol}^{-1}$ calculada por Kim *et al.*²⁷ para um mecanismo similar de base através do ligante em ponte OH^- , na enzima nativa $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE, o nosso valor calculado é $4,4 \text{ kcalmol}^{-1}$ menor. Além disso, nossa barreira de energia de ativação é da mesma magnitude que a obtida para o ataque nucleofílico do hidróxido em ponte na enzima nativa $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de PTE. Como foi mencionado anteriormente, obtivemos forte impedimento estérico para a coordenação do substrato de forma a permitir o ataque direto do hidróxido em ponte. A enzima substituída por $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE tem ótima atividade catalítica em pH alto. No mecanismo por nós proposto, em pH baixo o átomo de oxigênio do ligante em ponte OH^- pode ser protonado, devido à alta carga negativa sobre o átomo de oxigênio, evitando a formação *in situ* do próton pela molécula de água, o que pode explicar a baixa reatividade a valores baixos de pH. Em pH alto, a formação *in situ* do nucleófilo OH^- é mais favorável. Portanto, o mecanismo básico proposto aqui, para a enzima $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ de PTE, em conjunção com a concordância obtida com o valor da barreira de energia experimental⁹, faz deste trabalho uma

proposta para o mecanismo enzimático, consistente e cineticamente viável, para a hidrólise de triésteres de fosfato promovida através dos íons Cd^{2+} na enzima PTE substituída.

4.4 Considerações Finais

No presente capítulo, cálculos DFT foram realizados, no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ e incluindo efeitos de dispersão, pela primeira vez, através do modelo de cluster do sítio ativo de $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ da fosfotriesterase de *Pseudomonas diminuta* para investigar o mecanismo de hidrólise do triéster paraoxon. O mecanismo proposto consiste em: i) Troca da molécula de água coordenada e coordenação do substrato ao átomo de Cd_β mais exposto ao solvente de modo monodentado; ii) protonação do ligante em ponte μ -hidroxo pela molécula de água que desloca-se do cádmio β e formação *in situ* do nucleófilo OH^- , iii) formação de um intermediário pentacoordenado com quebra significativa de ligação química para o grupo de saída e de formação de ligação química para com o nucleófilo, iv) protonação do resíduo de aminoácido Asp301 e restauração do sítio ativo através da coordenação de outra molécula de água do meio. As moléculas de água inicialmente coordenadas no sítio ativo desempenham funções cruciais na estabilização dos estados de transição e do intermediário pentacoordenado. A reação ocorre via um mecanismo de duas etapas (AN + DN), com barreiras de energia de 12,9 e 1,9 kcalmol^{-1} para a primeira e segunda etapas, respectivamente, obtidos no nível de teoria B3LYP-D3/6-311++G(2d,2p)/LANL2DZ, em excelente concordância com os dados experimentais. Mostramos que os efeitos de dispersão por si só contribuem para diminuir as barreiras de energia em até 26%, atestando mais uma vez a necessidade de incluir estes efeitos de dispersão nesse tipo de reação enzimática. Aspecto importante, também, foi a realização da amostragem do espaço conformacional para a coordenação do substrato. No caso do paraoxon, a orientação do grupo de saída resultou em uma estabilização adicional do complexo substrato-enzima em mais de 4 kcalmol^{-1} . Finalmente, é importante mencionar que o mecanismo básico para a enzima Cd-PTE proposto aqui, em conjunção com a concordância encontrada com o valor experimental para a barreira de energia de ativação, faz com

que este trabalho seja uma proposta de mecanismo de reação enzimático consistente para a hidrólise de triésteres de fosfato promovida pela enzima PTE substituída por íons Cd^{2+} .

4.5 Referências Bibliográficas

- (1) Sogorb, M. A.; Vilanova, E. *Toxicol. Lett.* **2002**, 128, 215-228.
- (2) Raushel, F. M. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, 5, 288-295.
- (3) Ely, F.; Foo, J. -L.; Jackson, C. J.; Gahan, L. R.; Ollis, D. L.; Schenk, G. *Curr. Top. Biochem. Res.* **2007**, 9, 63-78.
- (4) Kirby, A. J.; Nome, F. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1806-1814.
- (5) Erickson, B. E. Chlorpyrifos Sparks Outcry. *C&EN* **2017**, 95, 27-30.
- (6) Lewis, V. E.; Donarski, W. J.; Wild, J. R.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **1988**, 27, 1591-1597.
- (7) Donarski, W. J.; Dumas, D. P.; Heitmeyer, D. P.; Lewis, V. E.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **1989**, 28, 4650-4655.
- (8) Dumas, D. P.; Caldwell, S. R.; Raushel, F. M. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 19659-19665.
- (9) Aubert, S. D.; Li, Y.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **2004**, 43, 5707-5715.
- (10) Kennedy, D. J.; Mayer, B. P.; Baker, S. E.; Valdez, C. A. *Inorg. Chim. Act.* **2015**, 436, 123-131.
- (11) Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 368-374.
- (12) Caldwell, S. R.; Newcomb, J. R.; Schlecht, K. A.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **1991**, 30, 7438-7444.
- (13) Bigley, A. N.; Raushel, F. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1834, 443-453.

- (14) Schenk, G.; Mateen, I.; Ng, T-K.; Pedroso, M. M.; Mitić, N.; Jafelicci, Jr., M.; Marques, R. F. C.; Gahan, L. R.; Ollis, D. L. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 317, 122-131.
- (15) Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13278-13283.
- (16) Samples, C. R.; Howard, T.; Raushel, F. M.; DeRose, V. J. *Biochemistry*, **2005**, 44, 11005-11013.
- (17) Ely, F.; Hadler, K. S.; Gahan, L. R.; Guddat, L. W.; Ollis, D. L.; Schenk, G. *Biochem. J.* **2010**, 432, 565-573.
- (18) Yang, H.; Carr, P. D.; McLoughlin, S. Y.; Liu, J. W.; Horne, I.; Qiu, X.; Jeffries, C. M. J.; Russell, R. J.; Oakeshott, J. G.; Ollis, D. L. *Protein Eng.* **2003**, 16, 135-145.
- (19) Pedroso, M. M.; Ely, F.; Mitić, N.; Carpenter, M. C.; Gahan, L. R.; Wilcox, D. E.; Larrabee, J. L.; Ollis, D. L.; Schenk, G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, 19, 1263-1275.
- (20) Jackson, C. J.; Foo, J. L.; Kim, H. K.; Carr, P. D.; Liu, J. W.; Salem, G.; Ollis, D. L. *J. Mol. Biol.* **2008**, 375, 1189-1196.
- (21) Daumann, L.; Schenk, G.; Ollis, D. L.; Gahan, L. R. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 910-928.
- (22) Ely, F.; Hadler, K. S.; Mitić, N.; Gahan, L. R.; Ollis, D. L.; Plugis, N. M.; Russo, M. T.; Larrabee, J. A.; Schenk, G. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 777-787.
- (23) Alberto, M. E.; Pinto, G.; Russo, N.; Toscano, M. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 3736-3745.
- (24) Purg, M.; Elias, M.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 17533-17546.
- (25) Purg, M.; Pabis, A.; Baier, F.; Tokuriki, N.; Jackson, C.; Kamerlin, S. C. L. *Phil. Trans. R. Soc. A*, **374**, 20160150.
- (26) Chen, S.L.; Fang, W. H.; Himo, F. *J. Phys. Chem. B.*, **2007**, 111, 1253-1255.

- (27) Kim, J.; Tsai, P.C.; Chen, S. L.; Himo, F.; Almo, S. C.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 9497-9504.
- (28) Wong, K. -Y.; Gao, J. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 13352-13369.
- (29) Camargo, T. P.; Neves, A.; Peralta, R. A.; Chaves, C.; Maia, E. C. P.; Lizarazo-Jaimes, E. H.; Gomes, D. A.; Bortolotto, T.; Norberto, D. R.; Terenzi, H.; Tierney, D. L.; Schenk, G. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 187-203.
- (30) Zhang, X.; Wu, R.; Song, L.; Lin, Y.; Lin, M.; Cao, Z.; Wu, W.; Mo, Y. *J. Comput. Chem.*, **2009**, *30*, 2388-2401.
- (31) López-Canut, V.; Ruiz-Pernía, J. J.; Castillo, R.; Moliner, V.; Tuñón, I. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9612-9621.
- (32) Rochu, D.; Viguié, N.; Ranault, F.; Crouzier, D.; Froment, M. T.; Masson, P. *Biochem. J.* **2004**, *380*, 627-633.
- (33) Hadler, K. S.; Tanifum, E. A.; Yip, SH-C.; Mitić, N.; Guddat, L. W.; Jackson, C. J.; Gahan, L. R.; Nguyen, K.; Carr, P. D.; Ollis, D. L.; Hengge, A. C.; Larrabee, J. A.; Schenk, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14129-14138.
- (34) Benning, M. M.; Shim, H.; Raushel, F. M.; Molden, H. M. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 2712-2722.
- (35) Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- (36) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 1993, **98**, 5648-5652.
- (37) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
- (38) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. *J. Chem. Phys.*, **2010**, *132* 154104. (39) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257-2261.

- (40) Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654-3665.
- (41) Krishnam, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650-654.
- (42) Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.*, **1985**, *82*, 270-283.
- (43) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6378-6396.
- (44) Maseras, F.; Morokuma, K. *J. Comp. Chem.*, **1995**, *16*, 1170-1179.
- (45) Vreven, T.; Byun, K. S.; Komáromi, I.; Dapprich, S.; Montgomery Jr., J. A. *J. Chem. Theory and Comput.*, **2006**, *2*, 815-826.
- (46) Rappé, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10024-10035.
- (47) Ghysels, A.; Woodcock III, H. L.; Larkin, J. D.; Miller, B. T.; Shao, Y.; Kong, J.; Van Neck, D.; Van Speybroeck, V.; Maroquier, M.; Brooks, B. R. *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, *7*, 496-514.
- (48) Da Silva, J. C.S.; Pennifold, R. C. R.; Harvey, J. N.; Rocha, W. R. *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 2492-2504.
- (49) Fukui, K. *Acc. Chem. Res.*, **1981**, *14*, 363-368.
- (50) Gonzalez, C.; Schlegel, H. B. *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 5523-27.
- (51) Gaussian 09, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zhe, G.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr. J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.;

Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

(52) Krauss, M.; Olsen, L.; Antony, J.; Hemmingsen, L. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 9446-9453.

(53) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. *J. Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3025-3038.

(54) Ahmadi, S.; Herrera, L. B.; Chehelamirani, M.; Hostaš, J.; Jalife, S.; Salahub, D. R. *Int. J. Quantum Chem.* **2017**, DOI: 10.1002/qua.25558.

(55) Siegahn, P. E. M.; Himo, F. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2011**, 323-336.

(56) Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry*, **1996**, 35, 6020-6025.

(57) Koča, J.; Zhan, C. –G.; Rittenhouse, C.; Ornstein, R.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 817-826.

(58) Lassila, J. K.; Zalatam, J. G.; Herschlag, D. *Annu Rev Biochem* **2011**, 80, 669-702.

(59) Karmelin, S. C. L.; Sharma, P. K.; Prasad, R. B.; Warshel, A. *Qui. Rev. Biophys.* **2013**, 46, 1-132.

(60) Ferreira, D. E. C.; De Almeida, W. B.; Neves, A.; Rocha, W. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 7039-7046.

(61) Brown, J. J.; Gahan, L. R.; Schöffler, A.; Krenske, E. H.; Schenk, G. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 162, 356-365.

- (62) Schenk, G.; Gahan, L. R.; Carrington, L. E.; Mitić, N.; Valizadeh, M.; Hamilton, S. E.; De Jersey, J.; Guddat, L. W. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, 102, 273-278.
- (63) Selleck, C.; Clayton, D.; Gahan, L. R.; Mitić, N.; McGearry, R. P.; Pedroso, M. M.; Guddat, L. W.; Schenk, G. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 4778-4781.].
- (64) Pereira, E. S.; Da Silva J. C. S.; Brandão, T. A. S.; Rocha, W. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 18255-18267.
- (65) Zhan, D.; Guan, S.; Jin, H.; Han, W.; Wang, S. *J. Biom. Struct. Dynam.* **2016**, 34, 600-611.
- (66) Gouré, E.; Carboni, M.; Troussier, A.; Lebrun, C.; Pécaut, J.; Jacquot, J. F.; Dubourdeaux, P.; Clémancey, M.; Blondin, G.; Latour, J. M. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 8064-8068.

Capítulo 5: Dinâmica Molecular (DM) de Fosfotriesterases (*pdPTE*) Contendo os Metais Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II), e Cd(II)-Cd(II): Interação com Inibidor e com o Substrato Paraoxon

5.1 Introdução

O entendimento acerca da origem do potencial catalítico de enzimas é atualmente um dos principais tópicos de pesquisa na área da bioquímica. A investigação da origem do potencial catalítico das enzimas pode conduzir às respostas referentes aos eventos cruciais que ocorrem durante a atuação de uma determinada enzima sobre certo substrato, levando a um entendimento mais detalhado dos processos biológicos relacionados. O estudo da catálise enzimática também é essencial para o desenvolvimento de novos e melhores inibidores, bem como novas enzimas mutantes, as quais possuem importantes aplicações desde a fabricação de novas drogas para o tratamento de diversas doenças até o desenvolvimento de catalisadores para o uso em processos industriais.

As simulações computacionais através da realização de dinâmicas moleculares clássicas (DM)¹ são importantes recursos com os quais podemos investigar as variações estruturais e conformacionais de enzimas, por exemplo, sob a influência do meio solvente. Outras possibilidades são a variação de cofatores metálicos nos sítios ativos enzimáticos, bem com a interação das enzimas com inibidores e substratos além da realização de mutações em resíduos de aminoácidos específicos, através das quais a realização de DM traz grande riqueza de detalhes para as interações a nível atômico.^{2,3} Nesta etapa deste estudo temos por objetivo a realização de simulações de dinâmica molecular clássica destes sistemas de PTEs em suas formas nativas e substituídas por outros metais de transição com os íons Cd²⁺. Uma vez que os trabalhos na literatura descrevem basicamente para PTEs simulações de DM somente em sua forma nativa contendo os íons Zn²⁺.¹

Neste sentido, estudos de dinâmica molecular clássica, reportados por Zhan *et. al.*,¹ para o sistema nativo de *pdPTE* contendo os íons Zn²⁺, forneceram suporte para a conclusão de que o íon OH⁻ é o segundo ligante em ponte no sítio ativo, juntamente com a Lys169, em linha com

resultados experimentais.^{2,3} Pang, usando o método catiônico de Dunny⁴ e o modelo não ligado⁵, estudou a dinâmica molecular por clusters do sítio ativo da enzima nativa de *pdPTE*. Os seus resultados mostraram a não adequação do modelo não ligado para simulações de DM para o sistema de *pdPTE*, onde obtiveram variações na posição do inibidor dietil 4-metilbenzil paraoxon em relação a estrutura de raios X 1DPM.^{4,5} No estudo de Zhan *et. al.* as DM foram executadas com trajetórias de 550 ps de simulação.¹ Desta forma, as etapas de minimização de energia e dinâmica de aquecimento com a população de estruturas de maior energia não foram executadas de forma adequada. Portanto, a simulação já foi iniciada diretamente no *ensemble* NPT, sem a correta execução das etapas preliminares de aquecimento e equilíbrio. No estudo de Pang,⁴ as simulações de DM foram realizadas obtendo-se uma trajetória de 2,0 ns para análise.⁴ No entanto, o sistema foi primeiramente minimizado por 500 passos, e a estrutura minimizada foi aquecida a 300 K e equilibrada por 100 ps de simulação de DM. Devido ao fato que foram feitas simulações curtas, chegou-se à conclusão que o método catiônico de Dummy trata de forma adequada ligantes com número de coordenação igual a quatro nos dois complexos de zinco do sítio ativo. Entretanto, o estudo de DM usando o método não ligado demonstra diferenças entre a estrutura de raios X e o modelo do sítio ativo cristalizado.^{4,5} Como não foi utilizado nenhum formalismo para restringir movimentos artificiais da estrutura do sítio ativo, simulado por DM, de certa forma isto já poderia ser esperado. Ou seja, para se falar na não adequação do modelo não ligado para se tratar os íons metálicos, um estudo empregando-se toda a enzima através de uma dinâmica molecular com um maior tempo de produção teria que ser realizado. Outros estudos reportados apresentam esta mesma peculiaridade de simulações curtas,^{6,7} sendo um dos mais estendidos em termos de tempo de simulação o trabalho de Tsai *et al.*,⁸ onde foi realizado 25 ns de simulação, dos quais os últimos 5 ns, foram utilizados nas análises estruturais do sistema nativo de *pdPTE* contendo os íons Zn^{+2} através do modelo não ligado.

O estudo de DM mais longo para o sistema nativo de *pdPTE* foi realizado recentemente por Zhan *et. al.*⁹, com simulações de 100 ns, para o estudo da investigação da estereoseletividade de

substratos quirais organofosforados. Neste estudo a estrutura dimérica de *pdPTE* de menor resolução 1DPM⁵ foi utilizada. Contudo, após a realização de 100 ps de aquecimento e equilíbrio do sistema, as coordenadas do solvente foram fixadas durante todo o restante da simulação para aquisição de dados da trajetória da simulação de DM e utilizando o campo de força GROMOS.¹⁰ Os demais trabalhos relacionados nesta introdução utilizaram o campo de força para proteínas e substratos orgânicos do programa AMBER.¹¹

Uma característica importante do mecanismo enzimático relatada para fosforotriesterases, em especial, está relacionada ao fato do controle por difusão² do processo de hidrólise enzimática¹². Este fato relaciona-se com a facilidade e rapidez de entrada e saída do substrato no sítio ativo, sendo controlada e influenciada pelo solvente. Esta abordagem de simulação de DM mantendo-se fixas as moléculas de solvente utilizadas por Zhan *et. al.*⁹ pode influenciar a dinâmica de todo o sistema e configurar na interpretação e obtenção de resultados não adequados e que não descrevem bem os fenômenos enzimáticos. Por exemplo, a interpretação de participação e influência de moléculas de água presentes no sítio ativo enzimático,¹³⁻¹⁵ no processo de hidrólise.

Resultados experimentais para hidrólise enzimática de triésteres de fosfato¹⁶ como, por exemplo, o paraoxon (dietil 4-nitrofenil paraoxon), por *pdPTE*, demonstram que taxa de velocidade de hidrólise varia consideravelmente ao se substituir o metal no sítio ativo¹⁶. A enzima nativa pode ter os íons Zn^{+2} do sítio ativo substituídos por Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} ou Mn^{+2} , e manter atividade catalítica.² Consequentemente, estes sistemas podem vir a apresentar possibilidades diferentes de mecanismos enzimáticos, dependendo do íon metálico presente no sítio ativo, uma vez que os mesmos resíduos de aminoácidos no sítio ativo são conservados.¹³ No capítulo 4 desta Tese foi descrito o papel das moléculas de água presentes no sítio ativo de *pdPTE* substituída por Cd^{+2} , mudando a esfera de coordenação local do metal e afetando a reatividade do sítio ativo. Mostramos que uma molécula de água coordenada no átomo de Cd_{β} influencia na ativação e formação do nucleófilo OH^- *in situ*, através de mecanismo enzimático determinado através de cálculos de mecânica quântica (QM), usando o modelo de cluster do sítio ativo para a reação de hidrólise do

substrato paraoxon.¹⁵ Estudos de DM analisando-se toda a dinâmica conformacional do sistema enzima-substrato, relaxação e influência do solvente são, portanto, necessários, por exemplo, para investigar a interação do substrato no sítio ativo nos diferentes sistemas de *pdPTE* e a liberação do produto hidrolisado.

Até onde sabemos, o sistema nativo de *pdPTE* é o único que foi estudado por simulações de DM até hoje.^{1-4,6-8} Esta observação tem relação direta com a ausência de parâmetros, nos campos de força comumente utilizados, para se estudar os diferentes sistemas enzimáticos formados através da substituição do Zn^{2+} na enzima nativa pelos íons Cd^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} ou Mn^{+2} , como os cofatores metálicos. Estes estudos preliminares trouxeram algumas explicações sobre a dinâmica da enzima *pdPTE* nativa. Entretanto, questões como: i) verificação da influência dos metais no sítio ativo sobre a dinâmica conformacional e reatividade; ii) iii) a influência das demais esferas de coordenação nos mecanismos das reações enzimáticas, são algumas das questões que ainda não foram estudadas teoricamente.

A investigação teórica destes sistemas enzimáticos usando modelos de cluster do sítio ativo e simulações através de DM fundamentam e sustentam estudos mais direcionados envolvendo simulações de dinâmica QM/MM. Portanto, são cruciais de serem realizados e analisados. Assim, neste capítulo será mostrado os estudos de dinâmica molecular realizados no sistema *pdPTE* com diferentes íons metálicos. Faremos uma descrição dos dos protocolos computacionais, e todo conhecimento inicial buscado e construído, para a realização do presente estudo de DM, por simulações de dinâmica molecular clássica para as metaloproteínas de fosfotriesterases *pdPTE*.

5.2 Detalhes Computacionais

Introdução aos Detalhes Metodológicos do Estudo de DM

Uma alternativa metodológica muito interessante e importante, em relação ao uso de modelos de sítios ativos, encontra-se na abordagem clássica por DM de sistemas bioquímicos com considerável número de átomos. Uma vez que sistemas maiores e com elevados números de átomos ainda não são tratados facilmente por métodos de mecânica quântica (QM). Nesta Tese os estudos de dinâmica das metaloproteínas foram conduzidos utilizando o pacote computacional AMBER¹⁷ que vem sendo aprimorado há várias décadas para o estudo de macromoléculas biológicas. Para usuários (avançados e iniciantes) do pacote computacional AMBER, existem diversos tutoriais disponíveis, manuais fornecidos pelos desenvolvedores e *chats on line*,¹⁸ para se tirar dúvidas e serem utilizados como exemplos em diversos tipos de estudos de DM e QM/MM/DM. Entretanto, utilizar esta ferramenta computacional, tendo como base o material didático disponível, não é tarefa trivial. Diversos detalhes não são discutidos, e questões essenciais ao uso correto dos vários programas e recursos, que são disponibilizados no programa AMBER, não são abordadas claramente. Essa dificuldade ao usuário iniciante requer enorme emprego de tempo para aprender as etapas fundamentais de utilização do software, além das dificuldades inerentes ao sistema escolhido para estudo. Somado a isso, a falta de parâmetros disponíveis para o tratamento de metaloproteínas, como as estudadas nesta Tese, requer que os mesmos sejam desenvolvidos. Portanto, devido a todas essas dificuldades intrínsecas do estudo da dinâmica molecular de macromoléculas biológicas, este capítulo foi escrito com a intenção não só de apresentar e discutir os resultados, mas, também, de dar uma visão tutorial de todo o processo.

Precede como etapa inicial ao processo de realização de simulações por Dinâmica Molecular (DM) clássica, a preparação dos arquivos *inputs*, pois as estruturas selecionadas (alvos moleculares de estudo) não são utilizadas diretamente, por exemplo, pelo programa *pmemd*¹⁹ (executável do pacote AMBER que realiza as simulações de dinâmica molecular), na forma como são obtidas do banco de dados PDB.²⁰ O *pmemd* precisa, como *inputs* de entrada, além de um arquivo com as condições de controle da simulação de DM, de um arquivo de topologia *.prmtop* e um arquivo de velocidades iniciais *.inpcrd*. Um arquivo de topologia (*.prmtop*) descreve a forma como os átomos

estão conectados entre si (ligações químicas e ângulos existentes), e também os tipos de átomos, associados ao campo de força usado na simulação de DM. Sem estas informações não é possível a realização da simulação de dinâmica molecular clássica.

Parâmetros para campos de força, utilizados, por exemplo, para proteínas e ligantes orgânicos, são determinados segundo cada tipo de átomo. Os tipos de átomos dos vinte aminoácidos principais são generalizados e padronizados para os diversos tipos de campos de força disponíveis para estudos de DM.^{10,17} Entretanto, para moléculas orgânicas menores, ligantes metálicos menos específicos, ou para complexos enzima-substrato coordenados o mesmo não pode ser dito. Tem-se, portanto, a necessidade de atribuir parâmetros e tipos de átomos para os ligantes e resíduos não padrões²¹. Por exemplo, para sistemas contendo metais de transição. Consequentemente, precisam ser determinados parâmetros para descrição destes resíduos não padrões na simulação de DM em estudos de metaloproteínas.²² Para isto processos de parametrização são utilizados para se obter arquivos bibliotecas complementares a serem inseridos juntamente ao campo de força utilizado nas simulações de DM.²³

Nas próximas discussões serão mostrados os procedimentos para: i) obtenção dos sistemas em estudo; ii) parametrização dos resíduos não padronizados da enzima *pdPTE*; iii) as necessidades de redirecionamento de cálculos ao longo da metodologia adotada e iv) as dificuldades em se tratar e estudar estes sistemas enzimáticos de metaloproteínas. Cabe ressaltar ainda, que a realização das simulações de DM, somente se tornaram viáveis a partir da utilização de GPUs²⁴ para aceleração e diminuição do tempo gasto com as simulações de DM na etapa de produção. As etapas de minimização e aquecimento e início da produção tem que ser feitas em CPUs convencionais com o programa *pmemd*¹⁹ ou *sander*¹¹ (para quem não tem a licença do AMBER e só sua versão de acesso livre). O programa *pmemd.cuda*²⁵ do pacote computacional AMBER, usado para a realização das simulações de DM nas GPUs, não escala bem as velocidades iniciais. Portanto, parte-se de uma pequena simulação de produção da DM, no *ensemble* NPT, cerca de 1 a 2 ns, e segue-se com o arquivo *.rst* (restart) de velocidades equilibradas. Usando o arquivo de topologia inicial *prmtop*, e

este arquivo *.rst* o programa *pmemd.cuda* realiza as simulações de DM nas GPUs. Portanto, apresentamos a seguir os procedimentos computacionais utilizados nesta parte do trabalho, que ainda segue em fase de desenvolvimento, e análise dos resultados já obtidos através das simulações de DM da metaloproteína *pdPTE*.

I) Parametrização do Resíduo de Aminoácido Lys169 e DM com o Modelo de Íon não Ligado

A enzima *pdPTE* apresenta uma particularidade extra já mencionada na sessão de metodologia teórica desta Tese. O resíduo de aminoácido lisina (Lys169), da primeira esfera de coordenação aos metais M(II) (sendo $M = \text{Zn}^{2+}$, Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}), na enzima *pdPTE*, é uma lisina carboxilada²⁶ e, portanto, um resíduo de aminoácido não padrão para os campos de força de DM. Mostrado na figura 5.1.

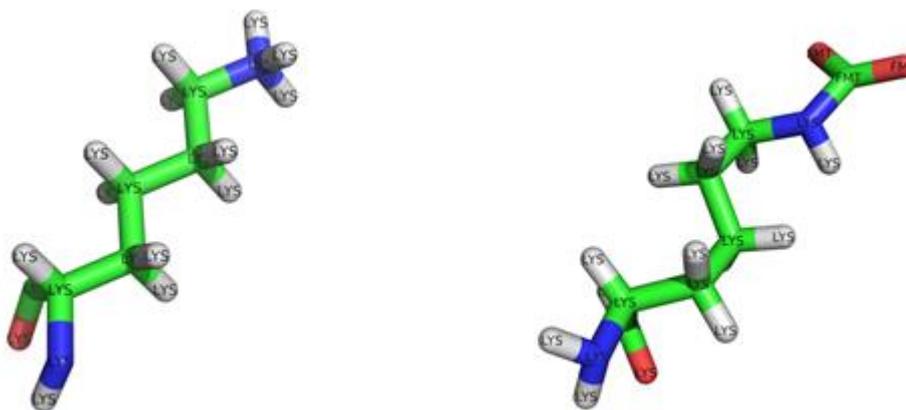


Figura 5.1: Estruturas: I) a esquerda o resíduo de aminoácido Lys169 normal e II) a direita o resíduo lisina carboxilada encontrado no sítio ativo de *pdPTE*.

São reportados na literatura trabalhos^{1,2} de DM utilizando o campo de força desenvolvido por Cornell *et. al.*²⁷ nos estudos para a enzima *pdPTE* na sua forma nativa, que contém os íons Zn^{2+} . Ou seja, utilizaram parâmetros de resíduos de aminoácidos com ligações químicas análogas à estrutura da lisina carboxilada, como por exemplo, para as ligações químicas C-O e C=O encontradas nos aminoácidos aspartato e arginina. Os autores ainda empregaram o modelo não ligado, para tratar os metais de zinco nas simulações de DM^{1,2}. A figura 5.2 apresenta a estrutura dos 20 aminoácidos naturais. Trabalhos com metaloproteínas contendo metais de transição como Zn^{28} e Cu^{29} forneceram uma descrição metodológica de desenvolvimento, obtenção e avaliação de parâmetros específicos para ligações químicas e ângulos para os campos de força do programa AMBER e, conseqüente, realização de DM. Por fundamentações baseadas nestes trabalhos^{28,29} foi desenvolvido o processo de parametrização para o resíduo de aminoácido não padrão Lys169, presente no sítio ativo de *pdPTE*. Seguidamente realizou-se a simulação de DM para a enzima *pdPTE* nativa contendo os íons Zn(II)-Zn(II), tratados através do modelo de íon não ligado.

O modelo de cluster do sítio ativo nativo de *pdPTE* otimizado no nível B3LYP/6-31+G(d,p)/LANL2DZ, foi utilizado como ponto de partida para a realização do processo de parametrização. Usou-se, também, estruturas obtidas por cálculos adicionais de otimização, usando-se o conjunto de bases mais estendida 6-311++G(d,p),³³ para os átomos de C, N, O e H. O procedimento de aplicação de restrições sobre os átomos de C do grupo $R=CH_3$ dos resíduos de aminoácidos da primeira esfera de coordenação foi utilizado. Os aminoácidos do sítio ativo foram modelados por: acetatos, metilimidazois e uma metilamina carboxilada. Assim, a estrutura do modelo de cluster foi otimizada considerando a aplicação de coordenadas congeladas e sem a aplicação desta metodologia de otimização parcial, nos dois níveis de teoria relatados. Através das geometrias otimizadas do sítio ativo obteve-se as posições de equilíbrio utilizadas para serem inseridas no campo de força relacionadas ao resíduo não padrão Lys169. As análises de frequências vibracionais foram realizadas nos mesmos níveis de teoria das otimizações com a caracterização das estruturas de mínimo. As cargas RESP (*Restrained Electrostatic Potential*)³⁴ para o resíduo de

aminoácido modificado Lys169 foram calculadas utilizando-se o procedimento RED (*Resp Esp Charge Derive*).³⁵

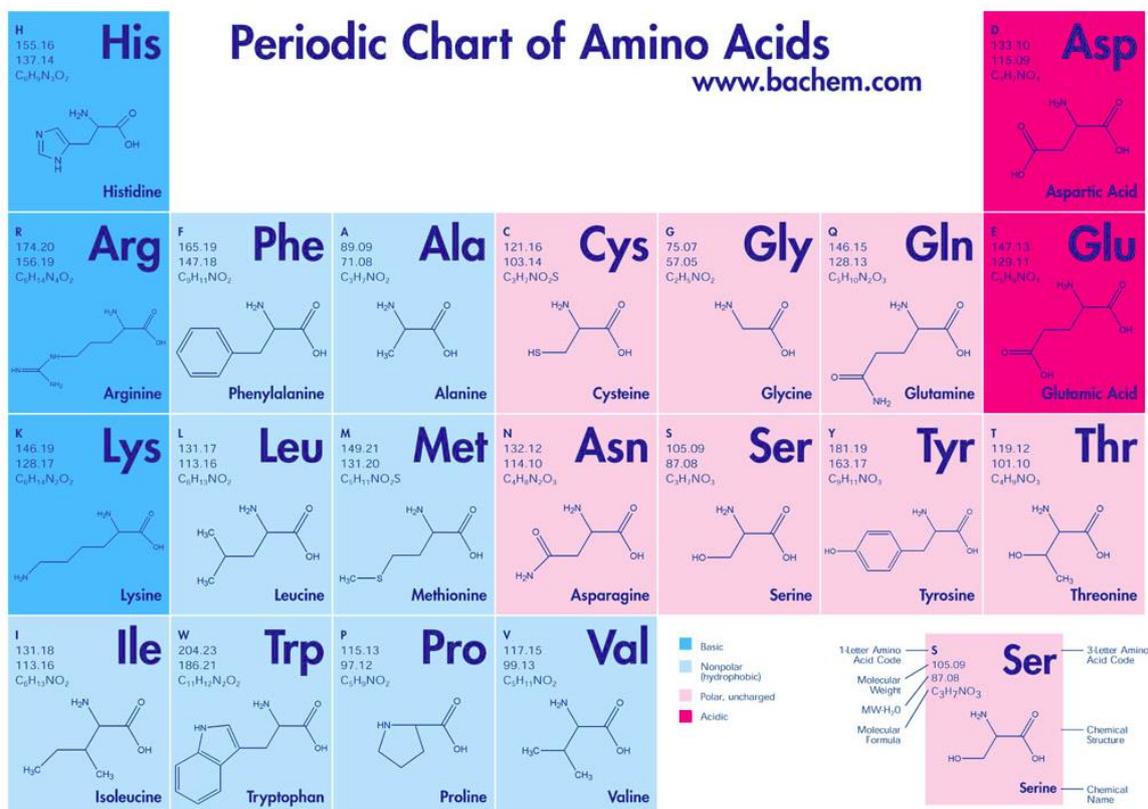


Figura 5.2: Estrutura e representação de nomenclatura dos 20 aminoácidos encontrados em sistemas biológicos. Retirado de referência³⁵.

Para o procedimento de obtenção das constantes de força harmônicas, para o resíduo não padrão de Lys169, curvas de energia potencial foram construídas variando-se as distâncias e ângulos de ligações a serem parametrizados, como mostrado na figura 5.3. Utilizou-se cálculos de *scans* rígidos, a partir da varredura na coordenada das ligações químicas e ângulos do grupo CO₂ da Lys169, ao redor dos valores as posições de equilíbrio. As constantes de força de vibração de ligação química (k_r) e a constante de força associada à deformação angular (k_θ) foram obtidas através do ajuste de uma função polinomial de segunda ordem²⁸, devido à natureza parabólica do campo de força ff14SB,¹⁷ para decrever as energias de estiramento e deformação angular. Foram

usados incrementos para a variação das distâncias de ligação química de 0,01 Å e de 0,5° para os ângulos.

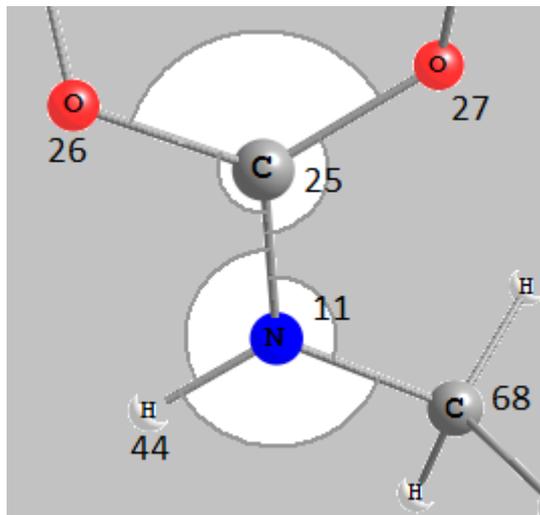


Figura 5.3: Ângulos e ligações químicas do resíduo de Lys169 de *pdPTE*, Zn(II)-Zn(II), para os quais foram necessários o desenvolvimento de parâmetros a serem incorporados ao campo de força ff14SB, do programa AMBER.

II) Dinâmica Molecular Clássica para o Sistema de *pdPTE* de Zn(II)-Zn(II) usando o modelo de campo de força não Ligado para os Íons Zn^{2+}

A simulação de dinâmica molecular foi realizada usando-se a subunidade B da estrutura dimérica de *pdPTE* em sua forma nativa. Foi empregada a estrutura de alta resolução 1HZY.¹³ Para se obter a estrutura desta subunidade B utilizou-se o programa gráfico de visualização *pymol*.³⁶ Obtida a estrutura da proteína através do banco de dados PDB,²⁰ o primeiro passo foi a preparação inicial do arquivo PDB usando o programa *pdb4amber*. A adição de átomos de hidrogênios à estrutura enzimática é realizada com o auxílio de outros programas como o *propka*³⁷ e *reduce*.³⁸ O arquivo *input* inicial é mostrado na figura 5.4

ATOM	5038	C	LEU	328	-3.913	-17.378	14.171
ATOM	5039	O	LEU	328	-4.183	-18.478	13.672
ATOM	5040	N	ARG	329	-2.781	-17.132	14.914
ATOM	5041	H	ARG	329	-2.649	-16.154	15.131
ATOM	5042	CA	ARG	329	-1.704	-18.058	15.226
ATOM	5043	HA	ARG	329	-1.339	-18.266	14.220
ATOM	5044	CB	ARG	329	-0.550	-17.403	16.049
ATOM	5045	HB2	ARG	329	-0.246	-16.471	15.572
ATOM	5046	HB3	ARG	329	-0.896	-17.197	17.062
ATOM	5047	CG	ARG	329	0.640	-18.356	16.104
ATOM	5048	HG2	ARG	329	0.338	-19.288	16.581
ATOM	5049	HG3	ARG	329	0.988	-18.562	15.092
ATOM	5050	CD	ARG	329	1.767	-17.716	16.908
ATOM	5051	HD2	ARG	329	2.070	-16.784	16.431
ATOM	5052	HD3	ARG	329	1.420	-17.510	17.920
ATOM	5053	NE	ARG	329	2.941	-18.614	16.982
ATOM	5054	HE	ARG	329	2.891	-19.512	16.523
ATOM	5055	CZ	ARG	329	4.059	-18.293	17.627
ATOM	5056	NH1	ARG	329	4.200	-17.129	18.256
ATOM	5057	HH11	ARG	329	3.443	-16.461	18.251
ATOM	5058	HH12	ARG	329	5.064	-16.919	18.735
ATOM	5059	NH2	ARG	329	5.054	-19.176	17.631
ATOM	5060	HH21	ARG	329	4.943	-20.058	17.152
ATOM	5061	HH22	ARG	329	5.915	-18.959	18.112
ATOM	5062	C	ARG	329	-2.148	-19.452	15.858
ATOM	5063	O	ARG	329	-2.518	-19.406	17.034
ATOM	5064	OXT	ARG	329	-1.896	-20.473	15.318
TER							
ATOM	5065	ZN	ZN	330	1.360	2.991	-2.636
TER							
ATOM	5066	ZN	ZN	331	4.614	3.155	-1.458
TER							
ATOM	5067	O	OHM	332	3.230	3.667	-2.746
ATOM	5068	H1	OHM	332	4.187	3.667	-2.746
TER							
ATOM	5069	Cl-	Cl-	333	-17.639	3.677	-20.766
TER							
ATOM	5070	Cl-	Cl-	334	-9.590	-19.022	5.735
TER							
ATOM	5071	O	WAT	335	4.680	5.532	-1.435
ATOM	5072	H1	WAT	335	5.638	5.532	-1.435
ATOM	5073	H2	WAT	335	4.441	6.459	-1.435
TER							
ATOM	5074	O	WAT	336	30.711	27.344	35.916
ATOM	5075	H1	WAT	336	30.630	26.430	35.645
ATOM	5076	H2	WAT	336	30.297	27.841	35.210
TER							

Figura 5.4: Arquivo *proteína.pdb* obtido após tratamento com o programa *pdb4amber* e já com átomos de hidrogênio adicionados após uso do programa *propka*³⁷ e *reduce*.³⁸

Para execução das DM usou-se os módulos, *pmemd* e *pmemd.cuda*, do programa AMBER com o campo de força para proteínas *ff14SB* reportado por Maier *et. al.*³⁹ e os arquivos biblioteca

A subunidade B de *pdPTE* foi seguidamente imersa em uma caixa retangular (com tamanho inicial de 96.80 Å x 93.48 Å x 93.05 Å) em solvatação explícita com 10.022 moléculas de água TIP3P.⁴¹ Dois contra-íons de Cl⁻ foram adicionados para neutralização do sistema. Após estas etapas de preparação usando o programa *xleap* do AMBER obteve-se os arquivos de partida *.prmtop* e *.inpcrd* para iniciar a simulação de DM do sistema nativo de *pdPTE* usando o formalismo de íon não ligado. Para a execução de uma DM três etapas são necessárias, sendo: minimização, aquecimento e produção.⁴² Cada uma destas etapas da simulação contém arquivos de controle nos quais estão indicadas as condições para a realização da DM.⁴³

A etapa de minimização de energia por sua vez, também pode ser subdividida, e foi realizada em duas partes. O objetivo deste processo é ajustar a estrutura do sistema em relação a interação das moléculas do solvente e soluto, relaxar possíveis impedimentos espaciais e mal contatos criados durante a preparação da estrutura inicial, em especial relacionadas a adição de moléculas de solvente e/ou decorrentes do processo de cristalização da proteína. A primeira etapa da minimização envolveu a realização de 1000 passos com o algoritmo *steepest descente*, seguidos de 4000 passos de gradiente conjugado (*conjugate gradient*)⁴⁴ mantendo uma restrição em todo sistema da proteína, aplicando uma constante de força de 100 kcal.mol⁻¹.Å, exceto para as moléculas de água que foram deixadas relaxar e minimizar suas posições e interações. Usou-se um raio de corte (*cutoff*) para as interações não ligadas de 10 Å. Posteriormente, foi realizada uma segunda minimização deixando todo o sistema (proteína + solvente) relaxar sem usar restrições e com a mesma subdivisão de passos e algoritmos da primeira minimização. Após esta etapa de minimização inicia-se o processo de dinâmica molecular com o aquecimento do sistema. Esta parte do cálculo de DM foi realizada a volume constante (*ensemble* NVT), e com variação da temperatura de 5 K a 300 K e, também, foi realizada em etapas. Assim, realizou-se o aquecimento a cada 10 ps e com variação de 50 K. Após cada aquecimento realizou-se 100 ps de simulação para o sistema equilibrar na nova temperatura. Seis etapas, portanto, foram realizadas até o sistema atingir 300 K. Especificamente nesta

temperatura o sistema foi deixado equilibrar por mais 5000 ps antes de começar a etapa de produção da DM. Durante estas etapas de uma DM verifica-se a convergência do sistema por meio do monitoramento de propriedades energéticas do sistema como energia cinética, energia potencial, energia total, densidade e RMSD, por exemplo. A etapa de produção foi realizada no *ensemble* NPT. Nesta etapa o sistema foi submetido a cerca de 100 ns de simulação a temperatura de 300 K e uma pressão constante de 1 bar. Condições periódicas de contorno foram utilizadas na simulação.

No *ensemble* NVT, foi utilizado o termostato de Langevin,⁴⁵ com frequência de colisões a cada $2,0 \text{ ps}^{-1}$, raio de corte (*cutoff*) de 10 \AA para interações não ligadas, e o método de Particle Mesh Ewald (PME)⁴⁶, para as interações eletrostáticas e de longa distância. O algoritmo SHAKE⁴⁷ foi utilizado para restringir as ligações envolvendo átomos de hidrogênio, permitindo um passo de simulação de 2 fs. No *ensemble* NPT utilizou-se os mesmos parâmetros anteriores somadas ao barostato isotrópico de Berendsen,⁴⁸ com constante de acoplamento 1,0 ps para manter a pressão constante. Novamente, o algoritmo SHAKE⁴⁷ foi utilizado para restringir as ligações envolvendo átomos de hidrogênios e, portanto, diminuir movimentos de alta frequência e dinâmica. A simulação foi analisada obtendo-se dados de RMSD (*root-mean-square deviation*), RMSF (*root mean square fluctuation*), Raio de Giro, função de distribuição radial do solvente (RDF), e variação de distâncias específicas dos resíduos de aminoácido no sítio ativo de *pdPTE*, utilizando-se os programas *parmed*⁴⁹ e *cpptraj*⁵⁰ do pacote de programas AMBER.

III) Parametrização dos Sistemas de *pdPTE* através do Modelo Ligado para: Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II) usando o Programa MCPB.py e Simulações de DM

Devido ao modelo não ligado,⁴⁰ utilizado para os metais de transição no sistema nativo de *pdPTE*, não tratar de forma adequada a enzima e o sítio ativo perder sua estrutura para longas simulações, iniciou-se o processo de obtenção de parâmetros para realização das simulações de DM utilizando-se o modelo ligado.⁵¹ A princípio a ideia seria utilizar o mesmo formalismo empregado para a modelagem e obtenção dos parâmetros para o resíduo de Lys169. No entanto, os parâmetros

foram obtidos utilizando o programa MCPB.py,⁵² que é um conjunto de rotinas escritas em *python*, adicionados ao programa AMBER a partir da versão 15.

```
ATOM 6790 CB SER 423 18.807 -15.221 7.233
ATOM 6791 HB2 SER 423 19.365 -15.785 7.980
ATOM 6792 HB3 SER 423 18.543 -15.878 6.404
ATOM 6793 OG SER 423 19.605 -14.153 6.754
ATOM 6794 HG SER 423 20.405 -14.505 6.357
ATOM 6795 C SER 423 16.713 -15.933 8.356
ATOM 6796 O SER 423 16.783 -16.299 9.529
ATOM 6797 N THR 424 15.971 -16.561 7.443
ATOM 6798 H THR 424 15.930 -16.214 6.496
ATOM 6799 CA THR 424 15.180 -17.747 7.783
ATOM 6800 HA THR 424 15.187 -17.907 8.861
ATOM 6801 CB THR 424 13.719 -17.613 7.315
ATOM 6802 HB THR 424 13.128 -18.418 7.753
ATOM 6803 CG2 THR 424 13.148 -16.267 7.752
ATOM 6804 HG21 THR 424 13.738 -15.462 7.314
ATOM 6805 HG22 THR 424 12.114 -16.184 7.416
ATOM 6806 HG23 THR 424 13.182 -16.193 8.839
ATOM 6807 OG1 THR 424 13.661 -17.733 5.888
ATOM 6808 HG1 THR 424 12.750 -17.650 5.597
ATOM 6809 C THR 424 15.764 -19.013 7.154
ATOM 6810 O THR 424 16.832 -18.984 6.538
ATOM 6811 OXT THR 424 15.187 -20.092 7.273
ATOM 6812 FE FE 425 -2.313 -5.451 -9.918
ATOM 6813 ZN ZN 426 -0.051 -3.602 -10.842
ATOM 6814 O OHM 427 -1.070 -5.549 -11.739
ATOM 6815 H1 OHM 427 -0.113 -5.549 -11.739
END
```

Figura 5.6: Arquivo *proteína.pdb* obtido após tratamento com o programa *pdb4amber* e já com átomos de hidrogênio adicionados, após uso do programa *propka*,³⁷ para definição dos estados de protonação. Arquivo no formato para iniciar o uso do programa MCPB.py⁵² de parametrização.

O processo de parametrização iniciou-se com as etapas de preparação do arquivo PDB da proteína. Assim, realizou-se a definição inicial dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos e alterou-se, manualmente no arquivo *.pdb* da proteína, a classificação do tipo de resíduos de aminoácidos. Isto é feito mudando-se o nome de identificação do resíduo de aminoácido e que tenha especificação no campo de força a ser usado. Assim, no campo de força ff14SB do programa AMBER podemoster, para a histidina, as seguintes possibilidades de nomes de resíduos de identificação: HIE, DID e HIP, respectivamente, para histidinas protonadas nos nitrogênios: ϵ (épsilon), δ (delta) ou em ambas as posições. No protocolo que adotamos preparamos primeiramente a estrutura do sistema de forma a ser usado para uma simulação com o modelo de

ion não ligado. Todo o processo é realizado com os programas e campos de força do AMBER. Para se iniciar a sequência de etapas para a parametrização com o programa MCPB.py é necessário somente a eliminação dos termos de separação de cadeias e/ou resíduos de aminoácidos não ligados “TER”. A Figura 5.6 apresenta o formato da parte final do arquivo *.pdb* que foi preparado e usado na parametrização da enzima fosfatase ácida púrpura (PAP),⁵³ que contém os íons Fe(III)-Zn(II) no sítio ativo. Observa-se a não separação através da sigla “TER” entre os metais de transição e o restante da proteína. Os tipos de átomos O e H1 que estão abaixo o tipo de átomo representado por ZN são relacionados ao ligante OH⁻, que também é encontrado coordenado em ponte aos metais no sítio ativo nos sistemas enzimáticos de PAP's. A simulação de DM de 1μs deste sistema (PAP) foi realizada, bem como estudos com modelos de cluster do sítio ativo incorporando resíduos da segunda esfera de coordenação, mas os resultados não serão discutidos nesta Tese de Doutorado.

As etapas seguintes consistem na criação de um arquivo *.mol2* para os metais usando o programa *antechamber* e a criação de um arquivo de controle *.in*. Este arquivo contém as especificações usadas pelo programa MCPB.py como, por exemplo, a identificação da numeração dos átomos metálicos no arquivo PDB, especificação da distância máxima dos metais aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo e nome dos arquivos *.mol2* dos metais de transição. Após estes procedimentos realizou-se o uso do programa MCPB.py através do método *seminário*⁵² com a criação dos dois modelos do sítio ativo, um maior (com 174 átomos) e outro menor (com 95 átomos). Estas estruturas são usadas nos cálculos quânticos para obtenção dos parâmetros para o campo de força, no caso, o ff14SB do programa AMBER. Nesta etapa foi utilizado o programa Gaussian09⁵⁵ para realização dos cálculos quânticos. Estas etapas estão discutidas com mais detalhes na parte de metodologia computacional no capítulo 2 desta Tese. O leitor interessado pode procurar mais informações nas referências citadas,^{52,56,57} bem como na página do programa AMBER,⁵⁸ que dispõem de tutoriais para este processo de parametrização, e mais especificamente o tutorial 20. Sobre isso destacamos que, através de trocas de e-mail com um dos desenvolvedores do programa MCPB.py, Pengfei Li,⁵² os estudos de parametrização realizados neste Doutorado

ajudaram a melhorar os tutoriais disponíveis. Isto foi realizado através de um processo de criação de arquivos iniciais que foi utilizado na parametrização de complexos organometálicos e expandido para proteínas. Uma vez que os usuários apresentam frequentemente grande dificuldade inicial ao usar o programa MCPB.py, esta contribuição serviu para o desenvolvimento, por exemplo, de tutoriais seguintes para enzimas contendo o íon ferro como no citocromo P450 (grupo HEME).

Ao final do processo de parametrização o programa *parmed*⁴⁹ do programa AMBER foi utilizado para se verificar a coerência e adequação da topologia gerada através dos parâmetros obtidos durante o processo de parametrização. Deste modo, os seguintes critérios relacionados com os parâmetros associados aos íons metálicos são avaliados: I) as constantes de força de ligação química entre um íon metálico e seus átomos de coordenação dos resíduos de aminoácidos devem ser inferiores a 200 kcal/(mol x Angstrom²), e as distâncias de equilíbrio inferiores a 2,8 Angstrom; II) as constantes de força associadas às deformações dos ângulos com os íons metálicos são geralmente inferiores a 100 kcal/(mol x Rad²) enquanto os valores de equilíbrio dos ângulos são maiores do que 100 graus; III) Todas ou a maioria das barreiras são zero para os potenciais diédricos envolvidos com os metais; IV) A carga RESP³⁴ do íon metálico é inferior ao seu estado de oxidação, geralmente menor que +1; V) O raio de LJ de um íon metálico geralmente é maior que 1,0 Angstrom.⁵² Após estas etapas obtém-se o arquivos para se iniciar a simulação de DM.

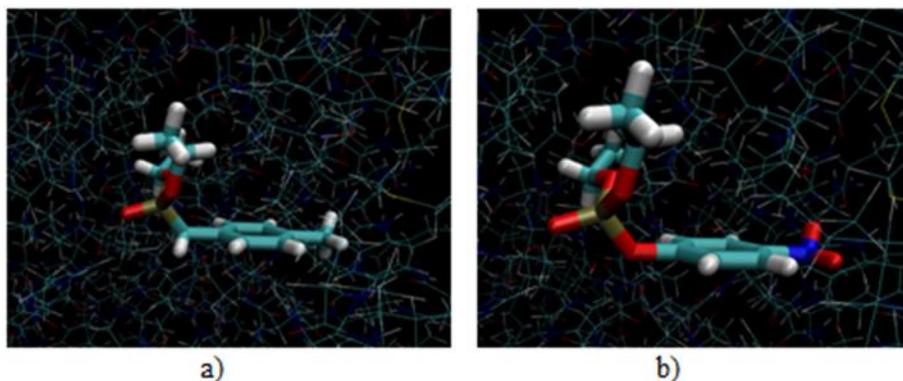


Figura 5.7: Representação dos ésteres de fosfato: a) dietil 4-metilbenzil paraoxon e b) dietil 4-nitrofenil paraoxon no sítio ativo de Zn(II)-Zn(II) parametrizado para realização de DM utilizando o modelo ligado. Estruturas representadas sem as moléculas de água da caixa de solvatação para melhor visualização.

Para a realização das simulações de DM envolvendo o modelo ligado,⁵¹ utilizou-se as mesmas condições de controle, para a execução das etapas de minimização, aquecimento e produção no estudo dos sistemas de *pdPTE* com Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II), que foram utilizadas na simulação de DM envolvendo o sistema nativo de *pdPTE* e o uso do modelo não ligado. Foram realizadas três simulações de DM para cada sistema parametrizado, com o tempo de 800 ns de produção para cada simulação de DM. Assim, cada sistema metálico, Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II), foi simulado contendo somente a proteína, proteína mais o inibidor dietil 4-metilbenzil paraoxon e proteína mais o melhor substrato de fosfotriesterases, o triéster de fosfato dietil 4-nitrofenil (paraoxon). Os parâmetros para estes ésteres de fosfato foram obtidos usando-se os programas *antechamber* e *parmchk2*, do pacote computacional AMBER, obtendo-se os arquivos biblioteca *.mol2* e *.frcmod* do inibidor e do substrato. As cargas RESP³⁴ de cada éster foram obtidas através do programa RED.³⁵ As estruturas foram geradas pela sobreposição da proteína de código PDB 1DPM⁴ que contém o inibidor cristalizado com, por exemplo, a estrutura de código PDB 1HZY¹³ (de maior resolução), ambas contendo os íons de Zn(II)-Zn(II) nos sítios ativos e conservando os mesmos resíduos de aminoácidos. O mesmo procedimento de sobreposição foi realizado sobre as variantes 1I0D e 1JGM obtendo-se os sistemas Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II).¹³ A estrutura do substrato paraoxon foi obtida por modificações nos átomos do inibidor:

substituiu-se o átomo C7 por um átomo de oxigênio (O) e o grupo metil (CH₃) ligado na posição *para* do anel aromático foi substituído por um grupo nitro (NO₂). Na Figura 5.7 mostra-se os dois ésteres de fosfato, já inseridos nos correspondentes arquivos gerados após o processo de parametrização para a enzima nativa de *pdPTE* com os íons Zn(II)-Zn(II). Portanto, foi utilizada a estrutura co-cristalizada do inibidor⁴ e sua localização no sítio ativo para a realização dos primeiros estudos de DM enzima-substrato variando-se os metais de transição no sítio ativo de *pdPTE*.

5.3 Resultados e Discussão

I) Parametrização do resíduo não padrão Lys169

As constantes de força da vibração da ligação química (K_r) e a constante de força associada à deformação angular (K_θ) foram obtidas pelo ajuste de uma função polinomial de segunda ordem^{28,29} com a obtenção destes parâmetros para o resíduo de Lys169. Empregou-se na obtenção destes dados a estrutura construída para o modelo de cluster do sítio ativo de *pdPTE* da enzima nativa contendo os íons Zn⁺². Um total de cinco ligações químicas e seis ângulos foram submetidos ao processo de varredura e obtenção das curvas de energia potencial. Mostramos novamente estas ligações químicas e ângulos através da reprodução mostrada na Figura 5.8.

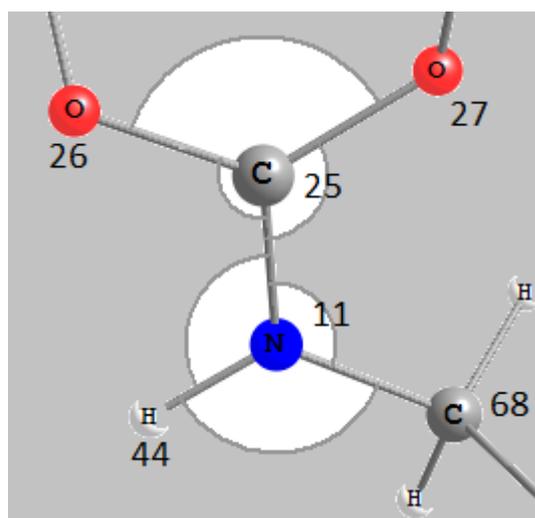


Figura 5.8: Ângulos e ligações químicas do resíduo de Lys169 de *pdPTE*, Zn(II)-Zn(II), para os quais foram necessários o desenvolvimento de parâmetros a serem incorporados ao campo de força ff14SB, do programa AMBER.

Em relação às coordenadas das ligações químicas avaliou-se, durante o processo de *scan* rígido, a superfície de energia potencial com variação nos deslocamentos em relação à posição de equilíbrio com números de passos de 6, 8, 10 e 12, respectivamente. Estes números de passos significam que, por exemplo, para o número de passos igual a 6, em relação a posição de equilíbrio, o cálculo de SCAN foi realizado variando-se 6 passos para a direita e 6 passos para a esquerda do valor de equilíbrio. Ou seja, no caso da ligação química realizando o estiramento e diminuição do comprimento de seu valor ao redor da posição de equilíbrio. Isto foi realizado para cada ligação química e nível de teoria utilizado no processo de otimização das geometrias. Foram usados incrementos para a variação da coordenada de ligação química de 0,01 Å. A seguinte análise foi realizada para verificar o ajuste em relação a aproximação harmônica, que é válida e melhor descrita para pequenas distorções e oscilações ao redor da posição de equilíbrio, da geometria otimizada.

Os ângulos tiveram as curvas de energia potencial ajustadas em relação ao número de passos 6, 9 e 12 sobre as mesmas estruturas do modelo de cluster do sítio ativo. Para estes foram usados incrementos para a variação da coordenada de deformação angular de 0,5°. Portanto, foram obtidos

quatro parâmetros de constante de força por número de pontos variados para cada ligação química. Em virtude das otimizações terem sido realizadas com e sem a restrição de coordenadas congeladas nos átomos de C terminais e dos dois níveis de teoria utilizados B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ e B3LYP/6-311++G(d,p)/LANL2DZ.

Sumarizando: empregaram-se estruturas do sítio ativo com restrições sobre coordenadas congeladas e sem o uso desta aproximação no sítio ativo para os cálculos de SCANS. Este procedimento foi realizado para avaliar-se o uso desta aproximação sobre os valores das constantes de força obtidas no processo de parametrização. Desta forma conseguimos avaliar que o uso desta aproximação confere melhores ajustes às curvas de energia potencial, e conseqüentemente, fornecem melhores valores aos parâmetros de constante de força. A seguir representa-se algumas curvas de energia potencial, obtidas para a caracterização da metodologia e visualização dos resultados. Na Figura 5.9 mostra-se resultados para a descrição de estiramento e obtenção de constante de força associada às ligações químicas, e na Figura 5.10 as curvas relacionadas à descrição de constantes de força para deformação angular. Nesta aproximação os termos de ordem quadrada são considerados as constantes de força de ligação química e deformação angular.

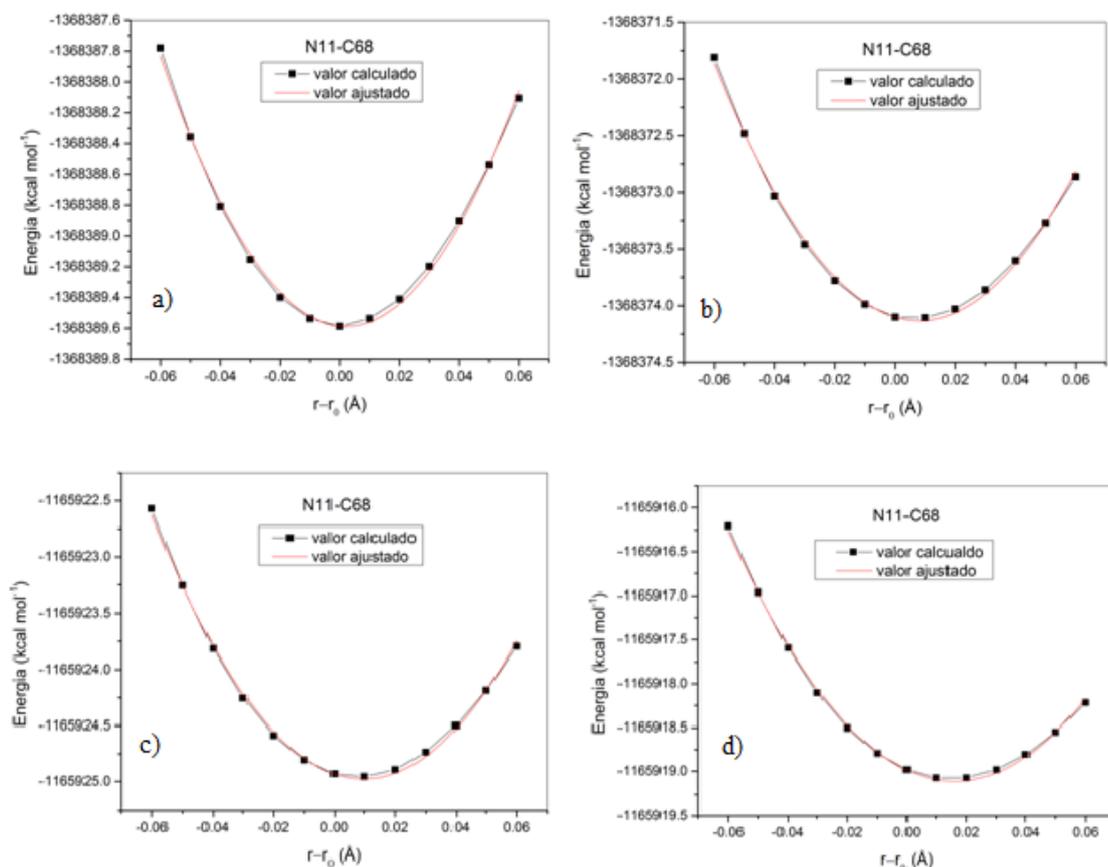


Figura 5.9: Curvas de energia potencial, obtidas via *scan* rígido e ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, obtidas para parametrização de constante de força de ligação química entre os átomos de N11 e C68, do resíduo COO terminal da Lys169 na enzima *pdPTE/1HZY*. Cálculos realizados no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ.

Tabela 5.1: Constantes de força e distâncias de equilíbrio obtidos na parametrização envolvendo a ligação N11 e C68 do resíduo Lys169 na enzima *pdPTE/1HZY*.

Nível de Teoria	K_r [kcal/(mol. Å ²)]	r_{eq} (Å)	R-quadrado Ajustado
a) 6-31+G(d)	455,9	1,46	0,9950
b) 6-31+G(d)*	489,3	1,46	0,9954
c) 6-311++G(d,p)	485,2	1,46	0,9963
d) 6-311++G(d,p) *	492,2	1,46	0,9960

* Otimização com restrição de coordenadas congeladas.

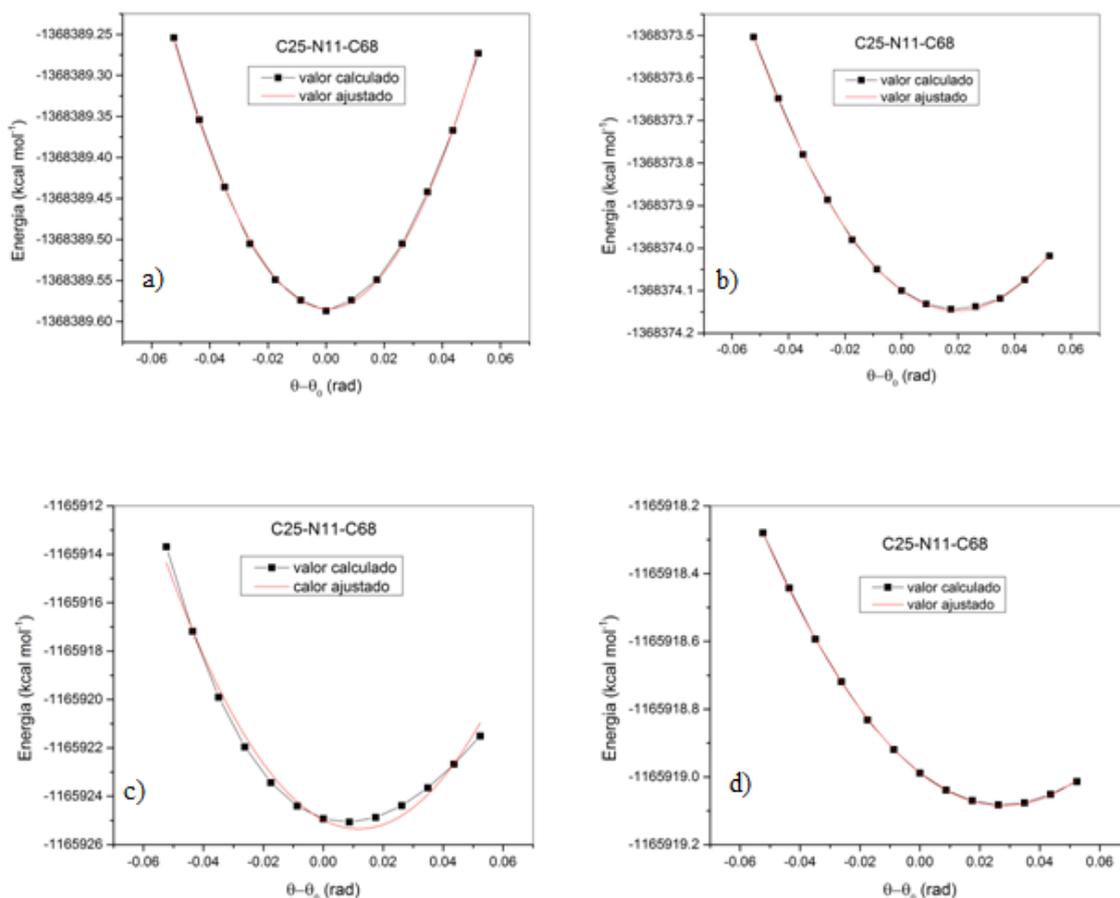


Figura 5.10: Curvas de energia potencial, obtidas via *scan* rígido e ajuste de uma função polinomial de segunda ordem, obtidas para parametrização de constante de força de deformação angular entre os átomos de C25-N11-C68, do resíduo COO terminal da Lys169 na enzima *pDPTE/1HZY*. Cálculos realizados no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ.

Tabela 5.2: Contante de força e ângulo de equilíbrio obtidos na parametrização envolvendo o ângulo C25-N11-C68 do resíduo Lys169 na enzima *pDPTE/*.

Nível de Teoria	K_{θ} [kcal/(mol. rad ²)]	θ_{eq} (rad)	R-quadrado Ajustado
a) 6-31+G(d)	117,3	2,2	0,9994
b) 6-31+G(d)*	123,8	2,2	0,9998
c) 6-311++G(d,p)	2671,1	2,2	0,9850
d) 6-311++G(d,p) *	125,3	2,2	0,9999

* Otimização com restrição de coordenadas congeladas.

Nas curvas de energia potencial representadas nas figuras 5.6 e 5.7 temos a apresentação dos ajustes avaliados para a ligação química N11-C68, e entre os ângulos C25-N11-C68. Nas Tabelas 5.1 e 5.2 apresentamos os valores de constantes de força obtidas para as ligação química e deformação angular apresentadas na Figura 5.9 e 5.10. Considerando a variação de todos os números de pontos obtivemos um total de 16 parâmetros para cada ligação química. Sendo que 5 ligações químicas foram parametrizadas. O que totaliza 80 parâmetros de constante de força para todas as ligações químicas analisadas. Fazendo-se a mesma estatística sobre os valores relativos aos ângulos obteve-se um total de 72 ($4 \times 3 \times 6 = 72$) parâmetros de constantes de força para deformação angular. O presente estudo sistemático foi realizado buscando-se ajustar os melhores valores e a definição do protocolo a ser utilizado durante os cálculos de *scan* rígido e processo de parametrização.

A obtenção de uma melhor geometria para o sítio ativo⁵⁹ influencia no processo de parametrização, pois os cálculos de SCAN são feitos sobre a geometria otimizada através de cálculos de energia no ponto. Através da análise dos gráficos verifica-se que a metodologia adotada para a obtenção dos parâmetros de constantes de força fornece um bom ajuste para a curva de energia potencial. Observa-se ainda que o procedimento de manter restrições sobre as coordenadas dos átomos terminais de C do grupo metila, R=CH₃, fornecem os melhores ajustes para a função polinomial de segunda ordem. Os valores de R² ajustados através da função polinomial de segunda ordem exemplificam esta afirmação. Observa-se uma melhor descrição estatística, através do valor de R², para o sítio ativo otimizado com restrições de coordenadas congeladas. Observa-se ainda que para as constantes de força sobre as ligações químicas o número de passos igual a 6 ao redor da posição de equilíbrio e o nível de teoria DFT com a função de base menor, 6-31+G(d,p) são suficientes para descrever bem o ajuste e obter as constantes de força de ligações químicas. Verificou-se, também, em relação à deformação angular que o uso de um maior número de pontos a serem ajustados na curva de energia potencial estão associados a piores descrições através da função polinomial de segunda ordem. Ficou evidenciado, também, que em relação a constante de

força de deformação angular é observada e obtida uma maior sensibilidade e variação verificada no processo de parametrização em decorrência dos valores obtidos. Assim, o uso de um número menor de passos a serem variados ao redor da posição de equilíbrio mostrou-se ser mais adequado para as ligações químicas e ângulos a serem obtidos os parâmetros nesta geometria do sítio ativo.

O ajuste em relação a aproximação harmônica é melhor descrito, por pequenas distorções e variações, com relação aos valores das posições de equilíbrio.²⁹ Quanto maior o número de pontos nesta região e menor o valor de incrementos para a construção da curva de energia potencial seria o ideal para a melhor descrição do valor das constantes de força. Entretanto, para cada sistema esta possibilidade tem que ser sistematicamente analisada, o que demanda um número elevado de cálculos, custo computacional ao se aumentar o nível de teoria e tempo de execução do trabalho de obtenção de parâmetros para adequação a campos de força.

Uma alternativa, após determinar-se qual o número de passos a serem utilizados é verificar a magnitude de variação da constante de força ao se diminuir o tamanho dos incrementos de deslocamentos na superfície de energia potencial. Para demonstrar esta afirmativa e exemplificar os ajustes possíveis, obtivemos uma nova constante de força para a ligação C25-N11. Utilizamos o número de pontos igual a 6 para serem variados durante o cálculo de *scan* rígido. Entretanto, diminuimos o valor de incremento a ser utilizado para 0,005 Å, ou seja, a metade o valor inicial utilizado. A nova curva de energia potencial forneceu um valor de R^2 ajustado de 0,9991 e uma constante de força de para a ligação química C25-N11 de 531,1 kcal/(mol. Å²). Portanto, comparando-se este resultado com o obtido com o dobro de incremento no deslocamento de um ponto ao outro, 536,9 kcal/(mol. Å²), observamos uma variação no valor da constante de força para esta ligação química de ~ 4,0 kcal/(mol. Å²). Assim, em virtude desta baixa variação, optou-se em usar para a construção do arquivo de parâmetros *.frcmod* para a Lys169, os parâmetros de constantes de força inicialmente obtidos no nível de teoria B3LYP/LANL2DZ/6-31+G(d) e com otimização usando coordenadas congeladas para os átomos de C do grupo CH₃ terminal no modelo de cluster do sítio ativo.

As constantes de força, portanto, estão em bom acordo e ordem de grandeza análogos a parâmetros usados⁴ e adaptados através do campo de força de Cornell *et. al.*²⁷ para ligações químicas e ângulos em resíduos de aminoácidos normais, como Asp (C-O2 = 570,0 kcal/(mol. Å²), Arg (C-N2 = 481,0 kcal/(mol. Å²), para os quais o campo de força ff14SB apresenta parâmetros. Na Figura 5.11 mostramos o formato e arquivo *.frcmod* obtido para o resíduo de aminoácido não padrão Lys169, em relação aos átomos terminais do grupo CO₂.

```

remark goes here
MASS
C8 12.01      0.878
CO 12.01      0.616

BOND
N3-CO  531.1  1.3600

ANGLE
H -N3-CO   82.5  114.6
N3-CO-O2  210.7  114.6
N3-CO-O2  214.5  120.3
C8-N3-CO  125.3  126.1

DIHE
H -N3-CO-O2  1  0.000  0.0  2.
H -N3-CO-O2  1  0.000  0.0  2.
C8-N3-CO-O2  1  0.000  0.0  2.
C8-N3-CO-O2  1  0.000  0.0  2.

IMPROPER

NONBON
C8      1.9080  0.1094
CO      1.9080  0.0860

```

Figura 5.11: Arquivo biblioteca para o grupo CO₂ terminal no resíduo de aminoácido não padrão Lys169 presente e coordenado em ponte no sítio ativo de *pdPTE*.

Assim, resumindo o processo de parametrização, temos: i) obtém-se as posições de equilíbrio através da estrutura otimizada; ii) as constantes de força são calculadas através da obtenção das curvas de energia potencial e ajuste a uma função polinomial de segundo grau; iii) as cargas RESP são obtidas através de cálculos QM sobre a estrutura do sítio ativo otimizado. Estes parâmetros foram inseridos via arquivos biblioteca, juntamente com o campo de forças ff14SB do programa AMBER, para a simulação por DM do sistema de *pdPTE*, nativo de Zn⁺². Por etapa final após carregar o campo de força, arquivos biblioteca e estrutura PDB da proteína no programa *xleap* do AMBER, ainda tem-se que inserir manualmente as cargas RESP e conectar as ligações químicas

do grupo CO₂ ao aminoácido de Lys169. Feito isso salva-se a estrutura da proteína solvatada e obtém-se os arquivos *.prmtop* e *.inpcrd* para se iniciar a simulação de DM.

Observando os resultados obtidos podemos concluir que, embora extremamente custoso computacionalmente, este protocolo metodológico pode ser utilizado para a parametrização de ligações químicas no sítio ativo,^{28,29} envolvendo outras ligações químicas e resíduos não padrões. Estas parametrizações iniciais evidenciam o fato e que a maioria dos campos de força hoje disponíveis nem sempre possuem parâmetros apropriados, principalmente, para descrever metais de transição. Este fato se torna um obstáculo prático para estudos de modelagem molecular de metaloproteínas, pois se tem a necessidade de parametriza-los. Este é um dos grandes gargalos das simulações por dinâmica molecular clássica e para a mecânica molecular.

II) DM Clássica da Subunidade B de *pdPTE* Usando o Formalismo de Campo de Força não Ligado para os Íons Zn²⁺

Iniciamos o processo de DM molecular de *pdPTE* em sua forma nativa utilizando a subunidade B da estrutura dimérica de alta resolução 1HZY, apresentada por Benning *et al.*,¹³ que reportaram estruturas cristalizadas para os sistemas de Zn(II)-Zn(II), Cd(II)-Cd(II) e Zn(II)-Cd(II) no sítio ativo e sem a presença de inibidores co-cristalizados. Através do uso dos parâmetros obtidos para o resíduo de Lys169, presente no sítio ativo de *pdPTE* e usando o campo de força AMBER, ff14SB, realizamos as etapas de preparação do sistema a ser simulado, mostrado na Figura 5.12.

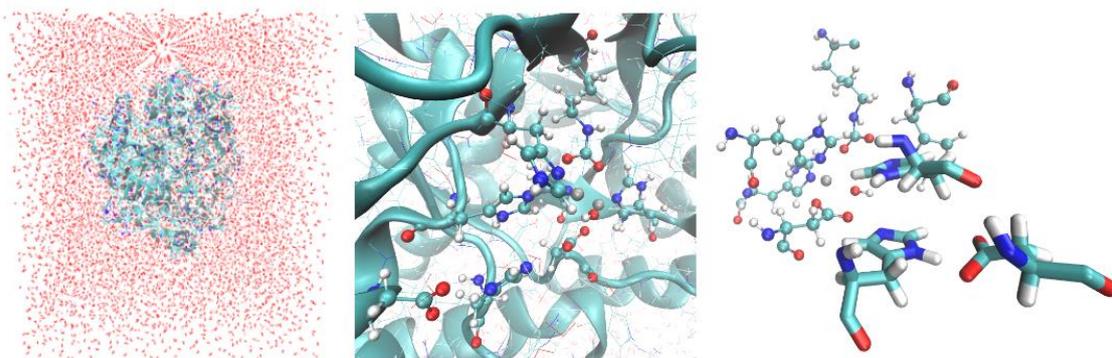


Figura 5.12: Estrutura solvatada do sistema nativo de *pdPTE* e representação dos resíduos no sítio ativo.

A simulação de DM foi realizada tratando-se os íons metálicos através do modelo de íon não ligado. Após a realização das duas etapas de minimização, e da rampa de aquecimento de 660 ps de simulação alternando-se etapa de aquecimento e equilíbrio no *ensemble* NVT, foi iniciada a etapa de produção no *ensemble* NPT. Durante esta etapa foram realizados aproximadamente 100 ns de produção, para obtenção da trajetória do sistema. Foram realizadas a análise do RMSD da proteína em relação aos carbonos alfa (CA), e análises de variação das distâncias entre os átomos dos resíduos de aminoácidos direcionados a ambos os metais de Zn^{+2} . O RMSD dos resíduos de aminoácidos da cadeia lateral que formam o sítio ativo, também foi avaliado. A Figura 5.13 mostra RMSD da etapa de produção em relação à variação dos carbonos CA da estrutura da proteína nativa de *pdPTE* (linha preta) e o correspondente RMSD associado aos resíduos do sítio ativo enzimático (linha vermelha).

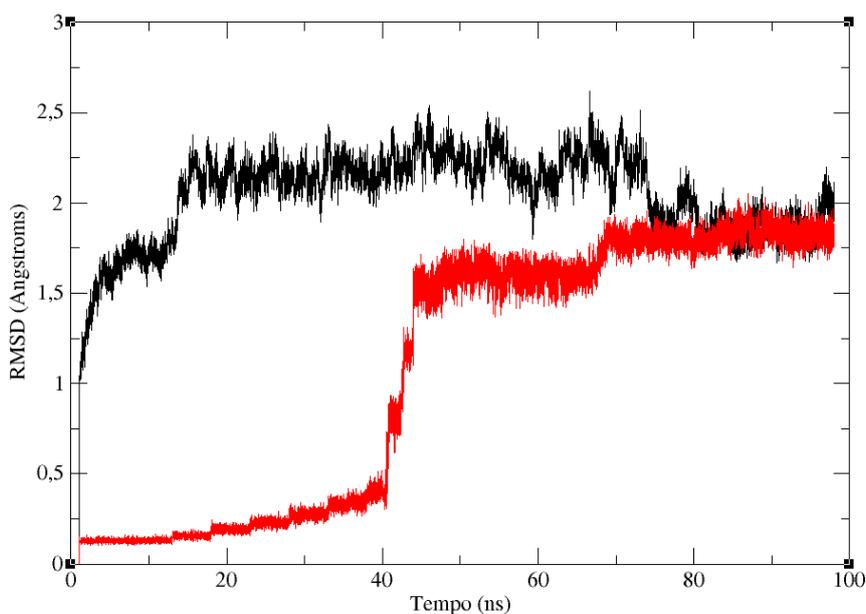


Figura 5.13: Gráfico de RMSD plotado em relação a simulação de DM usando o método de íon não ligado, para o sistema nativo de *pdPTE*, contendo os íons Zn^{+2} . RMSD dos carbonos alfa da proteína (linha preta) e RMSD dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo (linha vermelha).

Através do gráfico de RMSD da proteína em relação aos carbonos alfa podemos perceber que a enzima começa a estabilizar sua estrutura com uma variação de cerca de aproximadamente 2,25 angstroms após cerca de 20 ns de simulação até aproximadamente 70 ns de simulação de DM na etapa de produção. A partir deste ponto da trajetória ocorre novamente uma variação associada a uma diminuição para o valor de cerca de 1,75 angstroms. Entretanto, quando analisamos a trajetória dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo através de seus RMSD globais, observa-se uma significativa variação. Podemos analisar, através do gráfico de RMSD associado (linha vermelha), que o sistema permanece estável até cerca de 40 ns de simulação e com pequena variação no RMSD dos resíduos do sítio ativo em cerca de aproximadamente 0,5 angstroms. Ou seja, o modelo de íon não ligado e os parâmetros utilizados descrevem bem o sistema até este tempo de simulação. Contudo, a partir de cerca destes 40 ns de produção de DM, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo sofrem significativa variação de sua posição. Isto está demonstrado através da significativa variação de aproximadamente 1,30 angstroms em seus valores de RMSD globais. Assim, podemos verificar que através da metodologia utilizada o modelo não ligado para os metais no sítio ativo não

é adequado para a realização de simulações longas deste sistema de *pdPTE*. Em virtude de termos realizado uma etapa de aquecimento mais prolongada e com várias etapas de equilíbrio do sistema enzimático, este maior tempo de simulação durante a etapa de aquecimento pode ter populado estados de energia mais alta para a estrutura da proteína, fazendo com que após certo tempo de simulação o sítio ativo da proteína viesse a desfazer sua estrutura em relação com os dados cristalográficos. Na Figura 5.14 mostramos a variação da distância de átomos de resíduos de aminoácidos que estão direcionados aos metais de Zn^{+2} , por interações eletrostáticas, durante a simulação de DM, através do método de íon não ligado.

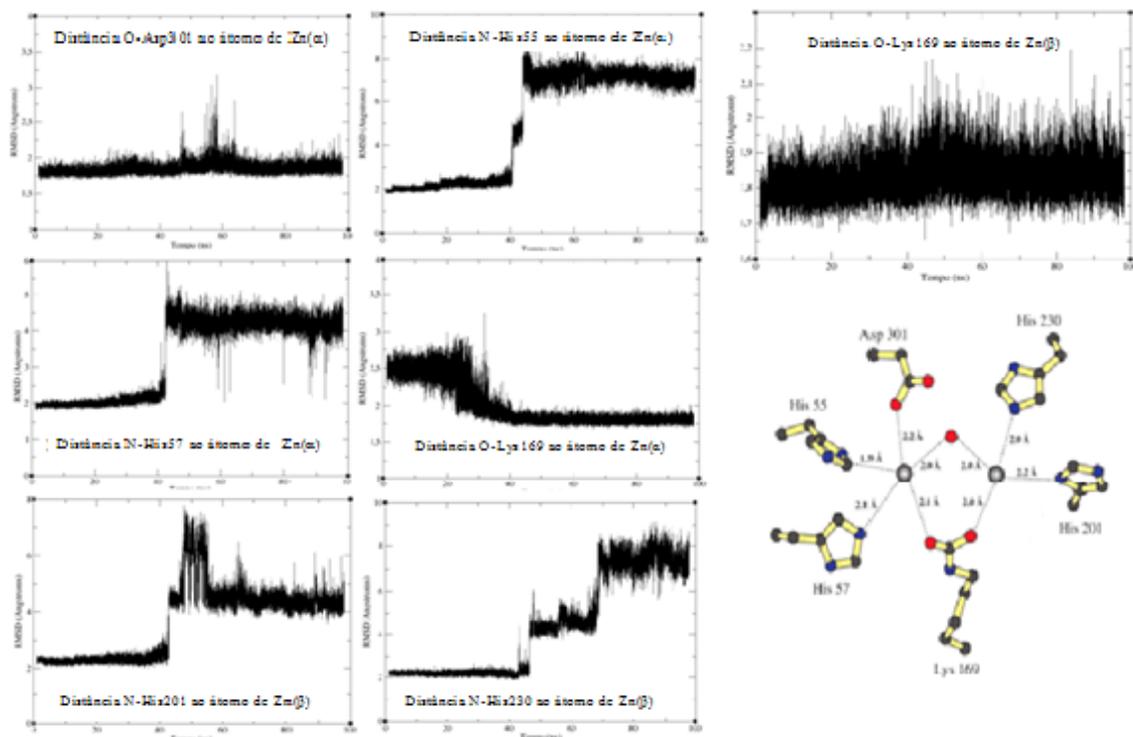


Figura 5.14: Variação de distância dos átomos dos resíduos de aminoácidos da primeira esfera de coordenação direcionados aos metais de Zn^{+2} na enzima nativa de *pdPTE*.

Através da análise dos gráficos da Figura 5.11 podemos constatar que somente a distância do átomo de O do Asp301 ao átomo de Zn_{α} , e a distância do átomo de O da Lys169 ao átomo de Zn_{β} , não sofrem perda da estrutura em relação aos átomos metálicos. No entanto, para o átomo de O do

resíduo de Lys169 em relação ao átomo de Zn_{β} é obtida flutuação significativa nos valores de distância com a simulação de DM. Podemos observar, também, que a perda de direcionamento das interações metal/resíduos de aminoácidos no sítio ativo acontecem praticamente ao mesmo tempo na trajetória de simulação, ou seja, exatamente aos 40 ns de simulação da etapa de produção da DM.

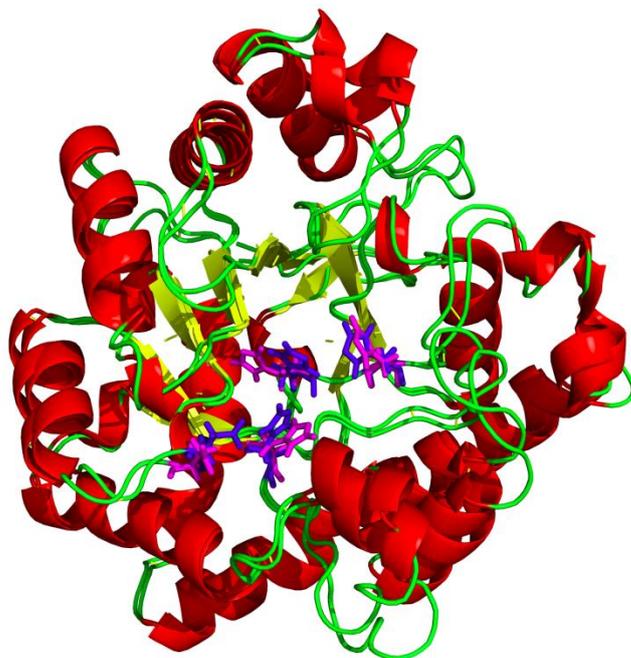


Figura 5.15: Sobreposição da estrutura cristalográfica e o último frame da simulação de DM do sistema nativo de *pdPTE*.

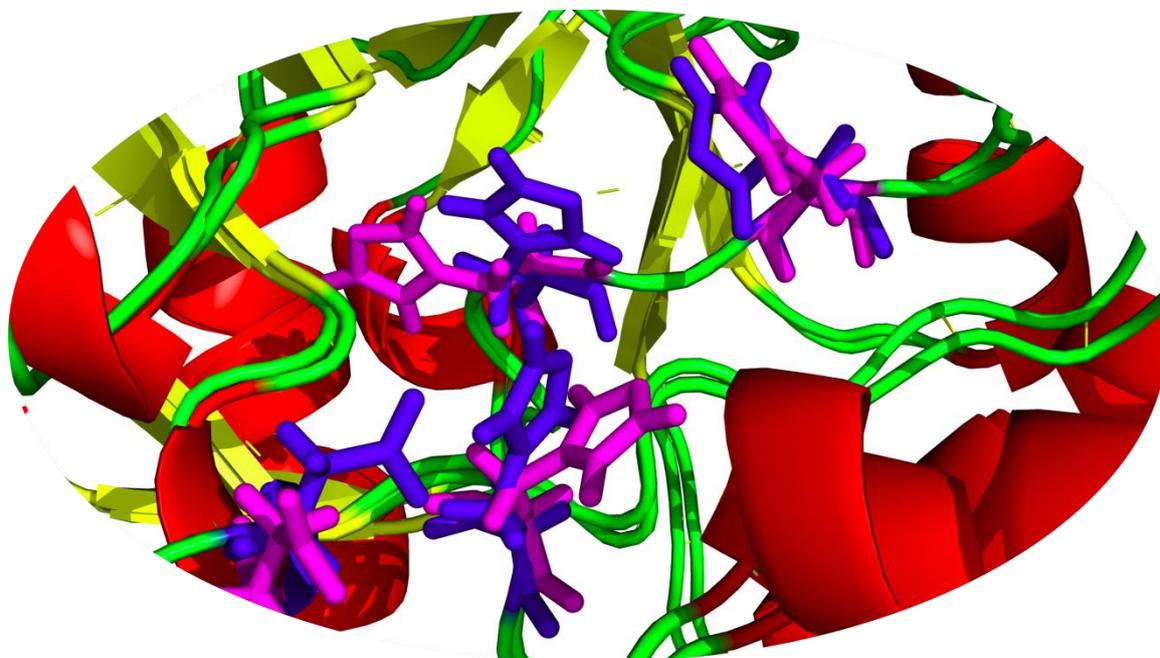


Figura 5.16: Ampliação da região do sítio ativo relacionada à sobreposição entre a estrutura cristalográfica e o último frame da simulação de DM do sistema nativo de *pdPTE*.

Através da sobreposição mostrada na Figura 5.15, e ampliação da região do sítio ativo Figura 5.16, observa-se que a estrutura da proteína apresenta várias modificações em sua estrutura secundária. Isto pode ser verificado através da não sobreposição adequada dos resíduos de cadeia lateral, conforme destacado pela cor verde na sobreposição das estruturas. Verificou-se que esta perda de configuração do sítio ativo esta relacionada com a perda de correlação direta entre os resíduos de aminoácidos Asp233 e His254 da segunda esfera de coordenação na enzima nativa de *pdPTE*. Observa-se que ao longo da dinâmica o resíduo Asp233 sofre uma rotação em direção ao meio solvente e, verifica-se uma mudança na orientação da His254, que repercute e desencadeia as demais modificações nos resíduos de aminoácidos direcionados aos metais no sítio ativo. Discutisse na literatura que os resíduos His254 e Asp233 tenham um possível papel no transporte de prótons para fora do sítio ativo, através de interações via ligações de hidrogênio¹³ com o meio solvente, que pode estar relacionado às mudanças estruturais observadas na dinâmica molecular.

Os nossos resultados da dinâmica molecular da enzima nativa, utilizando o modelo de íon não ligado, usando o extenso protocolo de simulação, revela que o formalismo através utilizando o modelo de íon livre não é adequado para se realizar as simulações de DM para o sistema nativo de *pdPTE*, e conseqüentemente, para avaliar suas modificações estruturais variando-se os metais no sítio ativo e, possivelmente, para a inclusão de estruturas enzima-substrato. Em virtude destes resultados e observações realizou-se o procedimento de parametrização do sítio ativo (modelo ligado) usando o programa MCPB.py, para a realização destas simulações. Os resultados são apresentados na próxima seção de discussão deste capítulo.

III) Parametrização dos Sistemas de *pdPTE* através do Modelo Ligado para: Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II) usando o Programa MCPB.py e Simulações de DM

A parametrização através do uso do modelo de campo de força ligado para descrever os metais de transição no sítio ativo de *pdPTE* foi realizada para investigarmos as possibilidades de mudanças estruturais ao longo das simulações de DM. Associado a estas possibilidades, podemos também, através de simulações com inibidores e substratos destas enzimas obter novas ideias e esclarecimentos sobre a dinâmica de interação enzima-substrato, o papel e interação de resíduos de aminoácidos de cadeia lateral e a influência da solvatação explícita nestas estruturas. Utilizando o processo de parametrização reportado através do formalismo MCPB.py foi realizada, portanto, a obtenção de parâmetros para serem inseridos no campo de força ff14SB do programa AMBER, para a simulação de DM para os seguintes sistemas de *pdPTE*: Zn(II)-Zn(II), Cd(II)-Cd(II) e a forma híbrida contendo os metais Zn(II)-Cd(II) no sítio ativo de *pdPTE*. Nestes sistemas os metais no sítio ativo são descritos através da seguinte denominação geral M_{α} - M_{β} , como mostrado na Figura 5.14, onde temos: M_{α} é o metal menos exposto ao solvente e coordenado em uma esfera de coordenação local trigonal bipiramidal formada por His55, His57, Asp301 e os ligantes em ponte OH⁻ e Lys169. M_{β} já é caracterizado como metal mais exposto ao solvente, e sua esfera de coordenação local pode variar desde tetraédrica a octaédrica dependendo do metal substituído e do tipo de fosfotriesterase

neste sítio de coordenação. No sistema de *pdPTE* predomina-se no sítio M_{β} a coordenação aos grupos His201, His230, e os ligantes em ponte OH^- e Lys169. Completa este sítio de coordenação moléculas de água, descritas através da obtenção de estruturas de raios-X de maior resolução. Assim, na enzima nativa de *pdPTE* temos uma molécula de água no sítio M_{β} , enquanto na enzima substituída por Cd^{+2} e na enzima em sua forma híbrida, Zn(II)-Cd(II) , também duas moléculas de água. Estudos experimentais e teóricos demonstraram para o sistema nativo que no sítio ativo M_{β} temos uma geometria de coordenação local tetraédrica. Por exemplo, cálculos realizados por nós nesta Tese e por outros trabalhos na literatura indicam o deslocamento da molécula de água coordenada no sítio M_{β} no sistema de Zn(II)-Zn(II) de *pdPTE* e sua interação através de fortes ligações de hidrogênio com o ligante em ponte OH^- . Portanto na fase inicial de parametrização para estes sistemas foi utilizado para a construção dos modelos a geometria tetraédrica no sítio M_{β} , para todos os três sistemas de *pdPTE*. Podemos verificar com este procedimento, ao longo da trajetória das simulações de DM, a presença de moléculas de água de forma natural ao redor do sítio M_{β} , e as possíveis mudanças estruturais em relação ao sistema nativo, para o qual esta forma de coordenação local já se apresenta consolidada através de diversos trabalhos. Na Figura 5.17, portanto apresentamos a estrutura geral utilizada na fase inicial de parametrização e obtenção de dados para o campo de força ligado para descrever os metais no sítio ativo de *pdPTE*.

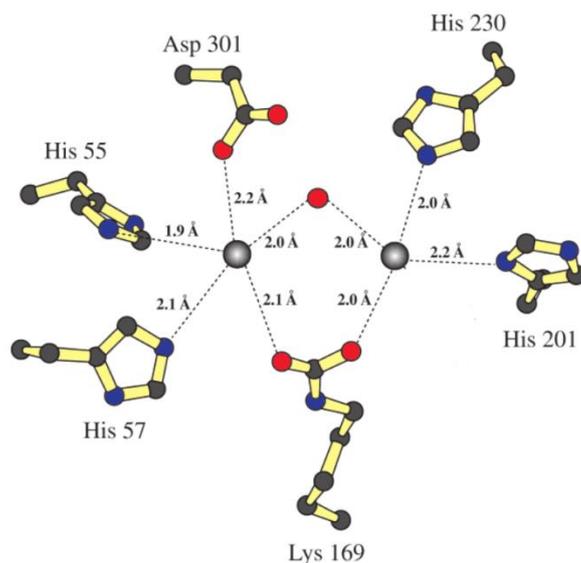


Figura 5.17: Representação do sítio ativo M_{α} - M_{β} modelado na parametrização usando o programa MCPB.py do pacote computacional AMBER.

Na Tabela 5.3 mostramos os valores de constantes de força de ligação química e alguns dos valores relacionados à deformação angular obtidos para o sistema nativo de *pdPTE* utilizando o MCPB.py com a obtenção de dados para a construção dos arquivos de topologia e velocidades iniciais (*.prmtop* e *.inpcrd*), para se iniciar a simulação de DM. O Arquivo biblioteca *.frcmod*, obtido ao final do processo de parametrização com o MCPB.py é apresentado na parte de Apêndice esta tese. Os tipos de átomos relacionados na Tabela 5.3 estão representados na Figura 5.14 para melhor interpretação dos valores com a estrutura do sítio ativo da enzima nativa de *pdPTE* como um exemplo.

Tabela 5.3: Parâmetros calculados de constantes de força e posições de equilíbrio, para descrição através do modelo de campo de força ligado, para os resíduos não padrão de metais de transição Zn^{+2} no sistema nativo de *pdPTE*. Cálculos realizados no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ.

Ligação Química	R_{eq} (Å)	K_r [kcal/(mol. Å ²)]
Asp301-Zn(α)	2,1249	18,8
His55-Zn(α)	2,1603	45,8
His57-Zn(α)	2,1174	57,8
Lys169-Zn(α)	2,2196	4,7
OH332-Zn(α)	1,9982	82,9
His230-Zn(β)	2,1100	59,1
His201-Zn(β)	2,1208	55,7
Lys169-Zn(β)	1,9858	79,7
OH332-Zn(β)	1,9407	116,4
Deformação Angular	θ_{eq} (°)	K_θ [kcal/(mol. rad ²)]
CC-(His201-ND1)-Zn(β)	137,91	47,97
CO-(Lys169-OE1)-Zn(α)	137,98	35,61
CO-(Lys169-OE2)-Zn(β)	121,28	49,60

Através dos dados relacionados na Tabela 5.3, obtidos após o processo de parametrização por cálculos QM, podemos avaliar que os resultados seguem em linha com os critérios de adequação relacionados na parte de metodologia teórica deste capítulo 5. Deste modo, podemos inferir que os parâmetros associados aos íons metálicos apresentam: I) constantes de força de ligação química entre um íon metálico e seus átomos de coordenação dos resíduos de aminoácidos inferiores a 200 kcal/(mol x Angstrom²), e as distâncias de equilíbrio são inferiores a 2,8 Angstrom; II) as constantes de força associadas às deformações dos ângulos com os íons metálicos são geralmente inferiores a 100 kcal/(mol x Rad²) enquanto os valores de equilíbrio dos ângulos são maiores do que 100 graus. Uma observação interessante a ser destacada está relacionada ao baixo valor de constante de força obtida para o átomo de oxigênio (OE1) da Lys169 ligado ao átomo de Zn(α). Trabalhos na literatura descrevem a possibilidade de modificação no número de coordenação do sítio M(α) com a ruptura desta ligação química, com a formação do complexo enzima-substrato, quando este se ligar ao sítio M(β). Esta mudança descrita teria por consequência a modificação da acidez do Asp301 coordenado neste mesmo sítio M(α), e que apresenta, também, através do processo de parametrização uma baixa constante de força associada à ligação química metal/aminoácido. Esta modificação sobre o Asp301 levaria a uma variação em sua carga formal e com isto poderia aumentar sua susceptibilidade a receber um próton durante o processo de liberação do diéster formado após o processo de hidrólise influenciando diretamente na regeneração e restauração do sítio ativo. O processo de obtenção dos parâmetros para os outros sistemas de *pdPTE*, com Cd(II)-Cd(II) e Zn(II)-Cd(II) foi realizado seguindo-se o mesmo protocolo de parametrização.

As modificações estruturais nestes sistemas de *pdPTE* foram iniciadas e avaliadas através da substituição dos metais no sítio ativo enzimático. Foram realizadas para os três sistemas parametrizados de *pdPTE* simulações de DM utilizando o mesmo formalismo computacional descrito para a DM utilizando o método de íon não ligado nas etapas de minimização, aquecimento e produção. Para esta última etapa trajetórias de 800 ns foram obtidas. A Figura 5.18 mostra os gráficos de RMSD em relação aos átomos CA, das três proteínas modeladas, e sobre os resíduos de

aminoácidos da região do sítio ativo de *pdPTE*. Apresenta-se, também, a sobreposição dos gráficos de RMSF entre os três sistemas simulados de *pdPTE*.

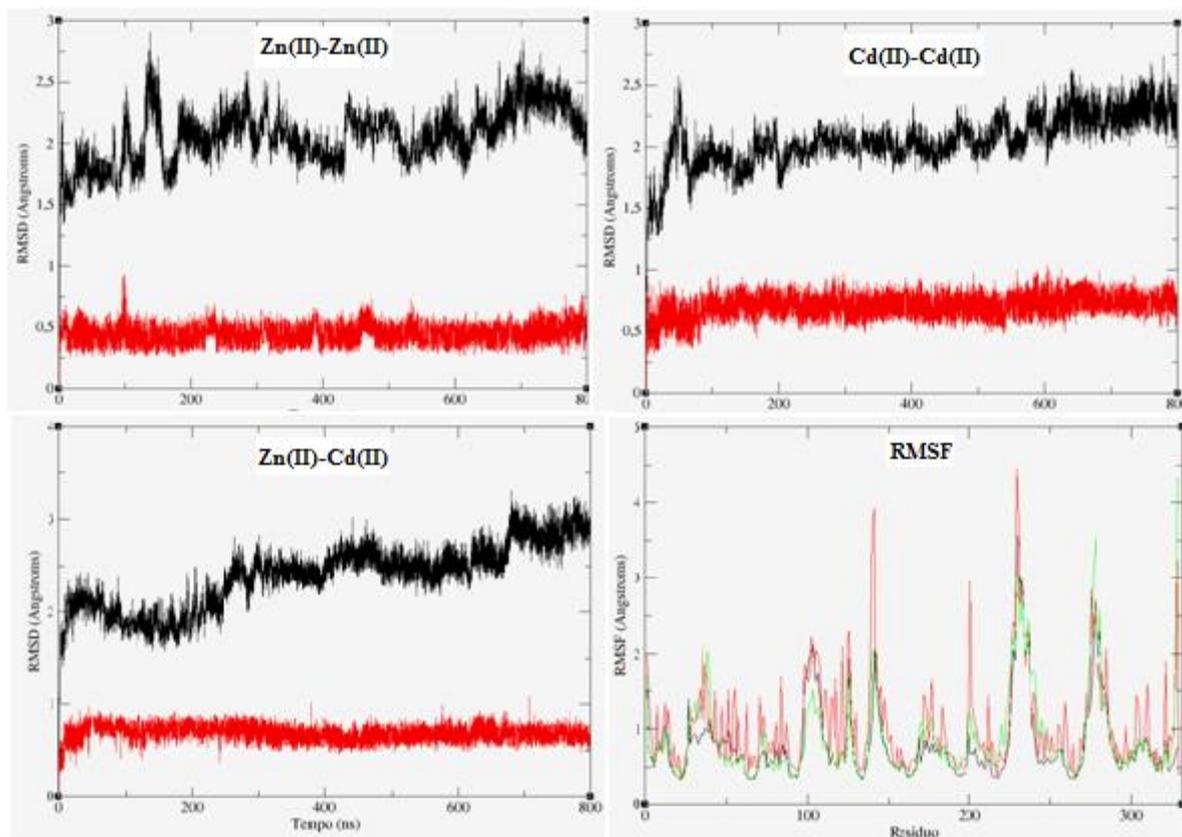


Figura 5.18: RMSD para as DM para os sistemas de *pdPTE*: Zn(II)-Zn(II) (A), Cd(II)-Cd(II) (B) e Zn(II)-Cd(II) (C) usando o modelo ligado para os metais de transição no sítio ativo. (D) Sobreposição dos RMSF por resíduo de aminoácidos do sistema enzimático de Zn(II)-Zn(II) (linha preta), Cd(II)-Cd(II) (linha vermelha) e Zn(II)-Cd(II) (linha verde). Nos gráficos de RMSD a linha preta corresponde à variação do RMSD de toda a enzima, enquanto a linha vermelha sobre o RMSD dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

A análise dos gráficos de RMSD mostrados na Figura 5.18 observa-se que quando se utiliza o modelo ligado de campo de força para tratar os metais, a estrutura do sítio ativo (linha vermelha) é preservada ao longo da simulação. Contudo, o RMSD em relação aos átomos de CA demonstram variação significativa das estruturas obtidas durante a trajetória de DM. No entanto, ao se analisar a variação global por resíduo entre as simulações fica evidenciado que no sistema de Cd(II)-Cd(II) temos uma variação significativa entre vários resíduos de aminoácidos em comparação aos sistemas de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II). Estes resultados podem estar associados a uma parametrização não

adequada do sistema de *pdPTE* substituída somente por cádmio. Conforme mostramos no capítulo 4, através de nossa proposta de mecanismo enzimático para o sistema de *pdPTE* substituída por Cd^{+2} , a geometria local no sítio metálico M_β apresenta uma esfera de coordenação piramidal de base quadrada, e com um sítio de coordenação disponível para o substrato, formando ao final uma coordenação de geometria octaédrica distorcida. Esta diferença na estrutura do sítio ativo e sua parametrização inadequada pode provocar as variações no RMSF dos resíduos de aminoácidos que estão associados e perda de estabilidade da estrutura secundária da proteína. Um processo de parametrização considerando a geometria local com número de coordenação igual a cinco no sítio de M_β foi iniciado considerando-se uma molécula de água ligada ao átomo de Cd^{+2} . Entretanto, este processo de parametrização ainda não foi terminado até o presente momento. Resultados preliminares estão indicando problemas associados à interação dos átomos de hidrogênio da molécula de água coordenada no sítio de Cd_β , e o ligante em ponte OH^- , através de interações 1-4 entre termos não ligados do campo de força. Isto está provocando o aumento da energia eletrostática do sistema durante o processo de minimização de energia e aquecimento do sistema, com a não obtenção de uma estrutura equilibrada para o processo de produção da DM. Protocolos adicionais aplicando-se restrições de força estão sendo utilizados e refinados para resolver este problema. Entretanto, quando analisamos os resultados de RMSF para o sistema nativo e híbrido a variação dos valores dos resíduos de aminoácidos apresenta uma maior estabilidade como mostrado na Figura 5.18. Conforme pode ser observado na Figura 5.18, em relação a sobreposição dos RMSFs mostrada na Figura 5.19, neste dois sistemas não temos mais a variação no RMSF entre os resíduos de aminoácidos de forma geral ao longo de praticamente toda a estrutura da proteína como apresentado no sistema de Cd(II)-Cd(II) . Na escala representada no gráfico de RMSF da Figura 5.19, os resíduos de aminoácidos 21, 23, 135, 167, 196 e 267 são os aminoácidos da primeira esfera de coordenação aos metais no sítio ativo de *pdPTE*, e não apresentam entre os dois sistemas variação significativa. Entretanto, duas regiões de variações mais pronunciadas são verificadas, entre os resíduos 26 a aproximadamente 40 e entre os resíduos 98 e 112. Análises de distâncias

entre átomos específicos nos resíduos de aminoácidos destas regiões estão sendo realizadas para melhor discussão dos resultados.

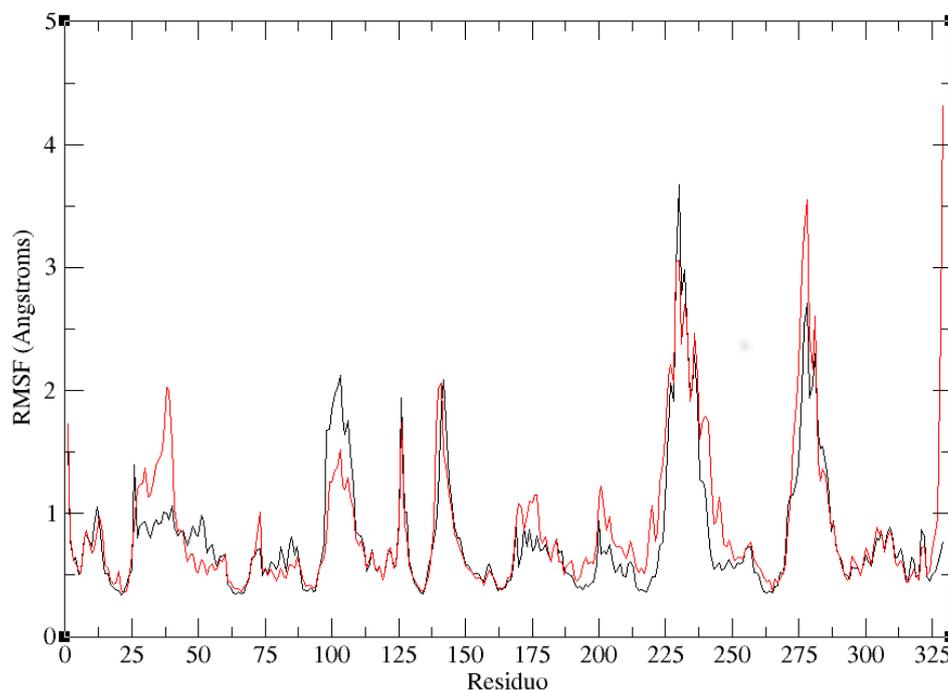


Figura 5.19: Sobreposição dos RMSF por resíduo de aminoácidos do sistema enzimático Zn(II)-Zn(II) (linha preta) e Zn(II)-Cd(II) (linha vermelha) de *pdPTE*.

Análise de componentes principais (PCA) foi realizada obtendo-se os principais movimentos e diferenças entre as flutuações da dinâmica entre estes dois sistemas de *pdPTE*. Através da análise de principais componentes (PCA), podemos relacionar e obter o sub-espço essencial das flutuações locais de movimentos da proteína com o cálculo de um conjunto de autovetores, que descrevem os movimentos correlacionados de átomos ao longo da trajetória de simulação da DM³³. Todos os movimentos são filtrados projetando-se toda a trajetória de DM ao longo da direção descrita por um autovetor selecionado para determinar o movimento dominante na simulação de DM. As projeções de uma trajetória nos autovetores de sua matriz de covariância é chamada de componentes principais. Os dois primeiros componentes principais de movimento são projetados sobre os frames

de DM obtidos e seus valores interpolados obtendo-se os gráficos de PC1 versus PC2 apresentados na figura 5.20 para as simulações de DM nos sistemas de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II) de *pdPTE*. As análises de PCA foram realizadas utilizando-se o programa *cptraj* do pacote computacional AMBER e a projeção dos valores e obtenção dos gráficos foi obtida através de um script criado em *python*. As análises foram realizadas através de frames sobre toda a trajetória de DM de 800 ns de produção.

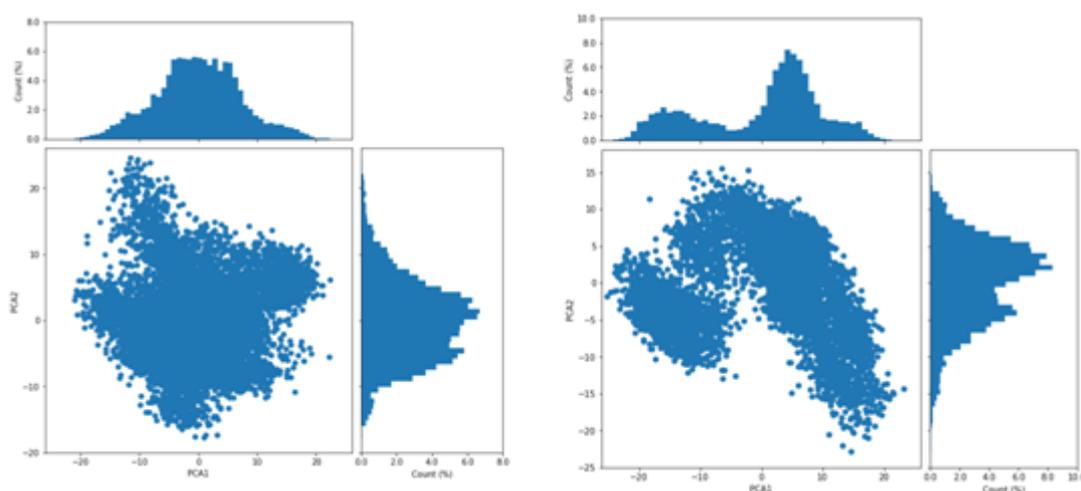


Figura 5.20: Análise de PCA realizada sobre frames da etapa de produção das simulações de DM dos sistemas enzimáticos de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II) de *pdPTE*.

Através dos resultados obtidos em relação aos dois principais componentes de movimentos da enzima durante sua dinâmica podemos observar que a simples substituição de um dos íons metálicos no sítio ativo já produz uma modificação e separação entre os principais movimentos de dinâmica no sistema de *pdPTE*. Enquanto, a simulação do sistema nativo não apresenta uma separação definida entre os movimentos principais, na simulação da enzima híbrida esta relação de separação dos dois movimentos principais já é observada. Estes resultados já indicam que possíveis funções dos íons metálicos associam-se a mudanças estruturais e movimentos internos das proteínas, que afetam a dinâmica local e altera o processo de clusterização, demonstrado através da

separação dos principais movimentos no sistema da enzima híbrida. Estas modificações estruturais por sua vez poderiam induzir às diferentes possibilidades de mecanismos enzimáticos e a promiscuidade encontrada nestas classes de metaloproteínas com cofatores bimetálicos no sítio ativo. Análises mais refinadas por sobreposição de estruturas das diferentes regiões dos gráficos de PCA, de distâncias entre átomos específicos nos resíduos de aminoácidos destas regiões ainda estão em desenvolvimento.

Utilizando-se as estruturas obtidas, após a parametrização com o programa MCPB.py, a modelagem de sistemas para a simulação de DM com o inibidor cristalizado (dietil 4-metilbenzil paraoxon – denominado resíduo EBP) e o melhor substrato de *pdPTE* (dietil 4-nitrofenil paraoxon – denominado resíduo PAR) foram realizadas conforme o protocolo apresentado na parte de metodologia teórica deste capítulo 5. Trajetórias de simulação de DM foram obtidas totalizando-se 800 ns de produção para cada uma das 4 dinâmicas moleculares. Ou seja, para a enzima nativa, Zn(II)-Zn(II), com inibidor e o substrato e para o sistema Cd(II)-Cd(II) com inibidor e substrato. A enzima substituída por Cd(II) foi aqui escolhida em virtude de que estávamos estudando o mecanismo enzimático, através do modelo de cluster para este sistema, conforme trabalho realizado e apresentado no capítulo 4 desta Tese. Alguns resultados das análises entre estas simulações são apresentados a seguir, bem como comparações com os sistemas simulados sem a presença de inibidor e substrato para a enzima nativa e a substituída por Cd(II)-Cd(II). A Figura 5.21 apresenta os gráficos de RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de *pdPTE* e substituída por Cd(II)-Cd(II). Mostra-se, também, a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do inibidor EBP. A linha vermelha nos gráficos de RMSD corresponde à variação nos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Nos gráficos de RMSF a linha preta corresponde à simulação de DM da apoenzima e a linha vermelha a simulação do sistema contendo o inibidor EBP.

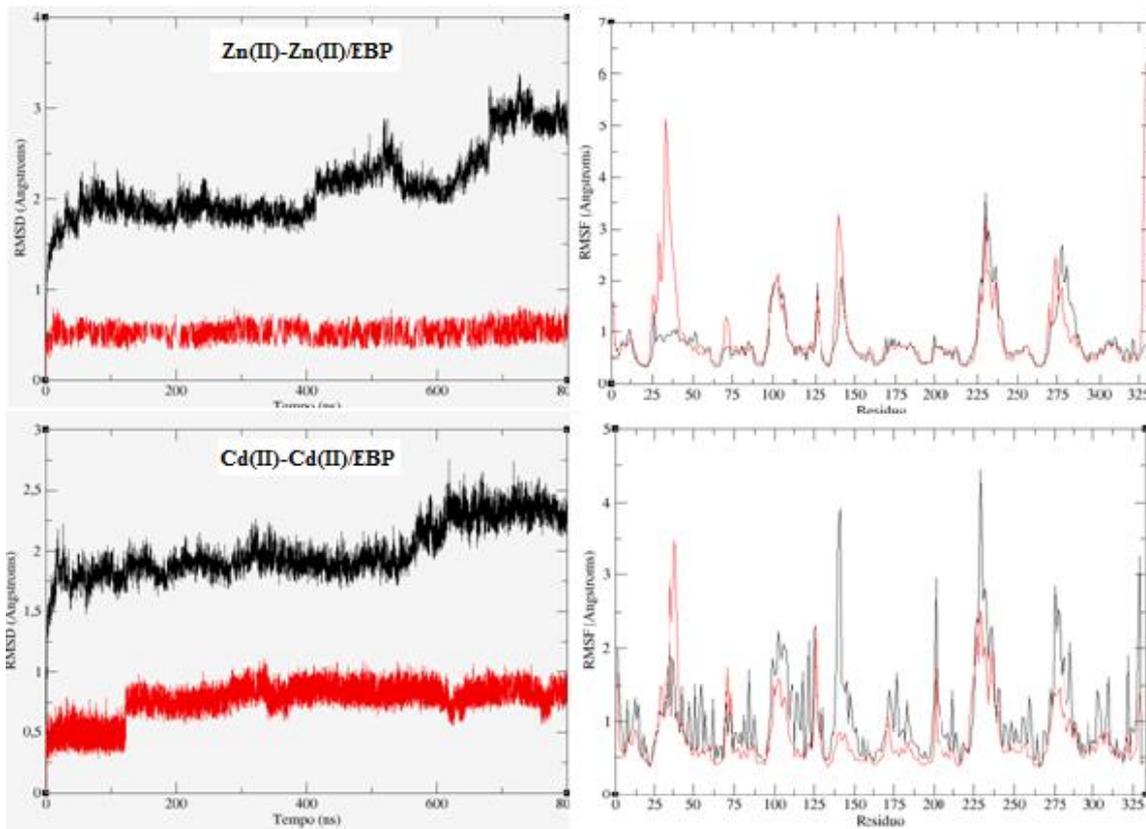


Figura 5.21: RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de *pdPTE* e substituída por Cd(II)-Cd(II) e a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do inibidor EBP.

Através da análise dos gráficos de RMSD pode-se observar que no sistema nativo de *pdPTE*, até aproximadamente 400 ns de simulação durante a etapa de produção o sistema apresenta uma variação aproximadamente constante de 2,0 angstroms. No entanto, a partir deste ponto começa a sofrer oscilação e variação. Contudo, o RMSD em relação aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo apresenta significativa estabilidade e com variação em torno de 0,5 angstroms. O sistema substituído de *pdPTE* por Cd⁺² apresenta uma estabilidade maior em relação aos valores de RMSD, e pode-se observar que próximo de 600 ns de simulação de DM começa a ocorrer variações na estrutura da proteína. Entretanto, podemos observar que em relação ao RMSD dos resíduos do sítio ativo, após cerca de 120 ns de simulação, verifica-se uma modificação e variação no valor de RMSD

associado e estabilização em torno de 0,75 angstroms. Em relação à sobreposição da dinâmica da enzima nativa de *pdPTE*, e desta com a presença do inibidor EBP, podemos verificar uma variação nos valores de RMSF significativa entre os resíduos de aminoácidos de 25 a 48, 70 a 75 e aproximadamente 138 a 148 de forma geral. Estas modificações estão associadas por modificações na posição do inibidor ao longo da simulação e provocadas sobre resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o solvente conforme será descrito a seguir e representado por variações da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do inibidor e o átomo de M_{β} no sítio ativo de *pdPTE*. De forma curiosa, com a presença do inibidor, na DM da enzima substituída por Cd(II)-Cd(II), podemos observar uma menor flutuação no valor de RMSF entre resíduos de aminoácido que apresentaram significativas modificações durante a simulação da apoenzima livre. Ou seja, em relação a enzima de Cd-PTE livre com a presença do inibidor percebe-se uma menor flutuação de dinâmica nos resíduos de aminoácidos. Assim, algum tipo de interação não ligada pode estar estabilizando o sistema. Isto pode ser verificado através da estabilização de resíduos de aminoácidos entre 40 a 67, 112 a 125 e 230 a 250, por exemplo. Variações significativas entre os resíduos 35 a 40 e entre 100 a 115 são, também, observadas em virtudes de mudanças correlacionadas e semelhantes às encontradas no sistema nativo de *pdPTE* com a presença do inibidor. Na Figura 5.22 foi monitorada a variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do inibidor e o átomo de metal M_{β} no sítio ativo de *pdPTE*, para as simulações dos dois sistemas com o inibidor. Assim, mostramos a variação entre estas distâncias durante a simulação de DM. Esta distância de ligação é importante durante os processos de hidrólise enzimática, pois está relacionada com a interação com os metais no sítio ativo com os substratos e, conseqüentemente, com a polarização da ligação P=O e modificação da ordem de ligação entre estes átomos.

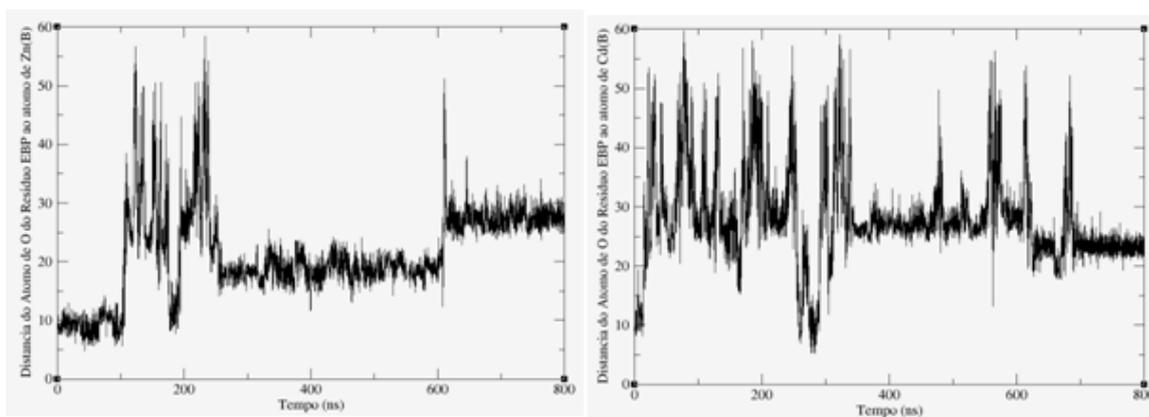


Figura 5.22: Gráficos da variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do inibidor e o átomo de metal posicionado no sítio M_{β} monitorada durante as simulações de DM.

Podemos observar através da análise da variação nesta distância que já no início da etapa de produção da simulação de DM, para as enzimas nativa e substituída por Cd^{+2} , que o átomo de O da ligação P=O do inibidor e o sítio M_{β} de coordenação durante o mecanismo de hidrólise já apresenta uma distância de 10,0 angstroms. Os estudos com simulações menores e que são equivalentes ao tempo de dinâmica molecular realizado por nós (660 ps), já demonstram a variação de posição e modificações estruturais do inibidor em relação a sua localização na enzima de *pdPTE* que foi cristalizado (código PDB 1DPM). Através destas simulações de 800 ns que realizamos fica evidente que o inibidor dietil 4-metilbenzil paraoxon desloca-se da região que foi cristalizado, denominada como um dos bolsões (*pocket*) hidrofóbicos do sítio ativo. Na estrutura dimérica de raios-X da enzima nativa de *pdPTE* 1DPM podemos observar que nas duas subunidades A e B, encontra-se, nesta região hidrofóbica, o inibidor EBP cristalizado. Entretanto, podemos observar também que nas duas subunidades temos moléculas do inibidor cristalizadas realizando interações na superfície externa da proteína, e com o meio solvente. Os nossos resultados indicam a possibilidade do evento de cristalização deste inibidor no sítio ativo ser um artefato do processo de obtenção da estrutura cristalina. Ou seja, o verdadeiro sítio ativo pode nem sempre coincidir com os sítios de ligação de estruturas de estudos de difração de raios-X. Isto abre margem, também, para discussões sobre até que ponto os cálculos computacionais devem ser avaliados como precisos, neste estudos de

sistemas biomoleculares, por obter uma representação fidedigna de estruturas estáticas obtidas durante o processo de cristalização da enzima. No sistema nativo observamos, portanto, que o inibidor EBP estabiliza-se na superfície externa da enzima após 600 ns de simulação. Já no sistema de *pdPTE* substituída por Cd^{+2} este fenômeno começa a ser observado após cerca de 700 ns de DM. A análise de componentes principais (PCA) foi avaliada para os dois sistemas simulados com o inibidor EBP. Na Figura 5.23 são representados os gráficos que correlacionam os dois principais movimentos de dinâmica PC1 e PC2.

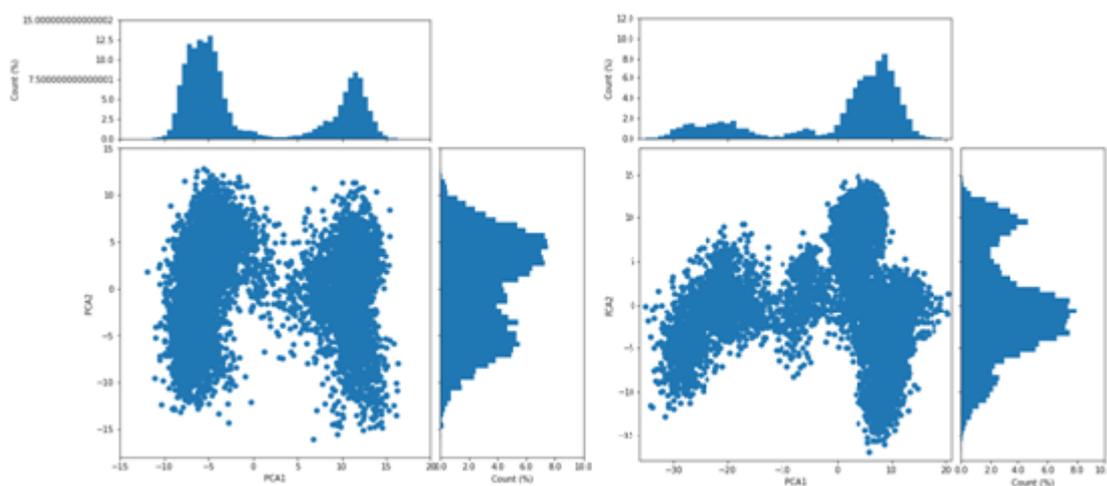


Figura 5.23: Análise de PCA realizada sobre frames da etapa de produção das simulações de DM dos sistemas enzimáticos de Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II) de *pdPTE*, simuladas com a presença do inibidor EBP.

Através da análise PCA podemos observar que diferente do resultado apresentado para o sistema nativo sem a presença do inibidor verifica-se, agora na simulação do sistema nativo com este presente no sítio ativo, que ocorre a separação de dinâmica do sistema em dois movimentos principais. Para o sistema de *pdPTE* substituída por Cd^{+2} ocorre, para a simulação com o inibidor EBP, um processo de clusterização semelhante. Análises mais refinadas por sobreposição de

estruturas das diferentes regiões dos gráficos de PCA, de distâncias entre átomos específicos nos resíduos de aminoácidos destas regiões estão sendo realizadas para melhor discussão.

Simulações de DM foram seguidamente realizadas para os mesmos sistemas da enzima nativa de *pdPTE* e substituída por Cd^{+2} . Na Figura 5.24 apresentamos os gráficos de RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de *pdPTE* e substituída por Cd(II)-Cd(II) simuladas com o substrato dietil 4-nitrofenil paraoxon. Mostra-se, também, a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do substrato PAR. A linha vermelha nos gráficos de RMSD corresponde à variação nos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Nos gráficos de RMSF a linha preta corresponde a simulação de DM da apoenzima e a linha vermelha a simulação do sistema contendo o substrato PAR.

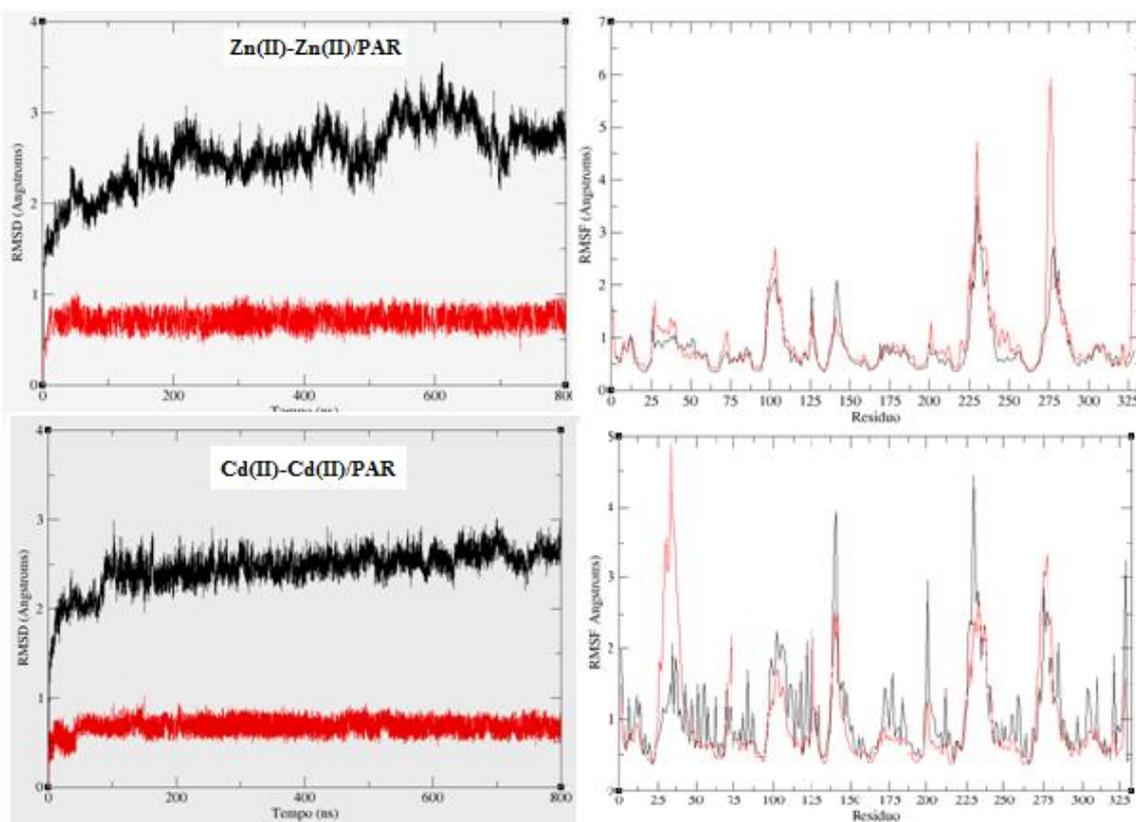


Figura 5.24: Gráficos de RMSD em relação aos átomos de CA dos resíduos de aminoácidos do sistema nativo de *pdPTE* e substituída por Cd(II)-Cd(II) e a respectiva sobreposição dos gráficos de RMSF da apoenzima e da simulação com a presença do substrato PAR.

Através da análise dos gráficos de RMSD podemos observar que a enzima substituída por Cd⁺² apresenta uma maior estabilidade da estrutura secundária durante praticamente toda a simulação, com uma variação aproximadamente constante no RMSD em torno de 2,5 angstroms a partir de 100 ns de DM. Enquanto, para o sistema nativo temos uma maior variação da estrutura secundária em relação à análise feita sobre a flutuação nos valores de CA. A análise do RMSF para o sistema nativo de *pdPTE* já apresenta uma diferença significativa em comparação à simulação deste sistema com o inibidor. Podemos verificar que a variação nos valores de RMSF entre os resíduos de aminoácidos de 25 a 48, 70 a 75 diminui de forma expressiva. Entretanto uma variação é observada entre os resíduos de aminoácidos 275 a 287 aproximadamente, e que está relacionada a movimentos de resíduos posicionados na abertura do sítio ativo. O substrato paraoxon apresenta interação com estes resíduos de aminoácidos ao longo da DM relacionados a movimentos de reorientação no sítio ativo. De forma análoga ao observado na simulação com o inibidor, verifica-se que a estrutura secundária da proteína substituída por Cd⁺², apresenta uma diminuição na flutuação do RMSF entre os resíduos de aminoácidos. Contudo, a variação relacionada entre os resíduos 25 a 50 apresenta ampliação de sua variação e está diretamente envolvida na interação do substrato em momentos da simulação nos quais permanece distante do átomo de metal no sítio M(β). A Figura 5.25 mostra a variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do substrato e o átomo de metal M(β) no sítio ativo de *pdPTE*, para as simulações dos dois sistemas com o substrato dietil 4-nitrofenil paraoxon. Assim, mostramos a variação entre estas distâncias durante a simulação de DM.

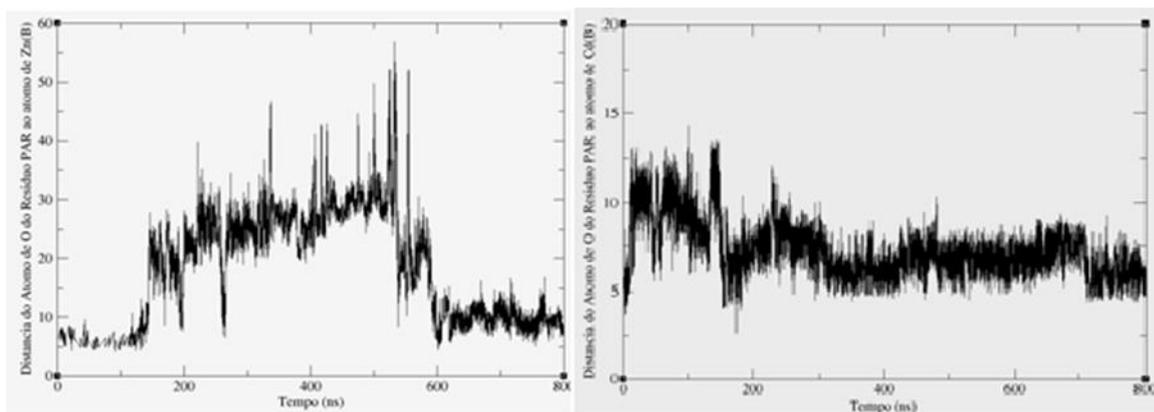


Figura 5.25: Gráficos da variação da distância entre o átomo de oxigênio da ligação P=O do substrato e o átomo de metal posicionado no sítio M(β), monitorada durante as simulações de DM.

Os resultados da variação de distância entre o átomo de oxigênio fosforílico da ligação P=O e o sítio M(β) indicam de forma similar ao observado para o inibidor com a enzima nativa, que o substrato PAR nesta mesma enzima encontra-se (entre aproximadamente 180 ns e 600 ns de simulação) fora de interação com o sítio ativo da enzima. Após os 600 ns de simulação observamos sua reaproximação a distâncias médias em torno de 9,0 angstroms do átomo de Zn(β). Em oposição ao observado, verificamos para a enzima substituída por Cd(II)-Cd(II), que o substrato dietil 4-nitrofenil paraoxon permanece a maior parte do tempo de simulação em regiões nas proximidades do sítio ativo. A aproximação do substrato em relação ao átomo de metal M(β), foi realizada através de cálculos quânticos de SCAN relaxado ao longo desta coordenada de ligação química para ambos os sistemas de *pdPTE*, Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II), e os resultados apresentados no capítulo 4 desta tese. Observamos que enquanto para a enzima nativa a aproximação do substrato ocorre com uma barreira de energia a ser rompida, para o caso da enzima substituída por Cd⁺² a mesma aproximação acontece sem barreira de energia. Isto indica que a interação com a enzima de *pdPTE* substituída por Cd⁺² no sítio ativo é mais favorável. Discutimos, também, através da análise conformacional realizada sobre o sistema de *pdPTE* com Cd⁺², que a orientação e posicionamento do grupo de saída ainda apresenta uma orientação de menor energia. Portanto, a permanência do

substrato dietil 4-metil paraoxon nesta região do sítio ativo durante a realização da DM deve esta relacionada a mudanças estruturais para sua reorientação no sítio ativo. Trabalhos experimentais e teóricos indicam a necessidade de um ângulo de ataque adequado para o nucleófilo e de uma orientação adequada do grupo de saída no sítio ativo de *pdPTE*.

Resalta-se que as estruturas de partida dos substratos foram construídas em relação à estrutura e posicionamento do inibidor cristalizado em um dos bolsões hidrofóbicos do sítio ativo de *pdPTE*. Assim, trabalhos de docking e de redocking para validação da metodologia e obtenção de uma pose com energia e orientação mais adequada do substrato dietil 4-nitrofenil paraoxon estão sendo realizados para realização de novas DM no sistema de *pdPTE*. Cabe enumerar ainda, que os resultados preliminares indicam para ambos os sistemas de *pdPTE*, que a presença do inibidor EBP no sítio ativo mostrou-se não ser favorável. Mostramos que o substrato dietil 4-nitrofenil paraoxon, mesmo permanecendo certo tempo durante as simulações de DM fora do sítio ativo, assume uma trajetória espontânea de redirecionamento, reorientação e entrada no sítio ativo enzimático de *pdPTE* na enzima substituída por Cd^{+2} .

5.4 Considerações Finais

Neste capítulo da tese investigamos através de simulações de dinâmica molecular clássica a modificações estruturais da enzima *pdPTE* ao substituirmos os cofatores metálicos em seu sítio ativo. Esta metaloproteína apresenta o sítio ativo formado por His55, His57, His201, His230, Asp301 e os resíduos de aminoácidos em ponte Lys169 e OH^- , que são coordenados aos íons divalentes de M(II)-M(II) . Moléculas de água completam a geometria de coordenação local no metal localizado sítio $\text{M}(\beta)$, mais exposto ao solvente, de forma diferente em virtude do metal aí substituído. Por exemplo, para o Cd^{+2} observa-se a presença de 2 moléculas de água e uma geometria na estrutura cristalográfica octaédrica. Contudo, através dos estudos com o modelo de cluster, discutidos no capítulo 4, mostramos que a geometria local neste sítio $\text{M}(\beta)$, na enzima disubstituída por Cd^{+2} é piramidal de base quadrada com a dissociação de uma molécula de água.

Estes resultados, associados as estruturas e parâmetros obtidos nesta etapa de modelagem fornecem novas perspectivas para simulações por estudos QM/MM DM, para estas enzimas de *pdPTE* variando-se os metais no sítio ativo e ainda não investigados na literatura. Realizamos variações nos metais obtendo-se os seguintes sistemas enzimáticos estudados: Zn(II)-Zn(II), Zn(II)-Cd(II) e Cd(II)-Cd(II). Através das diversas etapas descritas mostramos como a modelagem destes sistemas para a realização de DM é complexa. Assim, exige-se diversas etapas e conhecimentos de modelagem molecular até se iniciar uma simulação computacional de DM utilizando-se campos de força clássicos de mecânica molecular.

As metodologias utilizadas baseadas nos modelos de campo de força não ligado e ligado, para a descrição dos metais de transição, apresenta vantagens e desvantagens. O modelo ligado não captura bem as modificações do número de coordenação ao redor dos metais durante o processo de simulação, o que pode ser visualizado utilizando-se o modelo não ligado. Contudo, como mostramos, para a descrição de sistemas bimetálicos coordenados por ligantes em ponte, este modelo para o sistema de *pdPTE* não mostrou-se adequado. Entretanto, o modelo ligado apresenta uma perspectiva de modelagem computacional rápida quando comparada com modelos de polarização e compatível com diversos campos de força. Além disso, apresenta a importante característica de reproduzir as geometrias relativamente rígidas de sistemas contendo metais de transição. Mostramos, por exemplo, em todas as simulações através da baixa variação no RMSD nos resíduos de aminoácidos da primeira esfera de coordenação aos metais, cerca de ~ 0,5 angstroms mostrando uma boa estabilidade desta região na enzima durante as simulações de DM.

Os processos de parametrização utilizados, através de curvas de energia potencial obtidas por cálculos de SCAN e o programa automatizado de parametrização semi-automatizado MCPB.py fornecem subsídios teóricos para a modelagem deste sistemas de metaloproteínas. As simulações da apoenzima de *pdPTE*, em relação aos sistemas de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II), mostrou que a simples mudança de um dos metais no sítio ativo, através nas variações dos resultados de RMSF e PCA já foi suficiente para provocar modificações na dinâmica entre as proteínas. Visualizamos

modificações nas estruturas secundárias e distribuição diferentes dos dois primeiros principais movimentos através da distribuição e separação dos movimentos nos componentes PC1 e PC2 na análise PCA.

Outra informação importante relaciona-se nas simulações envolvendo o inibidor EBP e o substrato PAR nos sistemas parametrizados de Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II). Ao partir da posição cristalográfica do inibidor para as simulações constatamos que o inibidor EBP desloca-se do sítio ativo e fica durante a maior parte da simulação de DM interagindo com resíduos de aminoácidos da superfície da enzima e com o meio solvente em ambos os sistemas. Entretanto, para o substrato PAR percebemos uma modificação estrutural e reorientação espontânea do substrato ao mudar sua posição no sítio ativo. A orientação do substrato e posicionamento do grupo de saída são uma das formas de maior gasto de energia nas etapas do processo enzimático de *pdPTE* e mostramos que o tempo para estes eventos acontecerem não é rápido, embora depois o processo de catálise ser muito rápido nestes sistemas de fosfotriesterases.

Os resultados obtidos nas simulações de *pdPTE* indicam que os dados correlacionados na literatura trazem informações que podem não ser adequadas em virtudes das formas de equilíbrio de energia do sistema e o espaço de tempo curto das simulações realizadas. O presente estudo realizado irá trazer, após sua conclusão final, novas informações sobre o processo de hidrólise enzimática associados a estas classes de metaloprotéínas. Esperamos com a obtenção e validação dos parâmetros obtidos, através de comparações e simulações com modelos e cálculos estruturais dos sítios ativos, desenvolver um protocolo computacional para a investigação de sistema correlatos, como as PAPs. Nestas enzimas temos os íons Fe(III)-Zn(II) e variações no sítio M(II), que são em condições ácidas catalisadoras de compostos organofosforados.

5.5 Referências Bibliográficas

- (1) Zhan, C. G.; De Souza, O. N.; Rittenhouse, R.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 7279-7282.
- (2) Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 13278-13283.
- (3) Donarski, W. J.; Dumas, D. P.; Heitmeyer, D. P.; Lewis, V. E.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **1989**, 28, 4650-4655.
- (4) Pang, Y. P. *Proteins: Struc., Func., Genet.*, **2001**, 45, 183-189.
- (5) Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry*, **1996**, 35, 6020-6025.
- (6) Koca, J.; Zhan, C. G.; Rittenhouse, R. C.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 817-826.
- (7) Koca, J.; Zhan, C. G.; Rittenhouse, R. C.; Ornstein, R. L. *J. Comput. Chem.*, **2003**, 24, 368-378.
- (8) Tsai, P. C.; Fan, Y.; Kim, J.; Yang, L.; Almo, S.; Gao, Y. Q.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **2010**, 49, 7988-7997.
- (9) Zhan, D.; Guan, S.; Jin, H.; Han, W.; Wang, S. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2016**, 34, 600-611.
- (10) Oostenbrink, C.; Soares, T.A., van der Vegt, N.F.A., van Gunsteren, W.F. *Eur. Biophys. J. Biophys.*, **2005**, 34, 273-284.
- (11) Maier, J.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.; Simmerling, C. *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11, 3696-3713.
- (12) Chen, S. L.; Fang, W. H.; Himo, F. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 1253-1255.
- (13) Benning, M. M.; Hyunbo Shim, H.; Raushel, F. M.; Holden H. M. *Biochemistry*, **2001**, 40, 2712-2722.
- (14) Kim, J.; Tsai, P. C.; Chen, S. L.; Himo, F.; Almo, S. C.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **2008**, 47, 9497-9504.
- (15) M. A. Chagas, E. S. Pereira, M. P. Godinho J. C. S. Da Silva, W. R. Rocha, *Inorg. Chem.*, **2018**, Aceito.

- (16) Aubert, S. D.; Li, Y.; Raushel, F. M. *Biochemistry*, **2004**, 43, 5707-5715.
- (17) Ferrer, R. S.; Case, D. A.; Walker, R. C. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2013**, 3, 198-210.
- (18) <http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial0/index.htm>. Acessado dia 20/03/2018 às 15:50 hs.
- (19) Kaus, J.; Pierce, L.; Walker, R.; McCammon, J. PMEMD TI: Placeholder. *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**.
- (20) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Research*, **2000**, 28, 235-242.
- (21) Zhang, W.; Hou, T. J.; Qiao, X. B.; Huai, S.; Xu, X. J. *J. Mol. Model.*, **2004**, 10, 112-120.
- (22) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Theor. Chem. Acc.*, **2007**, 117, 171-181.
- (23) Diaz, N.; Suarez, D. *Biochemistry*, **2007**, 46, 8943-8952.
- (24) Ferrer, R. S.; Goetz, A. W.; Poole, D.; Grand, S. L.; Walker, R. C. *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9, 3878-3888.
- (25) Grand, S. L.; Goetz, A. W.; Walker, R. C. *Comp. Phys. Comm.*, **2013**, 184, 374-380.
- (26) Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry*, **1995**, 34, 7973-7978.
- (27) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M., Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5179-5197.
- (28) Marcial, B. L.; Sousa, S. F.; Barbosa, I. L.; Dos Santos, H. F.; Ramos, M. J. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 13644-13654.
- (29) Liu, C.; Zhang, B.; Zhu, Y.; Tang, M. *Struct. Chem.*, **2016**, 27, 1449-1464.
- (30) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 5648-5652.
- (31) Maseras, F.; Morokuma, K. *J. Comp. Chem.*, **1995**, 16, 1170-1179.
- (32) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.*, **1972**, 56, 2257-2261.
- (33) Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.*, **1982**, 77, 3654-3665.

- (34) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9620-9631.
- (35) <http://upjv.q4md-forcefieldtools.org/>. Acessado dia 21/03/2018 às 19:33 hs.
- (36) Pymol. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- (37) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32, 665-667.
- (38) Word, M.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285, 1735-1747.
- (39) Maier, J.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.; Simmerling, C. *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11, 3696–3713.
- (40) Li, P.; Merz, K. M., Jr. *J. Chem. Theory. Comput.*, **2014**, 10, 289-297.
- (41) Price, D.; Brooks, C. *J. Chem. Phys.*, **2004**, 121, 10096–10103.
- (42) Frenkel, D.; Smit, B. *Understanding Molecular Simulaton*, Academic Presse, Elsevier, USA, **2002**.
- (43) Namba, A. M.; Da Silva, V. B.; Da Silva, C. H. T. P. *Ecl. Quím.*, **2008**, 33, 13-24.
- (44) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. Jr. *J. Comp. Chem.*, **1993**, 14, 1347–1363.
- (45) Izaguirre, J.; Catarello, D.; Wozniak, J.; Skeel, R. *J. Chem. Phys.*, **2001**, 114, 2090–2098.
- (46) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089–10092.
- (47) Miyamoto, S.; Kollman, P. *J. Comput. Chem.*, **1992**, 13, 952–962.
- (48) Berendsen, H.; Postma, J.; van Gunsteren, W.; DiNola, A.; Haak, J. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81, 3684–3690.
- (49) Case, D. A. *et. al. AMBER 2016*, University of California, San Francisco, **2016**.
- (50) Roe, D. R.; Cheatham, T. III. *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9, 3084–3095.
- (51) Peters, M.; Yang, Y.; Wang, B.; Fusti-Molnar, L.; Weaver, M.; Merz, K. Jr. *J. Chem. Theor. Comput.*, **2010**, 6, 2935–2947.

- (52) Li, P.; Merz, K. Jr. *J. Chem. Inf. Model.*, **2016**, 56, 599-604.
- (53) Schenk, G.; Elliott, T. W.; Leung, E.; Carrington, L. E.; Mitu, N.; Gahan, L. R.; Guddat, L. W. *BMC Structural Biology*, **2008**, 8, 1-13.
- (54) Camargo, T. P.; Neves, A.; Peralta, R. A.; Chaves, C.; Maia, E. C. P.; Lizarazo-Jaimes, E. H.; Gomes, D. A.; Bortolotto, T.; Norberto, D. R.; Terenzi, H.; Tierney, D. L.; Schenk, G. *Inorg. Chem.*, **2018**, 57, 187-203.
- (55) Gaussian 09, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zhe, G.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr. J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- (56) Ucisik, M. N.; Chakravorty, D. K.; Merz, K. M., Jr. *Biochemistry*, **2013**, 52, 6911-6923.
- (57) Chakravorty, D. K.; Wang, B.; Lee, C. W.; Giedroc, D. P.; Merz, K. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 3367-3376.
- (58) <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial20/mcpbpy.htm>. Acessado dia 22/03/2018 às 07:33 hs.
- (59) Siegbahn, P. E. M.; Himo, F. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2011**, 1, 323-336.

Capítulo 6: Conclusões

Nesta tese executamos o estudo computacional que envolveu a busca e obtenção de novas informações sobre o mecanismo de hidrólise do triéster de fosfato, dietil 4-nitrofenil fosfato, mais conhecido como paraoxon. O trabalho foi realizado em três etapas sendo: i) na primeira parte realizada a investigação da hidrólise não enzimática; ii) na segunda a investigação da catálise enzimática através da ação da fosfotriesterase (PTE) substituída pelos íons Cd^{2+} ; iii) e a última etapa envolveu simulações de dinâmica molecular clássica (DM) com o paraoxon e seu inibidor análogo no sítio ativo de PTE. O estudo destes sistemas foi realizado utilizando combinações de métodos computacionais, tais como: teoria do funcional de densidade (DFT), MP2, ONIOM (QM/MM), SMD, dinâmica molecular clássica (DM) e docking molecular. O uso destas diversas ferramentas computacionais se faz necessário, uma vez que, para se tratar a investigação dos sistemas deste projeto diversas informações são necessárias, que em conjunto, fornecem os dados necessários de forma a obtermos os novos conhecimentos sobre a investigação proposta, que no presente estudo focou-se na hidrólise do triéster de fosfato paraoxon.

Na primeira investigação, portanto, buscamos novos esclarecimentos sobre a hidrólise em solução aquosa para o paraoxon. Os trabalhos teóricos correlacionados baseavam-se principalmente na hidrólise alcalina do paraoxon através do nucleófilo OH^- atacando diretamente o centro reativo de fósforo. A investigação da hidrólise espontânea do paraoxon em solução aquosa envolveu os níveis teóricos de DFT e MP2, usando uma combinação de solvatação local do grupo fosforila do paraoxon com moléculas de água reativas explícitas. Os efeitos de longo alcance do meio solvente foram tratados usando o modelo de solvatação contínuo SMD. A solvatação do átomo de oxigênio fosforílico pelas três moléculas de água reativas tem um papel fundamental na estabilização do intermediário fosforano pentacoordenado. Portanto, a reação ocorre em duas etapas, através de um mecanismo $\text{A}_\text{N} + \text{D}_\text{N}$. Assim, a reação tem energias livres de ativação de 31,8 e 1,9 kcalmol^{-1} para a primeira e segunda etapas, respectivamente. Apresenta uma energia total livre de reação de -9,3

kcalmol⁻¹, e sendo estes valores calculados no nível de teoria MP2/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31+G(d). A reação de hidrólise descrita apresentou uma constante de velocidade global de $3,05 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$. Os resultados energéticos revelam que a reação prossegue muito lentamente em solução aquosa. Isto significa que este pesticida permanecerá por vários como potente contaminante neurotóxico em ambiente aquoso neutro. A reação prossegue com transferência de prótons da molécula de água nucleofílica para o grupo de saída, através das duplas transferências de prótons nos estados de transição TS1 e TS2. Portanto, uma molécula de água atua como nucleófilo e as outras como base geral, gerando o nucleófilo OH⁻ *in situ*. A descrição quântica das moléculas de água reativas são essenciais para descrever os processos de transferência de prótons ao longo da coordenada de reação e também para estabilizar o intermediário pentacoordenado de fósforo. Em uma visão geral o mecanismo associativo/dissociativo obtido neste trabalho mostra que a reação prossegue como se um próton proveniente de uma molécula de água nucleofílica fosse transferido para o grupo de saída mediado pelas moléculas de água do meio através de uma protonação intermediária da ligação P=O do paraoxon. Estas protonações são fundamentais para a estabilização do intermediário de reação, o que não pode ser mostrado nos modelos teóricos usados nos trabalhos de hidrólise alcalina, uma vez que nos modelos usados não se tem a formação de ligações químicas com o átomo de O da ligação P=O de forma a modificar a ordem de ligação entre estes átomos e aumentar a nucleofilicidade do átomo de fósforo.

Na segunda parte desta tese investigamos através de cálculos DFT e ONIOM no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d)/LANL2DZ e incluindo efeitos de dispersão D3 a hidrólise enzimática do paraoxon, usando um modelo de cluster do sítio ativo da fosfotriesterase de *Pseudomonas diminuta* (PTE) substituída pelos íons Cd²⁺/Cd²⁺. De forma semelhante e extrapolando para a catálise enzimática, os resultados mostrados evidenciam que moléculas de água no sítio ativo da fosfotriesterase podem atuar como agentes nucleofílicos na reação de hidrólise do paraoxon para a fosfotriesterase substituída com Cd²⁺. As moléculas de água inicialmente coordenadas no átomo de cádmio β no sítio ativo desempenham papéis cruciais na estabilização dos estados de transição e do

intermediário de reação pentacoordenado de fósforo. A reação enzimática, assistida pela coordenação do paraoxon de forma monodentada ao átomo de Cd_{β} , ocorre também através de um mecanismo de duas etapas ($A_N + D_N$), com barreiras de energia de ativação de 12,9 e 1,9 kcalmol⁻¹ para a primeira e segunda etapas, respectivamente, computadas no nível de teoria B3LYP-D3/6-311++G(2d,2p)/LANL2DZ, em excelente concordância com os dados experimentais. Em nossa proposta para o mecanismo enzimático, portanto, o ligante em ponte no sítio ativo μ -hidroxo age como uma base desprotonando a molécula de água, previamente coordenada ao centro de Cd_{β} , que por sua vez ataca o átomo de fósforo. O papel do íon hidróxido em ponte para atuar como uma base, gerando o nucleófilo OH^- *in situ*, que ataca o substrato, é de fato um aspecto importante das fosfotriesterases substituída por Cd^{2+} . Assim, tanto em solução aquosa quanto na reação enzimática mostramos neste trabalho que a hidrólise de triésteres de fosfato podem seguir um mecanismo $A_N + D_N$ de duas etapas, passando pelo intermediário pentacoordenado. A eficiência da catálise enzimática resulta na diminuição de 18,9 kcalmol⁻¹ para a energia de ativação da reação de hidrólise, mostrando, portanto, a alta eficiência da enzima Cd^{2+}/Cd^{2+} de PTE para a biorremediação de compostos neurotóxicos organofosforados. Portanto, o mecanismo enzimático proposto neste trabalho para a enzima Cd^{2+}/Cd^{2+} de PTE, em conjunto com a concordância encontrada com o valor experimental para a barreira de energia de ativação, faz esta proposta de mecanismo consistente para a hidrólise de triésteres de fosfato promovida pela metaloenzima PTE substituída por Cd^{2+} . Ressalta-se ainda o fato de que, com a polarização da ligação P=O do substrato paraoxon, tanto na reação de hidrólise em solução aquosa, quanto na reação enzimática promovida por Cd-PTE o mecanismo de reação obtida foi $A_N + D_N$, resultando na formação de um intermediário de reação pentacoordenado de fósforo. Também, muito importante, foi termos mostrado a formação do nucleófilo da reação OH^- *in situ* com a participação de moléculas de água nucleofílicas, tanto no trabalho de investigação da reação do paraoxon em solução aquosa, quanto de forma enzimática por PTE substituída por Cd^{2+} . O desenvolvimento desses novos conhecimentos é de extrema importância, pois irá possibilitar avaliar o mecanismo de reação incluindo a dinâmica dos principais

resíduos próximos ao sítio ativo, como também investigar o mecanismo de reação de liberação do produto hidrolisado restaurando o sítio ativo através, por exemplo, de trabalhos QM/MM/MD. Outra possibilidade são as investigações de sistemas miméticos do sítio ativo enzimático da PTE estuda neste trabalho, bem como de outras fosfotriesterases e metaloproteínas de forma geral.

Na terceira parte desta tese investigamos através de simulações de dinâmica molecular clássica a modificações estruturais da enzima *pdPTE* ao substituímos os cofatores metálicos no sítio ativo. As metodologias utilizadas foram simulações de DM baseadas nos modelos de campo de força não ligado e ligado, para a descrição dos metais de transição. As simulações da apoenzima de *pdPTE*, em relação aos sistemas de Zn(II)-Zn(II) e Zn(II)-Cd(II), mostrou que a simples mudança de um dos metais no sítio ativo, através das análises de RMSF e PCA já são suficientes para provocar e mostrar modificações de dinâmica nas proteínas. Realizou-se simulações envolvendo o inibidor EBP e o substrato PAR nos sistemas parametrizados de Zn(II)-Zn(II) e Cd(II)-Cd(II). Através dos resultados constatamos que o inibidor EBP desloca-se do sítio ativo e fica durante a maior parte da simulação de DM interagindo com resíduos de aminoácidos da superfície da enzima e com o meio solvente em ambos os sistemas. Portanto, podemos inferir a possibilidade de cristalização deste inibidor no sítio ativo da PTE nativa ser um artefato do processo de obtenção do cristal da enzima para a análise de raios X. Entretanto, para o substrato PAR percebemos uma modificação estrutural e reorientação do substrato ao mudar sua posição no sítio ativo. A orientação do substrato e posicionamento do grupo de saída são uma das formas de maior gasto de energia nas etapas iniciais do processo enzimático de *pdPTE*. Este trabalho ainda segue em fase de realização de cálculos e análises para apresentação e escrita de novos trabalhos. Uma das tentativas que íremos realizar é adaptar o método de otimização de geometrias dos sítios ativos enzimáticos como uma das etapas iniciais do programa de parametrização MCPB.py. utilizando o formalismo de coordenadas congeladas. Esperamos com isso, obtermos uma melhor descrição do sítio ativo e, conseqüentemente, obtenção de parâmetros mais adequados para serem incorporados aos campos de força de mecânica molecular a serem utilizados em trabalhos de DM, QM/MM e QM/MM MD.

Durante o desenvolvimento desta tese tive a oportunidade de desenvolver, um pouco mais, meus conhecimentos relacionados à Química Teórica Computacional. Utilizando metodologias de simulação molecular, e estudos de mecanismos de reações químicas enzimáticas adquiri habilidades de como construir a estrutura de sistemas químicos enzimáticos para cálculos de Mecânica Quântica, Dinâmica Molecular Clássica, scan relaxado e rígido, Docking Molecular, Parametrização de Potenciais para campos de força e otimização de geometrias usando restrições sobre coordenadas congeladas. Como parte importante destaco o aprendizado iniciado sobre processos de parametrização para campos de força clássicos para sistemas contendo íons de metais de transição. Este conhecimento é peça chave nos cálculos de simulação por DM quando se pretende realizar trabalhos envolvendo o modelo ligado. Tais recursos possibilitam aplicar ferramentas sofisticadas a nível teórico-molecular, para obter e interpretar propriedades estruturais, eletrônicas, energéticas de sistemas biológicos.

Aos leitores interessados nesta área de pesquisa, posso destacar que, este trabalho trás ainda um espécie de exemplos de protocolos computacionais a serem utilizados nos estudos de sistemas enzimáticos, através das diversas formas de abordagem e metodologias usadas durante a realização desta tese de doutorado. Posso ainda, enfatizar que, o estudo da atividade catalítica de metaloenzimas é uma área de pesquisa extremamente empolgante e desafiadora, características essas fundamentais e essenciais para motivar um trabalho científico.

Capítulo 7: Apêndice

Apêndice A: Artigos Publicados e em Preparação Durante o Doutorado (2014-2018)

1. **Chagas, M. A.**; Pereira, E. S.; Godinho, M. P. B.; Da Silva, J. C. S.; Rocha, W. R. A Base Mechanism to the Hydrolysis of Phosphate Triester Promoted by the Cd²⁺/Cd²⁺ Active site of Phosphotriesterase: A Computational Study. *Inorg. Chem.*, **2018**. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b00361.

2. **Marcelo A. Chagas^a**, **Eufrásia S. Pereira^a**, **Júlio Cosme S. Da Silva^{a,b}** and **Willian R. Rocha**, *Investigation of the Neutral Hydrolysis of Diethyl 4-Nitrophenyl Phosphate (Paraoxon) in Aqueous Solution*. Aceito para publicação no *Journal of Molecular Modeling*, **2018**.

3. **Chagas, Marcelo A.**, Willian R. Rocha, Adolfo H. Moraes, Structural Dynamics and Allostery of ZIKV NS5 Methyltransferase Domain. Em fase de término para submissão no *Chemical biology*, **2018**.

4. **Eufrásia S. Pereira^a**, **Chagas, Marcelo A.^a** Willian R. Rocha^a, *Theoretical investigation of the reduction potential ruthenium(III/II) complexes with potential antitumor activity and their interactions with biological targets, (Em revisão para resubmissão, 2018)*.

5. DOS SANTOS, HÉLIO F.; **CHAGAS, MARCELO A.**; DE SOUZA, LEONARDO A.; ROCHA, WILLIAN R. ; DE ALMEIDA, MAURO V. ; ANCONI, CLEBER P. A. ; DE ALMEIDA, WAGNER B. Water Solvent Effect on Theoretical Evaluation of ¹H NMR Chemical Shifts: *o*-Methyl-Inositol Isomer. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A*, v. 121, p. 2839-2846, **2017**.

6. **CHAGAS, MARCELO A.**; ROCHA, WILLIAN R. . Solvent effects on the metal-to-ligand charge transfer transition of the complex [Ru(NH₃)₅(Pyrazine)]²⁺. *Chemical Physics Letters* (Print), v. 612, p. 78-83, **2014**.

Apêndice B: Participação e Apresentação de Trabalhos em Congressos.

1. XIX Simpósio Brasileiro de Química Teórica, **2017**. Cd²⁺/Cd²⁺ Metal-Substituted Phosphotriesterase: Theoretical Analysis of the New Enzymatic Mechanisms of the Paraoxon Phosphate Triester Hydrolysis.

2. I Workshop em Simulação Computacional I-WSC, **2016**. Dinâmica Molecular Clássica de Fosfotriesterases e Fosfatases Ácidas Púrpuras: Metaloenzimas Envolvidas na Hidrólise de Triésteres de Fosfato.

3. VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, **2016**.

4. VI Simpósio de Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular, **2016**.

5. XVIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, **2015**. Metaloenzimas Envolvidas na Hidrólise de Compostos Organofosforados: Uma abordagem teórica via modelos de sítios ativos para Zn(II)-Zn(II), Cd(II)-Cd(II) e Zn(II)-Cd(II) de *Pseudomonas diminuta* (pdPTE).

6. 10th Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists, **2014**. Solvent effects on the metal-to-ligand charge transfer transition of the complex $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{Pyrazine})]^{2+}$.

7. Fórum Internacional Mulheres em Ciências e Engenharias, **2014**.

Apêndice C: Formação Complementar

2016 - 2016

Dinâmica Molecular Básica. (Carga horária: 6h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2016 - 2016

Descrevendo Reatividade Química através da QTAIM e Outras Ferramentas Modernas. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil.

2016 - 2016

Cálculos Híbridos QM/MM. (Carga horária: 3h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

2016 - 2016

Dinâmica de Reações Químicas: Teoria do Estado de Transição (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil.

Apêndice D: Participação em Concursos/Aprovação

I) Aprovado e 3^o classificado, no concurso para professor de educação superior da UEMG-MG, Edital No 08, de 28 de novembro de 2014, para as Disciplinas de Química, pela Comissão Examinadora, aos cinco dias do mês de fevereiro de **2017**.

II) Aprovado e 2^o classificado, no concurso para professor substituto da UFMG-MG campus Pampulha, Edital N^o 337, de 28 de Abril de 2015, para as Disciplinas de Físico-Química e Química-Geral, pela Comissão Examinadora, aos oito dias do mês de Abril de **2015**.

III) Aprovado e 4^o classificado, no concurso para professor substituto do CEFET-MG campus I, Edital N^o 209, de 16 de Dezembro de 2014, para as Disciplinas de Físico-Química e Química-Geral, pela Comissão Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de janeiro de **2015**.

Apêndice E: Atuação Profissional

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), UFMG, Brasil.

Vínculo Institucional

2015 - 2016

Enquadramento Funcional: Professor Substituto de Química Geral e Físico-Química.

Outras informações: Disciplinas Ministradas: 1) Elementos de Físico-Química (QUI623); 2) Físico-Química I (QUI602); 3) Físico-Química II (QUI604); 4) Físico-Química Experimental CI (QUI267); 5) Físico-Química Experimental CII (QUI268); 6) Físico-Química (GII); 7) Química Geral Experimental (QUI019); 8) Química Geral (QUI616).