



**PPGQB**

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**WILLIAM DANIEL ALVES BEZERRA DA SILVA**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E ELETRÔNICAS DA  
FORMA PARTICULADA DA ENZIMA METANO MONOOXIGENASE  
(pMMO)**

MACEIÓ-AL

2021

WILLIAM DANIEL ALVES BEZERRA DA SILVA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E ELETRÔNICAS DA  
FORMA PARTICULADA DA ENZIMA METANO MONOOXIGENASE  
(pMMO)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Área de concentração:** Catálise Molecular e de Superfície.

**Orientador:** Prof. Dr. Júlio Cosme Santos da Silva.

MACEIÓ-AL

2021

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB4/1459

S586e Silva, William Daniel Alves Bezerra da.  
Estudo das propriedades estruturais e eletrônicas da forma particulada da enzima metano monooxigenase (PMMO) / William Daniel Alves Bezerra da Silva. – 2021.  
94 f. : il.

Orientador: Júlio Cosme Santos da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 70-79.  
Apêndices: f. 80-94.

1. pMMO. 2. DFT. 3. Dinâmica molecular. 4. EPR. I. Título.

CDU: 547:66.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



---

BR 104 Km14, Campus A. C. Simões

Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins

57072-970, Maceió-AL, Brasil

Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.ufal@gmail.com

### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **William Daniel Alves Bezerra da Silva** intitulada: “**Estudo das Propriedades Estruturais e Eletrônicas da Forma Particulada da Enzima Metano Monooxigenase (pMMO)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 26 de julho de 2021, às 9h, por meio de videoconferência pelo *Google Meet*.

#### Comissão Examinadora:

Dr. FREDERICO JOSÉ DE SANTANA PONTES, UFPE

Examinador Externo à Instituição

Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR, UFAL

Examinador Interno

Dr. JULIO COSME SANTOS DA SILVA, UFAL

Orientador - Presidente

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe e minha avó, por serem pessoas maravilhosas por quem eu tenho um amor imenso, e por acreditarem em mim e me apoiarem durante todo esse tempo, desde a graduação até aqui e sempre me apoiarem.

Ao meu orientador, Júlio Cosme, por ser uma pessoa incrível, além de meu orientador, um amigo que me ajudou durante esse tempo e acreditou que eu teria potencial para realizar este trabalho.

Ao meu esposo e companheiro de vida Adler Cesar, por me apoiar em todas as decisões, acreditar que eu conseguiria e sempre ser suporte em minha vida, mesmo quando eu deixei de acreditar em mim.

À minha orientadora da graduação professora Roberta Dias, pois, sem ela acho que nem teria iniciado o mestrado.

Aos professores Frederico e Edeildo, pelas contribuições que me deram durante a qualificação e por terem aceitado compor a banca de defesa deste trabalho.

Às minhas amigas, Lucelma e Anny, sou grato pela amizade e por deixarem a vida mais leve e sempre ser apoio desde a graduação.

Aos meninos do Laboratório de Química Computacional e Modelagem de Biomoléculas (LQCBio), principalmente o Artur, agradeço pela convivência, pelas dicas e por deixarem o dia leve (nos dias que tiveram aulas presenciais).

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho - CENAPAD-SP e ao Laboratório de Estudos Computacionais em Sistemas Moleculares da UFMG (eCsMoLab) por fornecer parte dos recursos computacionais usados na realização de parte dos cálculos realizados nesse trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para o Laboratório de Química Computacional e Modelagem de Biomoléculas (LQCBio).

Á capes, pelo apoio financeiro, pois sem a bolsa de mestrado esse trabalho não seria possível.

## RESUMO

A forma particulada da enzima metano monooxigenase (pMMO) é a forma mais abundante encontrada em organismos metanotróficos (organismos que usam metano como fonte de energia), além da forma particulada, essa enzima pode ser encontrada também na forma solúvel (sMMO, menos abundante). Esses organismos são responsáveis pela conversão de metano a metanol, em condições ambientes. A pMMO mesmo sendo a forma mais abundante desta classe de enzimas, ainda existe discussões acerca do seu sítio catalítico, como por exemplo, se há ou não água em sua primeira esfera de coordenação (tendo em vista que o sítio catalítico tem grande exposição ao solvente). A pMMO apresenta uma característica semelhante a outra classe de enzimas chamada de *Lytic Polysaccharide Monooxygenases* (LPMO) (a LPMO atua na quebra oxidativa de ligações C-H em polissacarídeos promovendo a degradação destes biopolímeros), ambas apresentam um resíduo histidina coordenado via modo “braço de histidina”. Devido a essa semelhança estrutural entre os sítios ativos dessas enzimas, bem como os respectivos mecanismos de ação (oxidação de alcanos e açúcares), tem fornecido base para a hipótese de que o sítio catalítico da pMMO possa ser na verdade, um centro mononuclear de cobre coordenado por três histidinas e não um centro binuclear de cobre, como se pensava anteriormente. Neste trabalho, foi investigado ao nível molecular as propriedades estruturais e eletrônicas do sítio mononuclear de cobre principal candidato à sítio catalítico da enzima pMMO. A combinação dos resultados de dinâmica molecular e de cálculos dos parâmetros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) realizados utilizando a teoria do funcional da densidade, juntamente com comparações com dados experimentais de RPE, levou a proposição de que o sítio catalítico da pMMO seja um complexo mononuclear de cobre coordenado pelos resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup> no eixo equatorial, e por duas moléculas de água no eixo axial, sendo uma dessas moléculas de água mais lábil o que pode sugerir uma coordenação mais frouxa ao íon cobre fazendo com o que ao longo do tempo, sob presença de meio solvente, o sítio da pMMO alterne entre uma estrutura octaédrica distorcida e uma estrutura piramidal de base quadrada com coordenação 5. Um estudo com três funcionais de troca-correlação revelou que o funcional BHANDHLYP apresentou o melhor desempenho para os cálculos dos parâmetros de RPE.

**Palavras-chave:** pMMO, DFT, Dinâmica Molecular, EPR.

## ABSTRACT

The particulate form of the enzyme methane monooxygenase (pMMO) is the most abundant form found in methanotrophic organisms (organisms that use methane as an energy source), in addition to the particulate form, this enzyme can also be found in soluble form (sMMO, less abundant). These organisms are responsible for converting methane to methanol under ambient conditions. PMMO even though it is the most abundant form of this class of enzymes, there are still discussions about its catalytic site, such as whether or not there is water in its first coordination sphere (considering that the catalytic site has great exposure to the solvent). The pMMO has a characteristic similar to another class of enzymes called *Lytic Polysaccharide Monooxygenases* (LPMO) (LPMO acts on the oxidative breakdown of C-H bonds in polysaccharides promoting the degradation of these biopolymers), both have a coordinated histidine residue via "histidine brace" mode. Due to this structural similarity between the active sites of these enzymes, as well as the respective mechanisms of action (oxidation of alkanes and sugars), it has provided a basis for the hypothesis that the catalytic site of pMMO may actually be a mononuclear copper center coordinated by three histidines and not a binuclear copper center, as previously thought. In this work, was investigated at molecular level the structural and electronic properties of the copper mononuclear site of the enzyme pMMO. The combination of molecular dynamics results and calculations of electronic paramagnetic resonance (EPR) parameters performed using the density functional theory, and comparisons with experimental EPR data, led to the proposition that the pMMO catalytic site is a mononuclear copper complex coordinated by the residues His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup>, and His<sup>139</sup> on the equatorial axis and by two water molecules on the axial axis, with one of these water molecules being more labile which may suggest looser coordination to the copper ion, which over time, under the presence of the solvent medium, the pMMO site alternates between a distorted octahedral structure and a pyramid structure with a square base with coordination 5. A study with three exchange-correlation functionals revealed that the BHANDHLYP functional presented the best performance for calculating EPR parameters.

**Keywords:** pMMO, DFT, molecular dynamics, EPR.

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Energia livre de Gibbs de uma reação, em função da coordenada de reação catalisada e não catalisada por enzima.	15
<b>Figura 2 -</b>	Representação do trímero da pMMO. (a) Vista paralela ao eixo normal a membrana (visão lateral). (b) Vista perpendicular ao eixo normal da membrana (visão de cima). Os protômeros estão mostrados em vermelho, amarelo e azul.	19
<b>Figura 3 -</b>	Possíveis centros metálicos da pMMO. (a) Complexo mononuclear de cobre. (b) complexo dinuclear de cobre. (c) Complexo mononuclear de zinco.	20
<b>Figura 4 -</b>	(a) Sítio ativo da enzima LPMO (Código PDB:4EIR). (b) Sítio binuclear da enzima pMMO (Código PDB:1YEW).	22
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura do sítio ativo mononuclear de cobre revelado da estrutura cristalográfica 3RGB.	23
<b>Figura 6 -</b>	Representação do modelo <i>dummy</i> para o $Zn^{2+}$ em hexacoordenação. Em cinza, está a representação do pseudo-metal Zn e em roxo a representação dos átomos <i>dummy</i> .	29
<b>Figura 7 -</b>	Representação dos termos de Mecânica Molecular para as interações ligadas entre os átomos.	34
<b>Tabela 1 -</b>	Alguns movimentos de proteínas e suas escalas de tempo.	37
<b>Figura 8 -</b>	Etapas de construção do modelo químico.	38
<b>Figura 9 -</b>	Representação do modelo <i>dummy</i> para o íon $Cu^{2+}$ .	41
<b>Tabela 2 -</b>	Parâmetros do íon $Cu^{2+}$ usado neste trabalho.	41
<b>Gráfico 1 -</b>	Número de publicações relacionadas a pMMO nos últimos 10 anos.	43
<b>Figura 10 -</b>	RMSD dos átomos do backbone da pMMO calculados em relação a estrutura cristalográfica da pMMO.	44
<b>Figura 11 -</b>	Variação da distância $d(OE2-Cu^{2+})$ do Glu <sup>35</sup> ao longo dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns.	46



<b>Figura 12 -</b>	Número de molécula de água dentro de uma esfera de raio 5 Å em relação ao íon Cu <sup>2+</sup> . Valores dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns.	47
<b>Figura 13 -</b>	Função de distribuição radial Cu <sup>2+</sup> ---H <sub>2</sub> O calculada considerando os últimos 50 ns da simulação de 500 ns.	48
<b>Figura 14 -</b>	Ampliação dos dois primeiros de picos de solvatação da função de distribuição radial Cu <sup>2+</sup> ---H <sub>2</sub> O, os quais foram integrados para determinar o número de água diretamente coordenadas ao cobre. Em destaque é mostrado uma estrutura que mostra duas moléculas de água coordenadas ao cobre.	49
<b>Figura 15 -</b>	Número de clusters encontrados em relação ao RMSD selecionado.	51
<b>Figura 16 -</b>	Tamanho de cada cluster para o RMSD de 0.04 nm.	52
<b>Figura 17 -</b>	Representação das estruturas médias geradas da análise de cluster. Em lilás a estrutura obtida da média das 38 estruturas geradas da análise de cluster.	53
<b>Figura 18 -</b>	Doze estruturas médias geradas da análise de cluster feita com os últimos 50 ns de simulação da simulação de 500 ns.	54
<b>Figura 19 -</b>	Geometria otimizada ao nível B97-D3/SVP do modelo contendo os resíduos de His <sup>33</sup> , His <sup>137</sup> , His <sup>139</sup> , Gly <sup>34</sup> e Glu <sup>35</sup> , e as moléculas de água contidas numa esfera de raio de 5Å em relação ao íon cobre.	56
<b>Tabela 3 -</b>	Valores de g para íons de metaloproteínas/metaloenzimas.	58
<b>Figura 20 -</b>	Valores calculados para o g <sub>z</sub> considerando o funcional B3LYP e o erro relativo associado a cada frame.	60
<b>Figura 21 -</b>	Valores calculados para o g <sub>z</sub> considerando o funcional revPBE e o erro relativo associado a cada frame.	61
<b>Figura 22 -</b>	Valores calculados para o g <sub>z</sub> considerando o funcional BHANDHLYP e o erro relativo associado a cada frame.	61
<b>Figura 23 -</b>	Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino (A <sub>z</sub> ) para o funcional B3LYP e o erro associado a cada frame.	64
<b>Figura 24 -</b>	Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino (A <sub>z</sub> ) para o funcional revPBE e o erro associado a cada frame.	64

**Figura 25 -** Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino ( $A_z$ ) para o funcional BHANDLYP e o erro associado a cada frame. 65

## LISTAS DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de Adenosina

DFT – *Density Functional Theory*

DM – Dinâmica Molecular

ENDOR - *Electron Nuclear Double Resonance*

EPR - *Electron Paramagnetic Resonance*

GGA – *Generalized Gradient Approximation*

IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

kDA - *Kilodalton*

LDA – *Local Density Approximation*

LPMO - *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*

MM – Mecânica Molecular

MMO – Metano Monooxygenase

MQ/QM – Mecânica Quântica

OPLS-AA - *Optimized Potential for Liquid Simulations All-atoms*

PDB – *Protein Data Bank*

pMMO – Metano Monooxygenase Particulada

RDF – *Radial Distribution Function*

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica

sMMO - Metano Monooxygenase Solúvel

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 CATÁLISE POR ENZIMAS.....	14
1.2 ENZIMA pMMO: UMA REVISÃO .....	17
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>26</b>
3.1 QUÍMICA COMPUTACIONAL E O ESTUDO DE SISTEMA ENZIMÁTICOS.....	26
3.2 MODELAGEM COMPUTACIONAL CLÁSSICA DE METALOENZIMAS.....	28
3.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS .....	29
3.3.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT).....	30
3.3.2 Mecânica Molecular (MM) .....	33
3.3.3 Dinâmica Molecular (DM).....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL .....	38
4.1.1 Construção do Modelo .....	38
4.1.2 Protocolo Computacional da Simulação de Dinâmica Molecular .....	39
4.1.3 Parâmetros para o Cu <sup>2+</sup> do Sítio Ativo.....	40
4.1.4 Análises Estruturais da Simulação de Dinâmica Molecular e Cálculo dos Parâmetros de EPR.....	41
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
5.1 ANÁLISES ESTRUTURAIS .....	44
5.2 ANÁLISE DE CLUSTER A PARTIR DOS ÚLTIMOS 50 ns.....	50
5.3 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE RPE PARA O SÍTIO MONONUCLEAR DE COBRE DA pMMO. ....	57
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE A – INPUT EQUILIBRAÇÃO NPT .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE B – INPUT PARA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE C – ETAPA DE PRODUÇÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE D – SIMULAÇÃO CURTA COM ÁTOMOS DA PROTEÍNA FIXOS ..</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE E – INPUT DE RPE .....</b>	<b>87</b>

<b>APÊNDICE F – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL B3LYP.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE G – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL REVPBE.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE H – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL BHANDHLYP .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE I - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM CONGRESSO.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE J- CARGA HORÁRIA DAS DISCIPLINAS CUMPRIDAS E ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO (ATIVIDADES EXTRAS E ATIVIDADES DO PROGRAMA): .....</b>	<b>94</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CATÁLISE POR ENZIMAS

A origem da palavra enzima (como entendido atualmente, como catalisador biológico), tem um processo histórico um pouco longo, isso porque nos anos 1800 (século XIX) ainda se tinha uma discussão sobre se havia uma “força vital” associadas às reações ocorridas nos organismos vivos (PUNEKAR, 2018). Quando Payen e Persoz usaram o termo “diastase” em 1833, para descrever a atividade hidrolítica do amido, o termo foi utilizado para descrever um catalisador de origem biológica, e em 1903 quando Victor Henri escreveu um livro sobre catálise enzimática, usou o termo “diastase” para classificar uma enzima. Outros cientistas franceses também usaram o termo para definir as enzimas, o sufixo -ase que é usado ainda hoje para classificações de enzimas foi recomendado por Duclaux em 1898 (PUNEKAR, 2018).

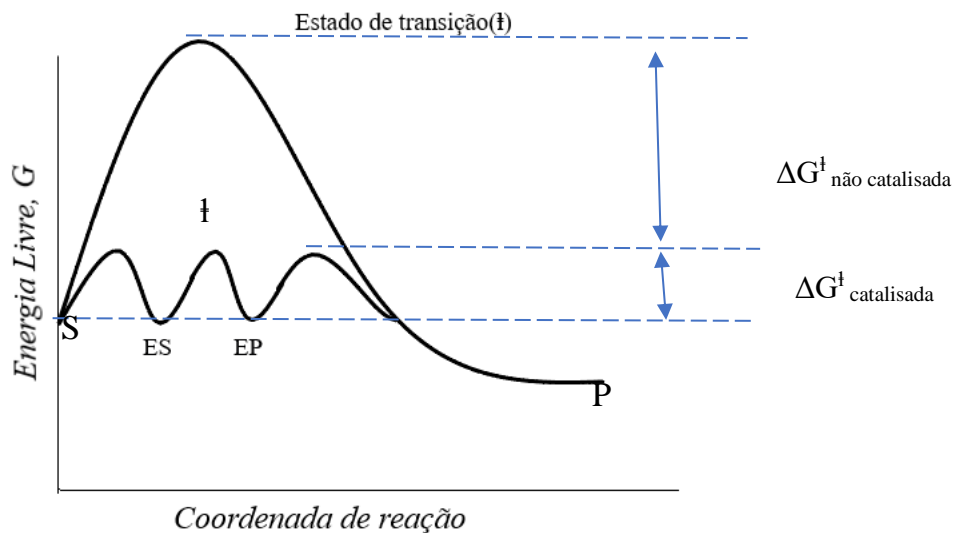
Além do termo diastase, o termo fermento também foi utilizado para descrever as enzimas, até o fim do século XX, só após o trabalho de Buchner em 1897, que demonstrou que leveduras poderiam converter sacarose em álcool (sem o “fermento vivo”), Frederick W. Kühne deu o nome de enzimas para as moléculas que foram detectadas por Buchner (LEHNINGER; COX, 2014; PUNEKAR, 2018). O termo enzima, como conhecemos hoje, é definido pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (1981), que diz que uma enzima é uma proteína que atua como catalisador.

Para seu funcionamento, algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos, já outras necessitam de um componente químico adicional que é chamado de co-fator, pode ser um ou mais íons inorgânicos (Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, V ou Mo), ou ainda, alguma uma molécula orgânica ou metalorgânica, conhecida como coenzima (LEHNINGER; COX, 2014; OSÓRIO, 2007).

O papel fundamental de uma enzima é acelerar o processo reacional, ou seja, atuar como catalisador. Neste caso, a reação química ocorre numa região específica da estrutura da proteína denominado sítio ativo, e a molécula que se liga a esse sítio ativo é denominada de substrato (**S**). O sítio ativo é composto por um determinado número de resíduos de aminoácidos que interagem especificamente com o substrato, e quando este se liga ao sítio ativo ocorre a formação de um complexo enzima-substrato (**ES**) a partir do qual a reação prossegue até a etapa final onde a enzima é regenerada e o produto (**P**) é formado (COOPER; HAUSMAN, 2007; LEHNINGER; COX, 2014).

É possível avaliar uma reação enzimática analisando a variação da energia livre de Gibbs em função de uma dada coordenada de reação, o que gera o chamado perfil energético da reação como o apresentado na figura 1. A enzima atua gerando um caminho de reação alternativo que leva a formação do produto da reação passando por barreiras de ativação consideravelmente menores do que o que ocorre na rota não catalisada. O papel da enzima é acelerar a conversão do substrato *S* no produto *P* sem modificar o equilíbrio do processo (LEHNINGER; COX, 2014).

**Figura 1.** Variação da energia livre de Gibbs de uma reação, em função da coordenada de reação catalisada e não catalisada por enzima.



Fonte: Autores (2020).

Catalisadores de um modo geral são moléculas que atuam sobre um dado processo reacional proporcionando uma rota alternativa para a conversão de reagente em produtos, que apresenta uma menor barreira de ativação em comparação a reação que ocorre sem a presença de um catalisador (ILLANES, 2008).

Reações bioquímicas, ou seja, reações que ocorrem em células vivas, precisam ser catalisadas para que o funcionamento biológico dos seres vivos continue seu funcionamento normal, os catalisadores dessas reações em organismos vivos são as enzimas (ILLANES, 2008; SØRUP, P. (IPTS), TILS, C. (IPTS), WOLF, 1998).

As enzimas são classificadas em seis famílias de acordo com IUBMB (1981), que são: Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases (ILLANES, 2008). Basicamente, o nome já traz uma ideia de que tipo de reação essas enzimas catalisam.

As oxirredutases fazem transferência de elétrons (reações de oxirredução), as transferases são responsáveis pela transferência de grupos; as hidrolases fazem reações de hidrólise (transferem grupos funcionais para a água); as liases são responsáveis pela quebra das ligações C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompem ligações duplas ou anéis ou adicionam grupos a ligações duplas; as isomerases são responsáveis pela transferência de grupos dentro de uma mesma moléculas para produzir formas isoméricas e por fim; as ligases são responsáveis pela formação das ligações C-C, C-O, C-S e C-N, por reações de condensação acopladas a hidrólise de Trifosfato de Adenosina (ATP) (LEHNINGER; COX, 2014).

Sem a ação de uma enzima, reações biológicas (reações de digestão, enviar sinais nervosos, contração muscular, dentre outras), não ocorreriam na velocidade adequada, então as enzimas preparam um ambiente adequado para que as reações possam ocorrer de maneira mais eficiente (LEHNINGER; COX, 2014).

A catálise enzimática encontra-se dentro de uma área maior, a biocatálise. Em biocatálise, os catalisadores enzimáticos (enzimas) são chamados de biocatalisadores. Existem várias vantagens em usar biocatalisadores. A área de biocatálise tem ocupado um lugar de destaque na química moderna, principalmente no desenvolvimento de produtos químicos de forma mais ecologicamente correta, sustentável e mais barata quando comparada com outras tecnologias químicas (ADAMS et al., 2019). Os biocatalisadores podem usar condições amenas em várias reações químicas, encurtar rotas sintéticas, gerar menos subprodutos e resíduos, evitam o uso de reagentes tóxicos, tem melhores quimio, regio e estereosseletividade, dentre outras vantagens (ADAMS et al., 2019; SUN et al., 2018).

Um bom exemplo de catálise quimio-enzimática é mostrado no trabalho publicado por Abdelraheem; *et al.* (2019), em que os autores relatam um processo quimio-enzimático proposto pela Dupont para produção do ácido glicólico. O método proposto é mais simples, e com rotas de reação que levam a condições de reação menos severas e a obtenção de produtos com maior grau de pureza. Nessa reação, formaldeído e cianeto na presença de hidróxido de sódio, reagem para produzir gliconitrila com alta pureza e rendimento, e em seguida é catalisada por uma nitrilase (produzida pela *Escherichia coli*) em glicolato de amônio, em seguida, o ácido é liberado do sal de amônio por cromatografia de troca iônica. O processo, no geral, produz mais de 1 kg de ácido glicólico por grama de célula, sem a necessidade de destilar ou cristalizar. Neste sentido e com esse exemplo prático, percebe-se que a biocatálise é um campo de pesquisa importante para lidar com problemas práticos enfrentados pela sociedade moderna, principalmente em relação a questões ambientais e energéticas.



De qualquer forma, um ponto central é tentar entender qual a origem da extraordinária eficiência catalítica de um sistema enzimático. As enzimas catalisam reações de modo extremamente rápido e com um alto grau de seletividade. De maneira geral, uma enzima catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Desta forma, reações paralelas que levam a formação de produtos secundários, que geralmente ocorrem em reações não catalisadas, dificilmente acontecem quando a reação principal é conduzida na presença de uma enzima.

As enzimas são moléculas que apresentam um elevado número de átomos em sua estrutura molecular. A maioria das enzimas são constituídas de mais de 100 aminoácidos, o que lhes dá uma massa molecular geralmente maior do que 10 kDA e um diâmetro de mais de 25Å (LEHNINGER; COX, 2014). No entanto, apesar do grande número de átomos presentes na estrutura molecular de uma enzima, a atividade, e principalmente, a seletividade, apresentadas por essas espécies na catálise de diferentes reações químicas estão diretamente relacionadas com a interação do substrato com uma pequena parte de sua complicada estrutura molecular, que é conhecida como sítio ativo (DA SILVA, 2013). Tem sido postulado que a forma do sítio ativo é perfeitamente adaptada para orientar a ligação de um substrato numa configuração ótima para que a reação aconteça (KOKKINIDIS; GLYKOS; FADOULOGLOU, 2012; ZINOVJEV; TUÑÓN, 2018). Com isso, para um entendimento detalhado sobre a eficiência catalítica é fundamental tentar compreender quais são os eventos cruciais que ocorrem durante a interação do substrato com a região do sítio ativo da enzima, o que exige dentre outras coisas, um conhecimento detalhado sobre a estrutura e natureza química dos grupos que formam o sítio ativo.

## 1.2 ENZIMA pMMO: UMA REVISÃO

A enzima que representa o tema central deste trabalho, é uma enzima da família das Metano *Monooxigenases* (MMOs), cujas enzimas atuam na oxidação do metano convertendo-o a metanol em condições ambientes. Enzimas da classe das Metano Monooxigenases são enzimas encontradas em organismos metanotróficos (que utilizam metano como sua única fonte de energia). Nesses organismos são encontrados dois tipos de monooxigenases: uma na forma totalmente solúvel (sMMO), e outra na forma particulada presa a uma membrana (pMMO). Dentre essas formas, a forma particulada é a mais abundante na natureza (ROSS, *et al.*, 2019; ROSS; ROSENZWEIG, 2016, HANSON; HANSON, 1996). Essas duas enzimas diferem na natureza e estrutura química de seus sítios ativos. A forma solúvel (sMMO) por exemplo,

possui um centro dinuclear de ferro, já com relação a forma particulada, estudos recentes indicam a possibilidade de ser um sítio mononuclear de cobre ao invés de um sítio dinuclear como se pensava anteriormente (Da SILVA; *et. al.*, 2016; ROSS; *et al.*, 2019).

O metano ambiental tem atraído atenção como um matéria-prima porque existe como um componente principal do gás natural, gás de xisto<sup>1</sup> e biogás. Desta forma, está presente no nosso planeta em abundância. Apesar da alta estabilidade e baixa reatividade da ligação C-H no metano, os metanotróficos podem ativá-la por meio da enzima monooxigenase e utilizar o metano como única fonte de carbono e energia (ISHIKAWA; *et al.*, 2018). Portanto, metanotróficos há muito tempo são considerados cepas promissoras para oxidar biologicamente o metano e convertê-lo em valiosos produtos (ISHIKAWA; *et al.*, 2018).

Este subtópico será escrito em formato de linha de tempo, tentando mostrar de uma forma mais geral, os principais trabalhos que foram publicados desde 2005 até os dias atuais sobre a estrutura e composição química do sítio ativo da pMMO, assim como possíveis mecanismos de reação propostos. Inicialmente, é mostrado o quão relevante é o tema dentro da perspectiva de trabalhos publicados ao longo dos últimos dez anos (2011-2020), e em seguida, são descritos os principais trabalhos que foram propostos nos últimos cinco anos (2015-2020).

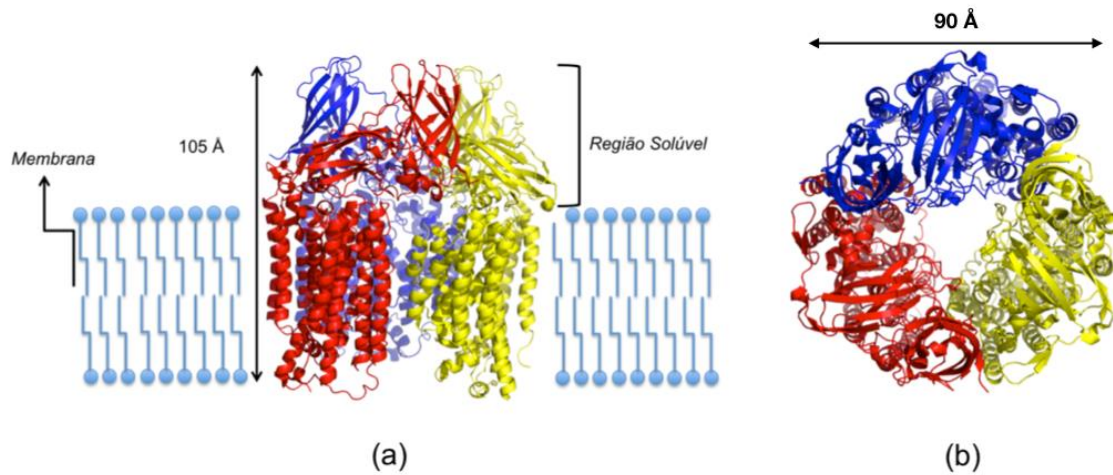
A primeira estrutura cristalográfica da pMMO foi determinada em 2005, em uma resolução de 2,8 Å, por Liberman e Rosenzweig. Os resultados desse estudo revelaram que a pMMO tem uma estrutura trimérica em que cada protômero<sup>2</sup> é formado por três subunidades denominadas pmoA ( $\alpha$ , ~ 47 kDa), pmoB ( $\beta$ , ~24 kDa) e pmoC ( $\gamma$ , ~22 kDa). A composição estrutural de cada uma dessas três subunidades forma um trímero cilíndrico  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  com aproximadamente 105 Å de comprimento e ~ 90 Å de diâmetro (ver figuras 2a e 2b).

---

<sup>1</sup> O gás de xisto é um gás que é encontrado em sedimentos de rochas (chamados de xisto) e pode ser extraído por fraturamento hidráulico de alto volume e perfuração horizontal de precisão (HOWARTH, 2014).

<sup>2</sup> Algumas proteínas são compostas por uma única cadeia polipeptídica, outras tem mais de uma cadeia polipeptídica e são chamadas de proteínas multi subunidades. Neste caso, essas proteínas multi subunidades podem ser idênticas ou diferentes, se pelo menos duas forem idênticas a proteína é chamada de oligomérica e as unidades idênticas (uma ou mais cadeias polipeptídicas) estas são chamadas de protômeros, cada uma designada por uma letra grega ( $\alpha$  e  $\beta$ , por exemplo) (LEHNINGER; COX, 2014).

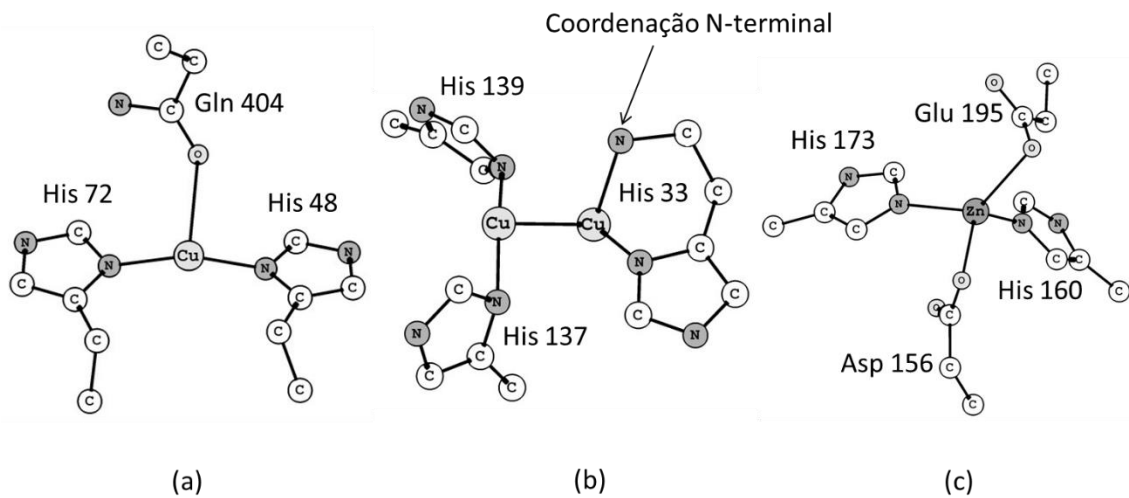
**Figura 2:** Representação do trîmero da pMMO. (a) Vista paralela ao eixo normal a membrana (visão lateral). (b) Vista perpendicular ao eixo normal da membrana (visão de cima). Os protômeros estão mostrados em vermelho, amarelo e azul.



Fonte: Autores (2020).

A região da pMMO que se encontra presa a membrana é formada pelo conjunto de alfa hélices mostradas na figura 2(a). Já a região localizada acima dessas alfas hélices representa a parte solúvel. Três diferentes centros metálicos foram sugeridos a partir dessa estrutura cristalográfica. Um centro mononuclear de cobre localizado no domínio solúvel da subunidade  $\beta$  (pmoB). Este centro metálico tem sua primeira esfera de coordenação formada pelos resíduos His<sup>48</sup>, His<sup>72</sup> e Gln<sup>404</sup> (figura 3(a)). O segundo centro metálico, também presente na parte solúvel da pMMO, foi originalmente modelado como um complexo binuclear de cobre contendo na primeira esfera de coordenação os resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup>, onde o resíduo His<sup>33</sup> está coordenado de modo bidentado através de um dos nitrogênios do grupo imidazol e via o nitrogênio N-terminal de sua cadeia lateral (Figura 3(b)). Este tipo de coordenação não convencional da histidina tem recebido o nome de “braço de histidina” (também chamada de braçadeira de histidina). O terceiro centro metálico, localizado na subunidade pmoC, foi modelado como um complexo mononuclear de zinco contendo os resíduos Asp<sup>156</sup>, His<sup>160</sup>, His<sup>172</sup> e Glu<sup>195</sup> como ligantes (Figura 3(c)) (LIEBERMAN; ROSENZWEIG, 2005).

**Figura 3:** Possíveis centros metálicos da pMMO. (a) Complexo mononuclear de cobre. (b) complexo binuclear de cobre. (c) Complexo mononuclear de zinco.



Fonte: Autores (2020).

Existe ainda a possibilidade de que algumas moléculas de água possam estar presentes em regiões próximas dos centros metálicos, principalmente dos localizados na parte solúvel, inclusive compondo a primeira esfera de coordenação (ROSS et al., 2019). No entanto, em 2,8 Å de resolução não é possível determinar de forma suficientemente precisa quais são os principais resíduos e/ou moléculas de solvente próximas ao sítio ativo, os quais podem exercer um papel importante no processo catalítico global (LIEBERMAN; ROSENZWEIG, 2005; ROSS et al., 2019).

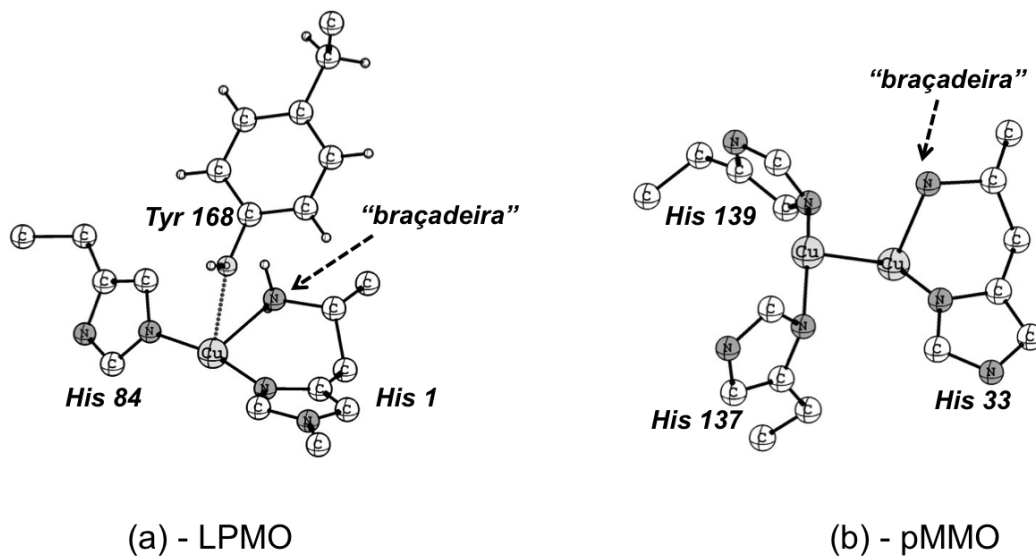
Alguns anos à frente, em um artigo publicado por Balasubramaniam; *et al.* (2010), os autores mostraram que a pMMO era uma enzima dependente de cobre (metaloenzima) e não ferro (como acontece na forma solúvel sMMO), e que o sítio ativo estava localizado na subunidade B (pmoB), sendo também um sítio binuclear de cobre (como proposto por Lieberman e Rosenzweig (2005). Esse estudo trouxe mais bases para fundamentar as propostas originais de Lieberman e Rosenzweig, que apontavam o centro binuclear de cobre como principal candidato para sítio catalítico da pMMO, a estrutura utilizada neste trabalho foi a mesma estrutura cristalográfica obtida por Lieberman e Rosenzweig (2005), com 2,8 Å de resolução. Agora, o próximo passo seria propor um mecanismo razoável que explicasse a conversão do metano a metanol e quais seriam os estados de oxidação do cobre.

Em um estudo publicado por Da Silva; *et al.* (2016), os autores realizaram um estudo computacional utilizando métodos da Teoria do Funcional de Densidade (DFT – do inglês,

*Density Functional Theory*) considerando um modelo binuclear de cobre como o sítio ativo da pMMO, e propuseram um mecanismo de reação para a oxidação do metano. Basicamente, os autores propuseram que a formação de uma espécie bis( $\mu$ -oxo) Cu (III)<sub>2</sub> seria energeticamente mais favorável para a oxidação que uma espécie ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -peroxo) Cu (II)<sub>2</sub>, via mecanismo concertado com formação de radical, sendo a energia de ativação de 18,6 kcal mol<sup>-1</sup>. Os resultados desse estudo se juntaram a outros obtidos com diferentes modelos de sítio catalítico e metodologias computacionais, e mostrou que o mecanismo via formação de radical também seria uma alternativa (SHIOTA; JUHÁSZ; YOSHIZAWA, 2013; SHIOTA; YOSHIZAWA, 2009; YOSHIZAWA; SHIOTA, 2006). Porém, todos esses estudos citados apresentam como principal limitação a ausência de uma estrutura cristalográfica de boa resolução, o que acarreta em dúvidas sobre a real composição do sítio ativo da enzima pMMO. Com uma resolução de 2,8 Å não é possível obter detalhes sobre a estrutura química do sítio catalítico, o que é fundamental para se entender o mecanismo de ação da enzima.

Outro ponto importante sobre a natureza química do sítio catalítico da pMMO surgiu a partir de estudos recentes envolvendo uma nova classe de enzimas monooxigenases de cobre, denominada LPMO (LPMO - *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*) (LO LEGGIO; et al., 2015; QUINLAN; et al., 2011; VAAJE-KOLSTAD; et al., 2010). Os resultados desses estudos trouxeram à tona questionamentos sobre a real estrutura química do centro catalítico da pMMO. A LPMO atua na quebra oxidativa de ligações C-H em polissacarídeos promovendo a degradação destes biopolímeros, incluindo a celulose. Ao contrário da situação envolvendo a pMMO, vários estudos cristalográficos têm sido feitos para a elucidação estrutural da LPMO. A estrutura da LPMO determinada em 1,5 Å de resolução revelou que seu sítio ativo é formado por um complexo mononuclear de cobre cuja primeira esfera de coordenação é composta por uma histidina coordenada através do nitrogênio do anel imidazol e por um resíduo histidina coordenado via modo “braçadeira”, similar ao modelado para o centro binuclear de cobre da pMMO (LO LEGGIO et al., 2015) (ver figura 4).

**Figura 4:** (a) Sítio ativo da enzima LPMO (Código PDB:4EIR). (b) Sítio binuclear da enzima pMMO (Código PDB:1YEW).



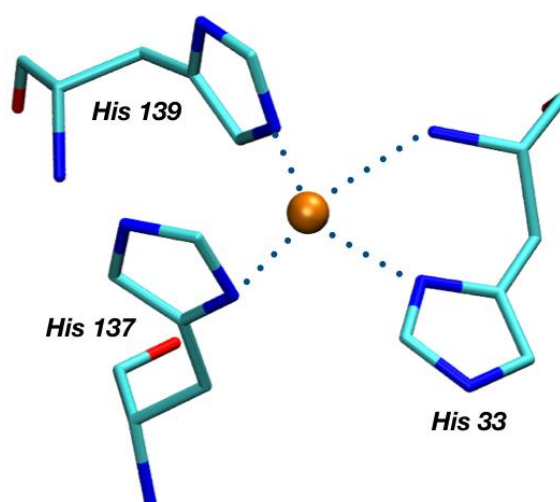
Fonte: Autores (2020).

De todas as enzimas contendo cobre até então identificadas, apenas a LPMO e a pMMO apresentam um resíduo de histidina coordenado via modo braçadeira. Essa semelhança estrutural única entre os sítios ativos dessas enzimas, assim como os respectivos mecanismos de ação (oxidação de alcanos e açúcares), tem dado base para a hipótese de que o sítio catalítico da pMMO possa ser na verdade, um centro mononuclear de cobre coordenado por três histidinas (KJAERGAARD et al., 2014; LEE; KARLIN, 2015). Vale destacar que, assim como na pMMO, a coordenação do tipo braçadeira de histidina é uma característica conservada em todas as enzimas LPMO até então caracterizadas. Assim, uma vez que este tipo de coordenação se mostra crucial para a estrutura dos sítios catalíticos das enzimas LPMO e pMMO, é de se esperar que o mesmo exerça um papel importante na química de ativação realizada por esses sistemas.

Recentemente Ross, *et al.* (2019) publicaram um artigo sobre a natureza química do sítio catalítico da pMMO que mudou os rumos sobre a compreensão da natureza química do sítio da pMMO. Com auxílio de técnicas de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR – do inglês, *Electron Paramagnetic Resonance*) e de Ressonância Dupla Nuclear Eletrônica (ENDOR – do inglês, *Electron Nuclear Double Resonance*), os autores propuseram que ao invés de um centro binuclear de cobre a pMMO continha um centro mononuclear de cobre. Nesta proposta, os centros metálicos ficaram definidos como: i) pmoA

– contendo His<sup>48</sup> e His<sup>72</sup>, centro monocobre sendo que a His<sup>48</sup> não é conservada, apenas observado na estrutura da *Methylococcus capsulatus* (sendo chamado também de sítio de Bis-His), ii) pmoB – definido como um centro monocobre, coordenado a dois nitrogênios da His<sup>33</sup> (fazendo uma coordenação chamada de “braço de histidina”), a um nitrogênio do resíduo de His<sup>137</sup> e um nitrogênio de His<sup>139</sup> e iii) pmoC, foi definido como um centro metálico de Cu, localizado na parte da bicamada lipídica, coordenado pelos resíduos de Asp<sup>156</sup>, His<sup>160</sup>, His<sup>173</sup> (ROSS; *et al.*, 2019). Essa nova estrutura foi disponibilizada no *Protein Data Bank* (PDB)<sup>3</sup>. Com o código 3RGB, e esta é a estrutura que foi tomada como partida para este trabalho. Na figura 5, é mostrada a representação do sítio ativo modelado como um complexo mononuclear de cobre da estrutura 3RGB resolvida em 2,68 Å de resolução.

**Figura 5:** Estrutura do sítio ativo mononuclear de cobre revelado da estrutura cristalográfica 3RGB.



Fonte: Autores (2020).

O conjunto de dados espectroscópicos e estruturais obtidos principalmente por Ross e colaboradores (2019), assim como outros grupos de pesquisa, representam o principal avanço na elucidação da estrutura e função catalítica da pMMO. Entretanto, em 2,6-2,8 Å de resolução alguns detalhes estruturais não podem ser determinados precisamente. Como já mencionado, nessa faixa de resolução é complicado, por exemplo, avaliar a presença de moléculas do

<sup>3</sup> *Protein Data Bank* é um banco de dados online que disponibiliza estruturas cristalográficas em 3D para enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e conjuntos complexos. Disponível em: < <https://www.rcsb.org/> >. Acesso em: 25 jun. 2020.

solvente próximas à região do sítio ativo. Vale destacar que o principal candidato para sítio catalítico da pMMO está localizado numa região bastante exposta ao solvente, logo é de se esperar que moléculas de água possam até mesmo compor a primeira esfera de coordenação. Nessas condições também é bastante complicado avaliar a dinâmica estrutural de alguns resíduos da segunda esfera de coordenação, os quais podem desempenhar algum papel importante no processo catalítico global. A descrição detalhada do ambiente químico de coordenação dos sítios catalíticos em metaloenzimas é fundamental para se entender o mecanismo de ação, uma vez que a natureza química dos ligantes diretamente coordenados aos centros metálicos pode alterar os estados eletrônicos dos íons, influenciando, dessa forma, a sua reatividade.

Dentro desse contexto, o objetivo central deste trabalho é contribuir para elucidação em nível molecular das propriedades estruturais e eletrônicas do sítio catalítico da enzima pMMO com intuito de auxiliar na interpretação de resultados experimentais recentes, assim como na tentativa de compreender como essas propriedades determinam o mecanismo de ação dessa enzima na catálise da reação de oxidação de alcanos. Utilizando para este fim, uma combinação de métodos modernos da química computacional, tais como: Mecânica Quântica (MQ) e Dinâmica Molecular (DM).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para elucidação ao nível molecular das propriedades estruturais e eletrônicas da enzima pMMO com intuito de compreender como essas propriedades determinam o mecanismo de ação dessa enzima na catálise da reação de oxidação de alcanos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Elaborar um modelo químico inicial para a parte solúvel da enzima pMMO a partir da estrutura cristalográfica 3RGB;
- II. Realizar uma simulação de dinâmica molecular clássica para avaliar a dinâmica estrutural da parte solúvel da pMMO em solução;
- III. Realizar uma série de análises estruturais envolvendo a região do sítio catalítico da pMMO a partir da trajetória gerada da dinâmica molecular;
- IV. Realizar uma análise estatística para selecionar estruturas da trajetória de Dinâmica Molecular e usá-las como entrada para calcular os parâmetros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do sítio da pMMO, usando a teoria do funcional da densidade (DFT), com diferentes funcionais de troca-correlação. Comparar os resultados obtidos com dados experimentais recentes para auxiliar na interpretação desses resultados e usar como base para propor um modelo para o sítio da pMMO e;
- V. Realizar um estudo sistemático com diferentes funcionais de troca-correlação da DFT para avaliar o desempenho desses funcionais na descrição das propriedades magnéticas da pMMO. O principal objetivo dessa etapa é estabelecer uma metodologia eficiente para calcular parâmetros de RPE de metaloenzimas.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, é descrito brevemente os aspectos fundamentais sobre a modelagem computacional de sistemas enzimáticos. Destacando os fundamentos dos métodos computacionais até então utilizados nesse trabalho. Basicamente, os métodos computacionais são divididos em duas classes: os métodos baseados na mecânica clássica e os métodos baseados na mecânica quântica. Também existe os chamados métodos híbridos, os quais representam uma combinação dos fundamentos dos métodos clássicos e quânticos.

Os métodos clássicos têm como base a Mecânica Molecular (MM), onde as possíveis interações entre as partículas de um sistema molecular são descritas por modelos matemáticos contendo parâmetros empíricos. Dentro dessa classe estão contidos os métodos de dinâmica molecular (DM), cuja dinâmica do sistema é avaliada a partir da resolução de equações de Newton, e o método de Monte Carlo (MC) clássico. Os métodos de química quântica são baseados na resolução da equação de Schrödinger, e são divididos basicamente em dois tipos: os *ab initio* e os semiempíricos. Ainda existe um modelo alternativo a estes, que são os métodos baseados na Teoria do Funcional de Densidade (DFT- do inglês - *Density Functional Theory*), que tem como variável principal a densidade eletrônica ao invés da função de onda (SANT'ANNA, 2009).

A escolha do método depende do problema em questão. Neste trabalho, foi utilizado o método de dinâmica molecular e algumas aproximações da Teoria do Funcional da Densidade.

#### 3.1 QUÍMICA COMPUTACIONAL E O ESTUDO DE SISTEMA ENZIMÁTICOS

Como exposto na introdução e de acordo com a IUBMB (1981), uma enzima é uma proteína que atua como um catalisador. As enzimas são muito eficientes como catalisador, elas conseguem reduzir em muito o tempo de uma reação biológica. Como elas estão envolvidas em muitos processos que são vitais, há um grande interesse em saber como de fato elas são tão eficientes. Porém, mesmo com o grande avanço da bioquímica a essência do extraordinário poder catalítico de uma enzima ainda não é conhecido em sua totalidade (WARSHEL, 2003).

No ano de 1977 houve um avanço em termos teóricos e metodológicos na busca por entendimento detalhado sobre a natureza de sistemas enzimáticos. No mesmo ano foi publicado o primeiro estudo de dinâmica molecular por Camon, Gelin e Karplus, onde dentre outras coisas foi elucidado que proteínas não são estruturas estáticas como se pensava, e sim dinâmicas (MCCAMON; GELIN; KARPLUS, 1977). Estudos subsequentes vêm mostrando que de fato

a dinâmica proteica é um fator chave para que um sistema enzimático desempenhe sua função (BECKER; WATANABE, 2001; CARVALHO et al., 2014; GABBA et al., 2014; VY et al., 2020)

O uso dos métodos da Química Computacional permite prever o comportamento de um sistema em relação em tempo ou independente do tempo, propor construção e modelagem de materiais, calcular energias livres e estados de transição, entender mecanismos reacionais, dentre muitas outras possibilidades. As simulações são muito importantes, pois podem auxiliar como complemento a técnicas experimentais, podendo identificar interações que são importantes para o mecanismo catalítico de uma enzima (LONSDALE; HARVEY; MULHOLLAND, 2012). A Química Computacional pode fornecer algumas informações que não podem ser obtidas diretamente a partir de métodos experimentais, como por exemplo, a caracterização de intermediários e estados de transição (LONSDALE; HARVEY; MULHOLLAND, 2012).

Basicamente, três grandes métodos computacionais podem ser usados para o estudo de enzimas/proteínas, são eles: métodos de Mecânica Clássica, também conhecidos como métodos de Mecânica Molecular (MM), os métodos de Mecânica Quântica (MQ) e os métodos que são híbridos (MQ/MM ou QM/MM), que usam as aproximações clássica e quântica, sucessivamente.

Entender detalhadamente o mecanismo de ação de uma enzima é uma tarefa bastante desafiadora em termos computacionais e geralmente requer o uso de uma combinação de métodos. Os métodos de mecânica molecular, por exemplo, não conseguem descrever mudanças na estrutura eletrônica que ocorrem durante uma reação química, o que só pode ser avaliado com uso dos métodos baseados na mecânica quântica (CARVALHO et al., 2014). Por outro lado, os métodos de mecânica molecular possibilitam o cálculo computacional eficiente de propriedades moleculares de sistemas com elevado número de átomos, como é o caso de proteínas. Um dilema no uso dos métodos quânticos para o estudo de sistemas enzimáticos é referente a questão da alta demanda computacional exigida por esses métodos, o que é proibitivo para sistemas contendo milhares de átomos como é o caso de proteínas. Dessa forma, os métodos híbridos surgem como uma alternativa interessante para o estudo de sistemas enzimáticos já que neste caso é uma aproximação razoável tratar com métodos de química quântica a região onde efetivamente ocorre a reação química e utilizar a mecânica molecular para descrever o restante da estrutura da proteína.

### 3.2 MODELAGEM COMPUTACIONAL CLÁSSICA DE METALOENZIMAS

Metaloenzimas são enzimas que possuem metais na estrutura do sítio ativo. Dessa forma, o sítio ativo de uma metaloenzima consiste de: um ou mais íons metálicos, a cadeia lateral da proteína, pontes exógenas e ligantes terminais que compõem a primeira esfera de coordenação do metal (OSÓRIO, 2007). Os metais presentes numa metaloenzima, são partes permanentes dela e participam durante a catálise enzimática, sendo essenciais durante o processo. A natureza da ligação metal-ligante no sítio ativo de uma metaloenzima é bastante dependente da natureza química do íon metálico e do ligante, e conseqüentemente do estado de oxidação e de spin do íon, da geometria do complexo, da estrutura eletrônica de valência do ligante. Alguns metais biológicos são: Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Mo, Hg e W (HOLM; KENNEPOHL; SOLOMON, 1996).

Apesar de possuir uma química rica, a presença de um metal no sítio ativo, torna um pouco problemático o uso de metodologias computacionais bem estabelecidas. Em uma Dinâmica Molecular (DM), por exemplo, o maior problema de utilizá-la para tratar uma metaloenzima, é a falta de parâmetros que sejam adequados para descrever as interações do átomo metálico com o restante da enzima (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2010). Para tratar esse problema, algumas diferentes abordagens podem ser utilizadas.

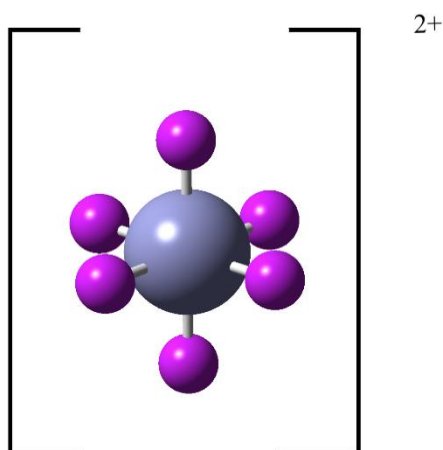
Para tratar classicamente o átomo metálico e descrever as interações dele com o restante da enzima, em uma simulação de DM, existem três métodos diferentes: o modelo não-ligado, o modelo ligado e o modelo simulado do átomo catiônico (também chamado de *Dummy*) (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2010). No primeiro modelo (o modelo não-ligado), descreve as interações do átomo metálico por meio de termos de energia eletrostática e de van der Waals. No modelo ligado, são incluídas também as ligações covalentes entre o metal e os ligantes, fazendo com que o número de coordenação se mantenha durante a simulação DM e o último modelo (átomo *Dummy*), utiliza as interações dos dois modelos anteriores (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2010).

Existem algumas limitações para estes modelos. No caso do modelo não-ligado, ele é bem sucedido quando se trata de metais alcalinos e alcalinos terrosos, mas não é tão adequado para metais de transição. Já o modelo ligado ele tem ligações covalentes que são predefinidas entre o metal e os ligantes, desta forma não permite troca de ligantes, nem interconversão entre geometrias de coordenação (LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015). O modelo *dummy* tem o intuito de resolver estes problemas, fornecendo uma descrição não-ligada que possui os efeitos

estruturais e eletrostáticos, com a inserção de átomos *dummy* (fictícios) em torno do metal (LIAO; KAMERLIN; STRODEL, 2015).

No modelo *dummy*, a carga do metal é distribuída igualmente entre os átomos fictícios, a massa e parâmetros de van der Waals, são atribuídos a apenas o pseudometal que está localizado no centro de referência e sem carga (neste caso, o pseudometal está apenas ligado aos átomos fictícios, sem outros ligantes), alguns exemplos são:  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2010). Na figura 6, apresentamos este modelo (*dummy*) para o caso do íon  $Zn^{2+}$  hexacoordenado, este modelo é descrito em Duarte; *et. al* (2014), para o caso do  $Zn^{2+}$  e outros metais. No caso do átomo de  $Cu^{2+}$  descrito por Liao, Kamerlin e Strodel (2015), o modelo se apresenta diferente. Tanto a carga quanto a massa são distribuídas entre o pseudometal e os átomos fictícios que estão ao redor dele. Neste modelo com o Cobre, os efeitos de distorção do octaedro de Jahn-Teller<sup>4</sup> são levados em consideração. Os detalhes para o modelo *dummy* do íon  $Cu^{2+}$  de Liao, Kamerlin e Strodel (2015) estão apresentados no tópico de procedimento computacional.

**Figura 6.** Representação do modelo *dummy* para o  $Zn^{2+}$  em hexacoordenação. Em cinza, está a representação do pseudo-metal Zn e em roxo a representação dos átomos *dummy*.



Fonte: Autores (2020).

### 3.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

<sup>4</sup> Efeito em que há um alongamento das duas ligações em axial (num octaedro), e há uma compressão das quatro ligações em equatorial, geralmente ocorre em complexos de configuração eletrônica  $d^9$ . (SHRIVER; ATKINS, 2003).

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

A descrição quântica de um sistema se baseia essencialmente na solução da equação de Schrödinger (equação 1), o que permite a determinação da função de onda do sistema, e com ela a obtenção de todas as suas propriedades (SILVA *et al.*, 2010).

$$H\Phi = E \Phi \quad (1)$$

Nesta equação, H é o Hamiltoniano, E é a energia total e  $\Phi$  é a função de onda. A equação não tem resolução analítica para sistemas com mais de dois corpos e para casos como esses só é possível obter soluções aproximadas, o que dá origem aos diferentes métodos da química quântica (*ab initio*, semiempíricos e DFT).

Diferente dos métodos *ab initio* e semiempíricos, a DFT não se baseia na função de onda, mas na densidade eletrônica  $\rho(x, y, z)$  (LEWARS, 2016). A DFT é uma boa alternativa para os métodos que usam a função de onda. Algumas aproximações da DFT possibilitam um equilíbrio entre precisão e custo computacional, isso permite que sistemas consideravelmente maiores possam ser tratados usando este método que antes, só seria possível usando os métodos *ab initio*, mantendo precisões similares, e em alguns casos até melhores (DIAS, 2012).

Quando comparada a função de onda, a densidade eletrônica é uma função que depende apenas da posição de três variáveis ( $x, y, z$ ), enquanto que a função de onda para uma molécula é uma função de  $4n$  variáveis, três variáveis de coordenadas espaciais e uma coordenada de *spin*, sendo  $n$  o número de átomos do sistema (LEWARS, 2016; SANT'ANNA, 2009). Ou seja, independentemente do tamanho do sistema, a densidade eletrônica permanece sendo uma função de três variáveis ( $x, y, z$ ). A função de densidade de elétrons (DFT), têm três vantagens em comparação a função de onda: é mensurável experimentalmente, é intuitivamente compreensível e matematicamente mais tratável (LEWARS, 2016).

As bases teóricas da DFT foram publicadas nos anos 60 (1964) e são fundamentadas nos teoremas de Hohenberg e Kohn, que mostraram matematicamente que a energia do estado fundamental é completamente determinada pela densidade eletrônica, e também que a energia do estado fundamental é mínima para a densidade  $\rho$  exata (HOHENBERG; KOHN, 1964; SILVA *et al.*, 2010). Para a energia total de um sistema, considerando um sistema atômico/molecular com  $n$  elétrons, o funcional da energia total do sistema  $E[(\rho)]$  pode ser dado pela soma de alguns funcionais,

$$E_{sis} = T[\rho] + \int \rho(r)v(r) dr + V_{ee}(\rho) \quad (2)$$

Em que  $T[\rho]$  representa o funcional de energia cinética e  $V_{ee}(\rho)$  representa o funcional de repulsão eletrônica (MORGON; CUSTODIO, 1995).

Para a realização prática do teorema de Hohenberg e Kohn, Kohn e Sham em 1965 dividiram a energia total do sistema da seguinte maneira;

$$E[\rho(r)] = T_s[\rho(r)] + U[\rho(r)] + E_{XC}[\rho(r)] \quad (3)$$

Sendo,  $T_s[\rho(r)]$  a energia cinética de um gás de elétrons homogêneos (sem interação),  $U[\rho(r)]$ , a repulsão Coulômbica entre densidades eletrônicas e  $E_{XC}[\rho(r)]$ , é o funcional de troca-correlação (SILVA, 2004). O termo  $E_{XC}[\rho(r)]$  inclui os efeitos de correlação eletrônica não-clássicos (troca) e os efeitos de correlação para corrigir a diferença na energia cinética entre o sistema fictício não interagente e o sistema real ( $T[\rho(r)] - T_s[\rho(r)]$ ) (SILVA, 2004).

A dificuldade em resolver as equações de Kohn e Sham, está no fato de que é necessário utilizar aproximações para descrever o termo de troca e correlação, pois embora a DFT seja uma teoria exata, a forma analítica do termo  $E_{XC}[\rho(r)]$  não é conhecida (CRAMER, 2003; DIAS, 2012; DUARTE, 2001). Isso representa um ponto central para o desenvolvimento da DFT, já que a qualidade final dos resultados obtidos a partir de cálculos DFT tem se mostrado extremamente dependente do tipo do funcional de troca-correlação (ANTONY; GRIMME, 2006; DA SILVA et al., 2010; GOERIGK; GRIMME, 2011; HARVEY, 2006). Uma vez que não se conhece a forma funcional exata do termo de troca-correlação e nem uma forma sistemática de melhorá-lo, a construção desse funcional é feita através de algumas aproximações. As principais aproximações para o funcional de troca-correlação são:

- Aproximação da Densidade Local (LDA – do inglês, *Local Density Approximation*) – O termo aproximação da densidade local (LDA), foi usado anteriormente para se referir a qualquer teoria do funcional de densidade em que o valor do termo de troca-correlação ( $E_X[\rho(r)]$ ) poderia ser calculado para uma posição  $r$  a partir de  $\rho$ , sendo assim, o valor de  $\rho$  (densidade) local (CRAMER, 2003; DA SILVA, 2013). Um exemplo de funcional de troca-correlação é o método  $X_\alpha$  desenvolvido por Slater, mostrado na equação 4;

$$E_X = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi}\right)^{1/3} \int \rho(r)^{4/3} dr \quad (4)$$

De acordo com a equação 4, a dependência do funcional  $E_X$  é apenas com o valor da densidade ( $\rho$ ), para um ponto  $r$ , ou seja, há apenas a dependência local (DA SILVA, 2013; HARVEY, 2006; SLATER, 1951).

- Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA – do inglês, *Generalized Gradient Approximation*) – Num sistema molecular, a densidade eletrônica não é uniforme, logo o funcional LDA possui algumas limitações. Portanto, uma maneira de corrigir esta limitação, foi fazer com que o funcional dependesse também do vetor de posição, que é o gradiente da densidade  $\nabla\rho(r)$ , uma forma geral da equação para um funcional GGA é mostrado na equação 5 (CRAMER, 2003; DA SILVA, 2013).

$$E_{XC}^{GGA} = E_{XC}^{LSD} [\rho(r)] + \Delta E_{XC} \left[ \frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho^{4/3}(r)} \right] \quad (5)$$

Um dos primeiros funcionais propostos mais popular da classe dos GGA foi o proposto por Becke em 1988, outros exemplos são: BLYP de Lee-Yang-Parr-Becke (1988), o funcional PBE de Perdew-Burke-Erzenhof (1997) e o funcional PW91 de Perdew-Wang (1992) (BECKE, 1988; CRAMER, 2003; DA SILVA, 2013; LEE; YANG; PARR, 1988; PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1997; PERDEW; WANG, 1992).

- Métodos Híbridos – Métodos Híbridos são métodos que usam uma fração do termo de troca do método Hartree-Fock com os termos de troca e correlação de outros funcionais de DFT, o mais famoso desta classe de funcionais é o funcional B3LYP, que combina os funcionais de troca de Becke, funcional local (LDA) e Hartree-Fock e um funcional de correlação local VWN proposto por Vosko, Wilk e Nusair (BECKE, 1988; DA SILVA, 2013; DIAS, 2012; HARVEY, 2006; VOSKO; WILK; NUSAIR, 1980). A equação para o funcional B3LYP (em sua forma geral), pode ser vista na equação 6.

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0)E_X^{LSDA} + a_0E_X^{HF} + a_x\Delta E_X^{B88} + a_cE_c^{LYP} + (1 - a_c)E_c^{VWN} \quad (6)$$

Na equação 6, o termo  $E_X^{LSDA}$  é a energia de troca obtida da aproximação da densidade local de spin,  $E_X^{HF}$  é a energia de troca para o método Hartree-Fock,  $\Delta E_X^{B88}$  é a correção de troca que foi



proposta por Becke,  $\Delta E_X^{LYP}$  é o funcional de correlação proposto por Lee, Yang e Parr e  $E_c^{VWN}$  é o funcional de correlação sugerido por Vosko, Wilk e Nusair, os coeficientes  $a_0$ ,  $a_x$  e  $a_c$  são parâmetros empíricos geralmente obtidos por um processo de ajuste de dados experimentais (DA SILVA, 2013).

### 3.3.2 Mecânica Molecular (MM)

Na Mecânica Molecular (MM), os átomos que formam uma dada molécula são descritos como esferas rígidas contendo uma carga parcial e as ligações químicas são usualmente descritas por potenciais harmônicos similares aos usados para descrever a dinâmica de um sistema do tipo massa-mola (LEWARS, 2016).

Um conjunto de potenciais de interações entre os constituintes do sistema é descrito pelo chamado campo de força, sendo este conhecido como uma função matemática composta de diferentes termos que tratam as possíveis interações entre os átomos de uma molécula (vibrações, deformações angulares, torções em torno de uma ligação química, interações eletrostáticas e de van der Waals) (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). No caso do campo de força usado neste trabalho (o OPLS-AA) ele pode ser descrito de acordo com a equação 7:

$$E_{tot} = \sum E_{lig} + \sum E_0 + \sum E_{vdW} + \sum E_{ele} + \sum E_{tor} \quad (7)$$

Onde,  $E_{lig}$  corresponde as energias de estiramento da ligação (vibração),  $E_0$  é a energia de deformação do ângulo,  $E_{vdW}$  representa as energias de interação de van der Waals, o  $E_{ele}$  representa as energias de interação/repulsão das cargas e o  $E_{tor}$  representa as energias de torção em torno de uma ligação química (KAMINSKI et al., 2001). Os termos  $E_{lig}$ ,  $E_0$  e  $E_{tor}$ , são chamados de termos ligados e os outros dois termos  $E_{vdW}$  e  $E_{ele}$ , são chamados de termos não ligados, estes dependem apenas de energias de interações e repulsões.

Minimizar a energia do sistema, ou seja, determinar o ponto de menor energia, é um procedimento que geralmente é feito com uso de algoritmos matemáticos que operam no sentido de encontrar as posições dos átomos numa molécula que reduzam todas as penalidades energéticas do sistema (SANT'ANNA, 2009). O que significa basicamente uma busca por pontos de mínimo de uma função de várias variáveis a partir da avaliação das derivadas de primeira e segunda ordem.

Para o caso do campo de força usado neste trabalho, descrevermos cada termo da equação 7. O primeiro termo, o termo que descreve o movimento de estiramento entre dois átomos que formam uma ligação química é dado pela equação 8.

$$E_{lig} = k_{est}(l - l_0)^2 \quad (8)$$

Onde  $k_{est}$ , representa a constante de força para a restituição de força aos valores de equilíbrio,  $l$  representa o comprimento de ligação e  $l_0$  corresponde ao valor de equilíbrio.

O movimento de deformação angular é usualmente descrito pela equação 9.

$$E_0 = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (9)$$

Onde  $k_\theta$  representa a constante de força para restituição de força aos valores de equilíbrio,  $\theta$  corresponde ao ângulo de ligação e  $\theta_0$  é o valor de equilíbrio.

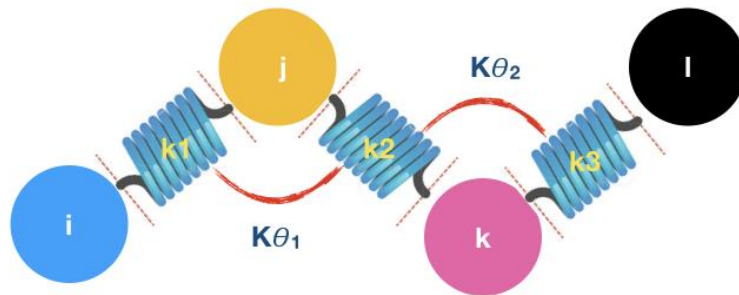
Para o caso das energias de torção em torno da ligação, é descrito de acordo com a equação 10.

$$E_{tor} = \sum_i \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos \phi_i] + \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\phi_i)] + \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\phi_i)] \quad (10)$$

A soma é realizada em todos os ângulos diédricos.

As representações para as interações ligadas, pode ser vista na figura 7.

**Figura 7.** Representação dos termos de Mecânica Molecular para as interações ligadas entre os átomos.



Fonte: Autores (2021).

As interações entre átomos não-ligados covalentemente (que representa os outros termos de energia do campo de força), que são  $E_{vdW}$  e  $E_{ele}$ , são usualmente descritos pelos potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, respectivamente, mostrados nas equações 11 e 12 descrevendo as interações entre dois átomos  $i$  e  $j$  (LEWARS, 2016; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

$$E_{vdW} = 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (11)$$

$$E_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (12)$$

Na equação 11,  $\varepsilon_{ij}$  representa a profundidade do potencial das energias atrativas e repulsivas,  $\sigma_{ij}$  distância finita que o potencial da inter-partícula é zero, de forma geral, o parâmetro  $\left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12}$  representa os termos repulsivos e o parâmetro  $\left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6$  representa os termos atrativos. Na equação 12,  $q_i q_j$  representa as cargas dos átomos,  $r_{ij}$  é a representação de distância dessas cargas,  $\varepsilon_0$  é a permissividade no vácuo e  $\varepsilon_r$  é a constante dielétrica.

Em geral, um dado campo de força é desenvolvido para a descrição de propriedades moleculares de uma certa classe de sistemas. Cada campo de força tem sua particularidade em relação ao modelo matemático e procedimento de ajuste para a obtenção dos parâmetros empíricos presentes na função de energia potencial. Nesse contexto, existem vários campos de força disponíveis, dentre eles: AMBER (1995), MM3 (1989), CHARMM (1983), GROMOS (1999) e OPLS (1996) (ALLINGER; YUH; LII, 1989; BROOKS et al., 1983; CORNELL et al., 1995; JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; SCOTT et al., 1999). A qualidade dos resultados obtidos via mecânica molecular está diretamente ligada a escolha do campo de força adequado para tratar o sistema de interesse (KUZMANIC et al., 2019; PAISSONI et al., 2018).

### 3.3.3 Dinâmica Molecular (DM)

A combinação dos métodos de mecânica molecular com as equações de movimento da dinâmica molecular fornece uma maneira eficiente para descrever propriedades de fenômenos dependente do tempo. A resolução das equações de movimento possibilita a avaliação do

grande número de movimentos internos e mudanças conformacionais de processos enzimáticos em solução.

Para um sistema composto de  $n$  partículas, uma simulação de dinâmica molecular, consiste basicamente na resolução da equação do movimento de Newton, conforme mostrado na equação 13.

$$\vec{F}_n = m_n \cdot \vec{a}_n \quad (13)$$

Onde  $\vec{F}_n$  é a força que causa a aceleração  $\vec{a}_n$  em um átomo que possui uma massa  $m_n$ . A força pode ser obtida da derivada da energia potencial  $E$  com relação às coordenadas  $r_n$  dos átomos (SANT'ANNA, 2009).

Definido o campo de força, é possível calcular todas as forças que atuam sobre os átomos do sistema, a partir do cálculo da primeira derivada da energia potencial, que no caso da mecânica molecular é descrita por um dado campo de força.

Do ponto de vista computacional, a solução analítica dessas equações para um sistema com vários átomos torna-se impraticável. No entanto, para integrar as equações de movimento do sistema são utilizados os algoritmos, como por exemplo, o algoritmo de *leapfrog*. Neste caso, a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo que permite simular movimentos como a vibração das ligações, utilizando as posições  $x(t)$  no tempo  $t$ , a posição após um intervalo de tempo  $\Delta t$  será  $x(t+\Delta t)$  obtida de uma expansão em série de Taylor, conforme a equação 14 (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1988). Em simulações de dinâmica molecular geralmente utiliza-se o intervalo na ordem de 0,5 a 1 fs (femtosegundo) (1 fs =  $10^{-15}$  s).

$$x(t + \Delta t) = x(t_n) + v(t_n + \Delta t/2) \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (14)$$

O algoritmo *leapfrog* possui as vantagens de que as velocidades aparecem explicitamente na integração, o que permite um acoplamento do sistema a um banho térmico (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1988). A integração das equações de movimento gera o chamado arquivo de trajetória contendo as coordenadas dos átomos ao longo do tempo de simulação. De posse dessa trajetória é possível realizar uma série de análises estruturais envolvendo grupos específicos da biomolécula, o que pode em princípio fornecer informações ao nível molecular sobre interações específicas entre resíduos de aminoácidos próximos do sítio

ativo, assim como interações desse com moléculas do solvente e um dado substrato. Essas informações podem ser fundamentais para se entender a dinâmica estrutural de uma enzima e de como essa propriedade pode ser relacionada com sua função catalítica (HUGGINS et al., 2019). Numa simulação de dinâmica molecular, o tempo de simulação é crucial para que movimentos característicos de proteínas/enzimas possam ser observados. Logo, o tempo em diferentes escalas tem um papel muito importante para a função biológicas das proteínas, um exemplo disso é o movimento da cadeia lateral controla a difusão de oxigênio para dentro e para fora da mioglobina e hemoglobina (BECKER; WATANABE, 2001). Na tabela 1, são apresentados alguns movimentos característicos de proteínas e sua escala de tempo correspondente:

Tabela 1 - Alguns movimentos de proteínas e suas escalas de tempo.

<b>Tipo de Movimento</b>	<b>Exemplo de funcionalidade</b>	<b>Escala de tempo</b>
<b>Movimento Local</b>		
Flutuações atômicas, Movimento da cadeia lateral.	Flexibilidade de acoplamento de ligante	Fentosegundos à picossegundos ( $10^{-15} - 10^{-12}$ s)
<b>Movimento de média escala</b>		
Movimento de braço terminal; Movimento de corpo rígido	Adaptação de conformação do sítio ativo; Especificidade de ligação.	Nanossegundos à microssegundos ( $10^{-9} - 10^{-6}$ s)
<b>Movimento de larga escala</b>		
Movimento de subunidade; Movimento de domínio.	Movimento de dobradiça; Transições alostéricas.	Microssegundos a milissegundos ( $10^{-6} - 10^{-3}$ s)

Fonte: Adaptado de Becker; Watanabe (2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

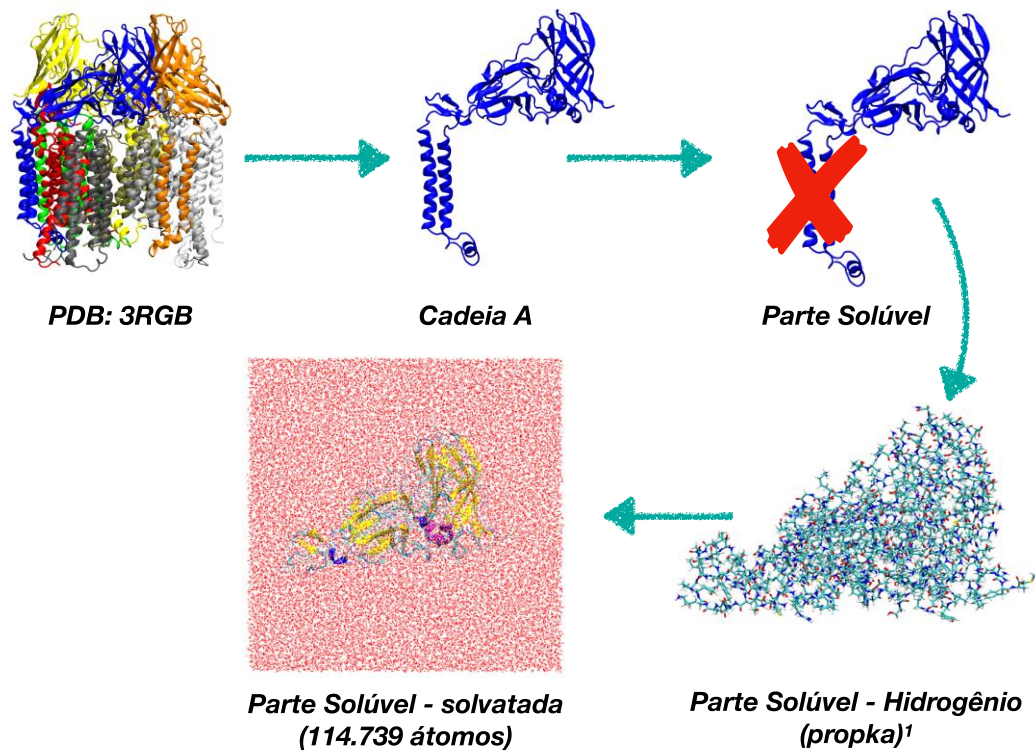
### 4.1 PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL

Os detalhes dos inputs usados na realização das simulações de dinâmica molecular e cálculo dos parâmetros de RPE, estão descritos nos apêndices **A**, **B**, **C**, **D** e **E**.

#### 4.1.1 Construção do Modelo

A construção do modelo químico para as simulações seguiu as etapas apresentadas na figura 8.

**Figura 8.** Etapas de construção do modelo químico.



Fonte: Autores (2020).

As coordenadas iniciais do modelo da pMMO foram retiradas da estrutura cristalográfica obtida do banco de dados PDB (Protein Data Bank) código 3RGB. Em seguida foi retirada da estrutura da proteína apenas uma das cadeias proteicas que contém o sítio catalítico. Já que o principal candidato a sítio ativo da pMMO se encontra na parte solúvel de

sua estrutura, decidiu-se retirar do modelo a porção das alfa-hélices que originalmente se encontra diretamente ligada à membrana. Uma vez definido como modelo químico apenas a parte solúvel da pMMO, foi realizado a adição dos átomos de hidrogênio usando como critério o pKa dos aminoácidos da proteína calculado utilizando o código propka (LI; ROBERTSON; JENSEN, 2005). Um cuidado adicional (no sentido de verificar, ao final do cálculo com o código propka, como estavam protonados estes resíduos) foi tomado sobre a correta protonação dos resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup>, os quais compõem a primeira esfera de coordenação do íon cobre. Por fim, a parte solúvel da pMMO foi solvatada por moléculas de água posicionadas numa caixa cúbica de dimensões 104,9 x 104,9 x 104,9 Å.

#### 4.1.2 Protocolo Computacional da Simulação de Dinâmica Molecular

A adição de átomos de hidrogênio a estrutura PDB da proteína pode gerar algumas distorções na estrutura da proteína devido ao posicionamento muito próximos de alguns átomos. Desta forma, após a construção do modelo químico com a parte da solúvel da pMMO devidamente protonada, foi realizado um cálculo de minimização de energia a partir de 1.000 etapas de minimização usando o método SD (SD - *Steepest Descent*). O campo de força escolhido para tratar as principais interações presentes no sistema investigado foi o campo de força OPLS-AA (OPLS-AA - *Optimized Potential for Liquid Simulations All-atoms*) (KAMINSKI et al., 2001). A escolha por este campo se deu por ser um campo de força desenvolvido para proteínas, e também pela compatibilidade com os parâmetros do modelo *dummy* utilizados para tratar o íon cobre cujos detalhes estão descritos no tópico 4.3. De posse da estrutura minimizada, a segunda etapa do protocolo foi a adição de moléculas de água e aplicação das condições periódicas de contorno. O modelo clássico escolhido para tratar as moléculas de água foi o TIP4P (ABASCAL; VEGA, 2005). A carga total do sistema era -1, assim foi adicionado o íon Na<sup>+</sup> como contra-íon para neutralizar a carga total do sistema.

O processo de solvatação e adição de contra-íons ao sistema pode gerar algumas interações desfavoráveis energeticamente devido a possibilidade de proximidade de alguns átomos e de fortes interações eletrostáticas repulsivas. Assim, para minimizar esses efeitos o sistema foi submetido a um processo de 1.000 etapas de minimização de energia utilizando novamente o método SD.

De posse da estrutura minimizada da proteína solvatada foi realizado uma simulação curta de apenas 200 ps mantendo as posições dos átomos da proteína fixos e deixando que as moléculas de água se movessem livremente. Esta etapa foi feita para “adaptar” as moléculas do

solvente ao redor da proteína minimizando possíveis interações desfavoráveis. Em seguida o sistema foi submetido a uma etapa de equilíbrio que consistiu de duas simulações curtas de 1 ns cada, num ensemble NVT ( $T=298$  K) e NpT ( $p=1$  bar,  $T=298$  K). O controle da temperatura foi feito usando o algoritmo de acoplamento Nose-Hoover (HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984). A pressão do sistema ao longo das simulações de dinâmica molecular foi controlada utilizando o algoritmo de acoplamento Parrinello-Rahman. Por fim, o sistema foi submetido a uma simulação de dinâmica molecular de 500 ns num ensemble NpT ( $p = 1$  bar,  $T = 298$  K). As interações eletrostáticas foram tratadas utilizando o método PME (PME - *Particle Mesh Ewals*) com um raio de corte de 1,2 nm (FRENKEL et al., 2001). O pH da simulação foi mantido em 7. As condições ótimas para induzir o crescimento das bactérias metanotróficas e induzir a atividade de oxidação do metano são: teor de água de 20%-35%, temperaturas entre 25° C-35° C e valores de pH entre 7,0-7,65 (HANSON; HANSON, 1996).

Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o programa GROMACS versão 2018.3 (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995).

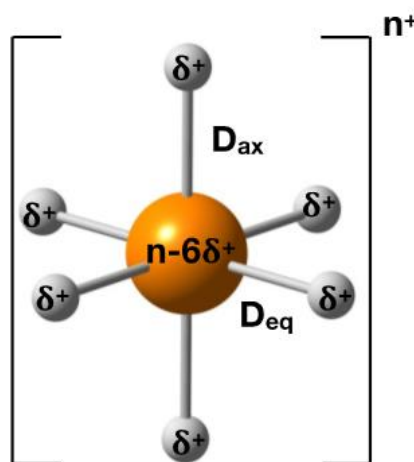
#### 4.1.3 Parâmetros para o $\text{Cu}^{2+}$ do Sítio Ativo

Inicialmente, precisaríamos definir parâmetros para o cobre já que os parâmetros para os íons dependem completamente das ligações que este faria no sítio ativo. Em um trabalho recente, descrito por Liao, Kamerlin e Strodel (2015), os autores desenvolveram, testaram e validaram um modelo de mecânica molecular para o íon  $\text{Cu}^{2+}$  baseado no modelo “Dummy”. A validação dos parâmetros desenvolvidos foi feita a partir de extensas simulações de dinâmica molecular de algumas proteínas de cobre, para as simulações, o campo de força usado foi o OPLS-AA (o mesmo utilizado neste trabalho).

Este modelo foi desenvolvido para tratar o íon cobre em condições de hexacoordenação. Neste modelo, o cobre está no centro de coordenação e os ligantes, são representados por “dummy” átomos. A carga do átomo de cobre é dividida entre os átomos *dummy* (como cargas parciais). O modelo também leva em consideração o efeito de distorção do campo octaédrico de Jahn-Teller. Os parâmetros desse modelo, os quais foram utilizados neste presente trabalho para tratar o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , estão apresentados na figura 9 e tabela 2.



**Figura 9.** Representação do modelo *dummy* para o íon  $\text{Cu}^{2+}$ .



Fonte: Adaptado de Liao, Kamerlin e Strodel (2015).

**Tabela 2.** Parâmetros do íon  $\text{Cu}^{2+}$  usado neste trabalho.

Ligação		$b_0$ (Å)	$K_b$ (Kcal/mol Å <sup>2</sup> )	
Cu- $D_{eq}$		1.000	800.00	
Cu- $D_{ax}$		0.800	800.00	
Ângulo		$\theta_0$ (Grau)	$K_\theta$ (Kcal/mol rad <sup>2</sup> )	
$D_{ax}$ -Cu- $D_{ax}$		180	250.0	
$D_{ax}$ -Cu- $D_{eq}$		90	250.0	
Átomo	Massa (u)	Carga (e)	$\sigma_{CuO}$ (Å)	$\epsilon_{CuO}$ (Kcal/mol)
Cu	45.546	- 1.00	2.043	4.1854
$D_{eq}$	3.000	0.725	$\sigma_D = 0$	$\epsilon_D = 0$
$D_{ax}$	3.000	0.050	$\sigma_D = 0$	$\epsilon_D = 0$

Fonte: Adaptado de Liao, Kamerlin e Strodel (2015).

#### 4.1.4 Análises Estruturais da Simulação de Dinâmica Molecular e Cálculo dos Parâmetros de EPR.

A partir da trajetória gerada da simulação de 500 ns foram feitas algumas análises estruturais (RMSD - *Root Mean Square Deviation*, RDF - *Radial Distribution Function*, ligações de hidrogênio e algumas distâncias entre grupos da proteína) para avaliar principalmente o ambiente de coordenação próximo a região do sítio ativo da pMMO.

Um dos objetivos principais deste trabalho é a realização de cálculos dos parâmetros de EPR (EPR - *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*) do sítio ativo da pMMO para

auxiliar na interpretação dos resultados experimentais reportados recentemente por Ross, *et al.* (2019), e com isso ajudar no entendimento sobre a estrutura e natureza química do sítio catalítico dessa enzima. A ideia é incluir o efeito da dinâmica estrutural da enzima nesses cálculos. Porém, se torna inviável realizar cálculos quânticos dos parâmetros de EPR para o grande número de estruturas geradas da simulação de dinâmica molecular de 500 ns. Assim, foi realizado um refinamento estatístico das estruturas da dinâmica molecular utilizando uma análise de cluster, baseando-se em Daura, *et. al* (1999). Nesse tipo de análise são avaliadas as estruturas conformacionais da enzima em relação ao tempo agrupando-as com base em critérios energéticos. A análise de cluster feita com base na simulação dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns gerou um conjunto de 38 estruturas médias, as quais foram usadas como entrada para a realização de cálculos dos parâmetros de EPR utilizando diferentes funcionais de troca-correlação da DFT num esquema sequencial S-Dinâmica Molecular/DFT. Os cálculos dos parâmetros de EPR foram realizados utilizando o método CPKS (CPKS - *Coupled Perturbed Kohn-Sham* Formalism) com os funcionais de troca-correlação B3LYP, BHANDHLYP e REVPBE (NEESE, 2003). Todos os átomos foram descritos utilizando o conjunto de funções de base Def2-TZVP. Os efeitos relativísticos foram tratados via o hamiltoniano ZORA (ZORA - *Zero-Order Regular Appoximation*) (VAN LENTHE; SNIJDERS; BAERENDS, 1996). Todos os cálculos de EPR foram realizados utilizando o programa Orca versão 4.2.1.

## 5 RESULTADOS

Antes de iniciarmos as discussões dos resultados, mostraremos o quanto o tema “pMMO” é relevante dentro da plataforma de pesquisas. Fazendo uma pesquisa dentro da Plataforma Periódicos CAPES, utilizando o acesso CAFe a fim de avaliar o quão crescente vem se tornando as discussões sobre a pMMO, foi pesquisado o termo “pMMO”, levando em consideração os últimos 10 anos (2011-2020) e considerando apenas periódicos revisados por pares (RP). Os resultados dessa análise estão apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1. Número de publicações relacionadas a pMMO nos últimos 10 anos.



Fonte: Autores (2020).

Como pode ser visto no gráfico 1, o número de publicações que apresentam o termo “pMMO” quando pesquisado, é um número considerável uma vez que o termo pesquisado é bastante específico. Isso mostra que nesses últimos anos o tema vem sendo cada vez mais debatido, mostrando assim, a relevância sua relevância. Vale ressaltar que esses números foram obtidos em pesquisa realizada em setembro de 2020, então os números deste ano podem ter sido alterados. Ainda que bastante discutido, pouco se compreende sobre a pMMO, já que as estruturas cristalográficas até então publicadas ainda apresentam algumas lacunas, principalmente no que diz respeito às propriedades estruturais e eletrônicas do sítio ativo.

Nos tópicos seguintes, são apresentados os resultados obtidos referentes ao estudo de simulação de dinâmica molecular da parte solúvel da pMMO e do cálculo dos parâmetros de

EPR do sítio mononuclear de cobre. Os detalhes sobre o procedimento computacional tanto da dinâmica molecular quanto dos cálculos dos parâmetros de EPR estão descritos no capítulo 4.

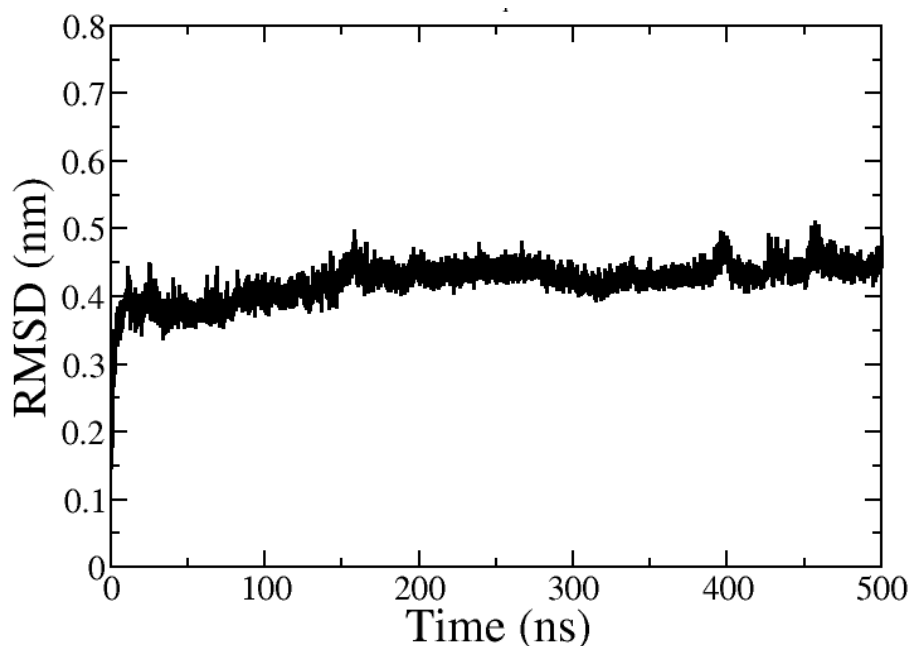
### 5.1 ANÁLISES ESTRUTURAIS

Para avaliar a estabilidade da trajetória obtida ao longo da simulação de dinâmica molecular de 500 ns para a parte solúvel da pMMO em água, foi avaliado o desvio quadrático médio das posições atômicas, RMSD (RMSD-*Root Mean Square Deviation*) em relação a estrutura cristalográfica. O RMSD foi calculado de acordo com a equação 15.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{1/2} \quad (15)$$

Onde  $M = \sum_{i=1}^N m_i$  e  $r_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no tempo  $t$ . (GROMACS, 2019) A variável  $t_2$  é o tempo utilizado para definir a posição do átomo  $i$  para a estrutura de referência, ou estrutura inicial ( $t_2=0$ ). A figura 10 mostra o RMSD calculado para os átomos do *backbone* da pMMO em relação a estrutura de referência, que nesse caso foi definida como sendo a estrutura cristalográfica da pMMO.

**Figura 10.** RMSD dos átomos do backbone da pMMO calculados em relação a estrutura cristalográfica da pMMO.



Fonte: Autores (2020).

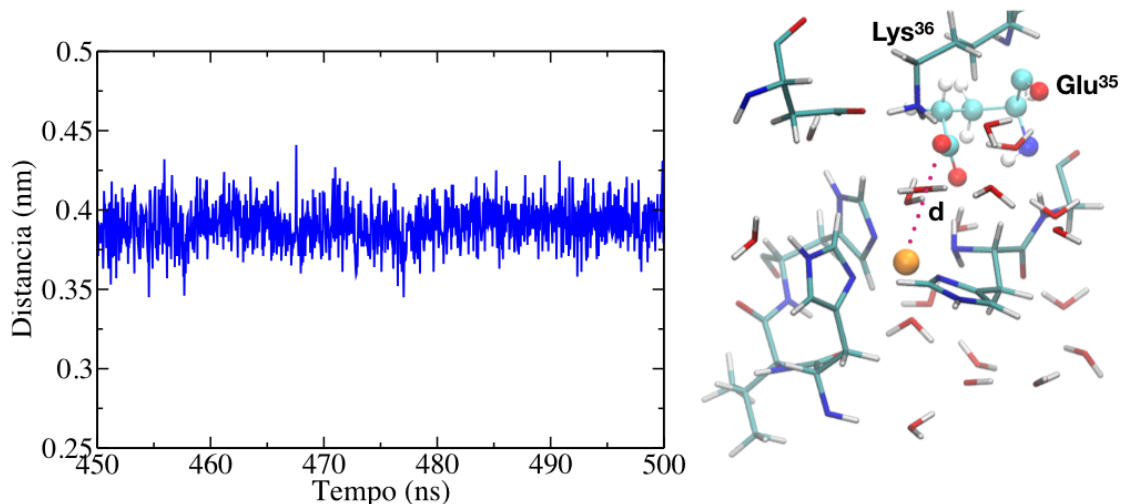
O perfil do RMSD apresentado na figura 9 mostra que nos primeiros 10 ns de simulação ocorre uma pronunciada variação da estrutura da proteína em relação a estrutura cristalográfica. Porém, a partir dos 20 ns o RMSD atinge um certo platô em torno de 0,4 nm com intervalos muito curtos de oscilação até os 500 ns de simulação. O comportamento observado do RMSD no intervalo de 20 à 500 ns indica uma estabilidade da simulação em termos estruturais. Estabilidade no sentido de não haver uma grande flutuação das posições atômicas a partir dos 20 ns de simulação. Vale destacar que o valor do RMSD médio em torno de 4,2 Å indica que a parte solúvel da pMMO apresenta uma considerável dinâmica estrutural em relação a estrutura cristalográfica, mostrando de certa forma o papel do meio solvente sobre a dinâmica estrutural da proteína.

Como já dito no texto, o principal objetivo desse trabalho é contribuir para uma elucidação detalhada sobre a estrutura e natureza química do sítio catalítico da pMMO. Assim, o foco central das análises estruturais realizadas nesse trabalho foi sobre a primeira e segunda esferas de coordenação do íon  $\text{Cu}^{2+}$ .

Um conjunto de modelos de sítio da pMMO vêm sendo propostos tanto a partir de estudos experimentais quanto computacionais (BALASUBRAMANIAN et al., 2010; ROSS et al., 2019; YOSHIZAWA; SHIOTA, 2006). Dentre esses, um modelo que se mostrou bastante reativo para a oxidação de metano foi o proposto computacionalmente por Yoshizawa e Shiota (2006). Nesse modelo, os autores modelaram o resíduo  $\text{Glu}^{35}$  como sendo um ligante coordenado ao íon cobre (compondo a primeira esfera de coordenação), embora a estrutura cristalográfica mostre que este resíduo esteja posicionado a uma distância maior que 4 Å do centro de cobre. Yoshizawa e Shiota (2006), argumentaram que embora a estrutura cristalográfica modelasse esse resíduo na segunda esfera de coordenação, a dinâmica estrutural da enzima poderia promover a possível coordenação. Porém, o estudo computacional de Yoshizawa e Shiota (2006) foi realizado com base em cálculos DFT de um modelo em fase gasosa sem considerar a estrutura da proteína e nem o efeito do meio solvente. As condições impostas por Yoshizawa e Shiota (2006) em seu modelo foram realizadas para que fosse possível criar um modelo com carga total neutra, o que de acordo com os autores foi um fator fundamental para a convergência dos cálculos em termos de estrutura eletrônica.

Com o intuito de investigar essa possível coordenação do  $\text{Glu}^{35}$  ao cobre, foi analisada o comportamento da distância entre um dos átomos de oxigênio do  $\text{Glu}^{35}$  e o íon  $\text{Cu}^{2+}$  da pMMO ao longo da simulação de 500 ns. Os resultados dos últimos 50 ns de simulação estão apresentados na figura 11.

**Figura 11.** Variação da distância  $d(\text{OE2-Cu}^{2+})$  do Glu35 ao longo dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns.



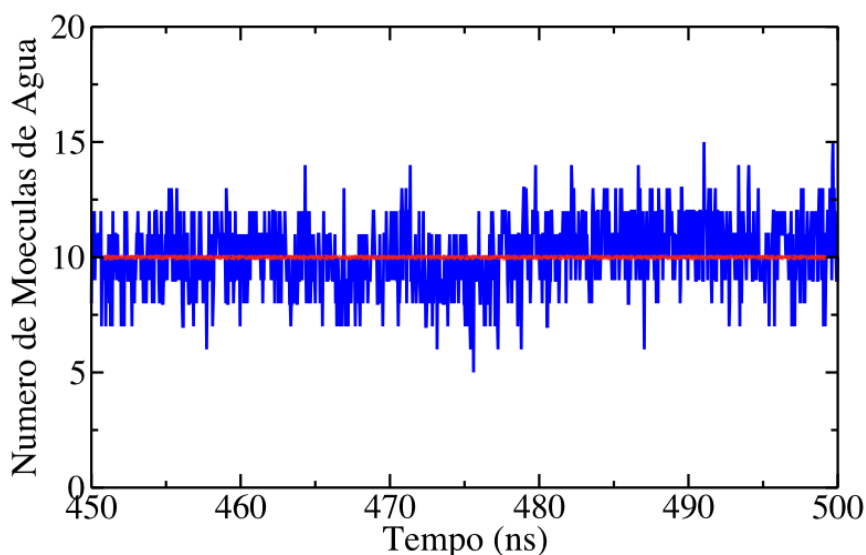
Fonte: Autores (2020).

Como pode ser visto na figura 11, a distância do oxigênio do grupo  $\text{COO}^-$  do  $\text{Glu}^{35}$  para o íon cobre é de aproximadamente  $4 \text{ \AA}$  ao longo da dinâmica molecular. Embora não seja possível observar a formação de uma ligação química numa simulação clássica, o resultado dessa análise fornece mais um suporte para o modelo sugerido a partir da estrutura cristalográfica da pMMO de que o resíduo  $\text{Glu}^{35}$ , de fato não faz parte da primeira esfera de coordenação do sítio de cobre. Uma ligação covalente tem em média  $1.4 \text{ \AA}$ -  $2.6 \text{ \AA}$ , logo uma distância de  $4 \text{ \AA}$  revela que o OE2 não está coordenado ao  $\text{Cu}^{2+}$  (HOUSECROFT; SHARPE, 2012). A análise visual de algumas estruturas da trajetória obtida da dinâmica molecular revelou que a coordenação do  $\text{Glu}^{35}$  ao íon cobre é dificultada pela existência de uma série de possíveis ligações de hidrogênio entre o grupo  $\text{COO}^-$  do  $\text{Glu}^{35}$  com moléculas de água, e com outros resíduos da segunda esfera de coordenação.

A estrutura cristalográfica da pMMO resolvida por difração de raios x revelou que o principal candidato para sítio catalítico está localizado na parte solúvel da estrutura da proteína, numa região exposta ao solvente. Assim, é razoável imaginar que haja a possibilidade de que moléculas de água interajam com o sítio ativo, inclusive compondo a primeira esfera de coordenação. Recentemente, Ross e colaboradores (2019) propuseram, a partir de caracterizações bioquímicas e de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, que o sítio mononuclear de cobre da parte solúvel da pMMO é formado por um complexo de  $\text{Cu}^{2+}$  contendo os resíduos  $\text{His}^{33}$ ,  $\text{His}^{137}$  e  $\text{His}^{139}$ , e uma molécula de água. Embora esse trabalho tenha trazido um avanço de grande importância na determinação da composição do sítio ativo da

pMMO, o estudo em si não levou em conta de maneira direta efeitos dinâmicos do meio solvente, como por exemplo a difusão de moléculas de água, o que em princípio permitiria que mais de uma molécula acessasse regiões próximas ao cobre. Para quantificar a interação de moléculas de água com o centro catalítico da pMMO, foi calculado o número médio de moléculas de água localizadas numa esfera de raio de 5 Å em relação ao íon cobre. O resultado dessa análise, feita considerando os últimos 50 ns da simulação de 500 ns, está mostrado na figura 12.

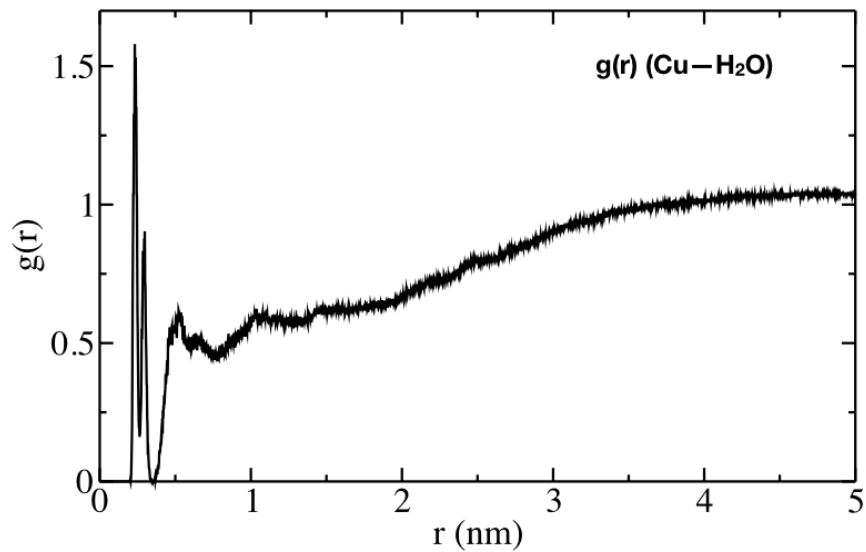
**Figura 12.** Número de molécula de água dentro de uma esfera de raio 5 Å em relação ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Valores dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns.



Fonte: Autores (2020).

O resultado mostrado na figura 12 mostra que em média 10 moléculas de água ocupam uma região próxima a 5 Å do centro de cobre. Levando em conta a difusão da água, esse resultado reforça a possibilidade de que mais de uma molécula de água alcance a primeira esfera de coordenação do cobre. Para obter ainda mais detalhes sobre a questão da possibilidade de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do cobre, foi calculado a função de distribuição radial envolvendo o par  $\text{Cu}^{2+}\text{---H}_2\text{O}$ . O resultado dessa análise está mostrado na figura 13.

**Figura 13.** Função de distribuição radial Cu<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O calculada considerando os últimos 50 ns da simulação de 500 ns.

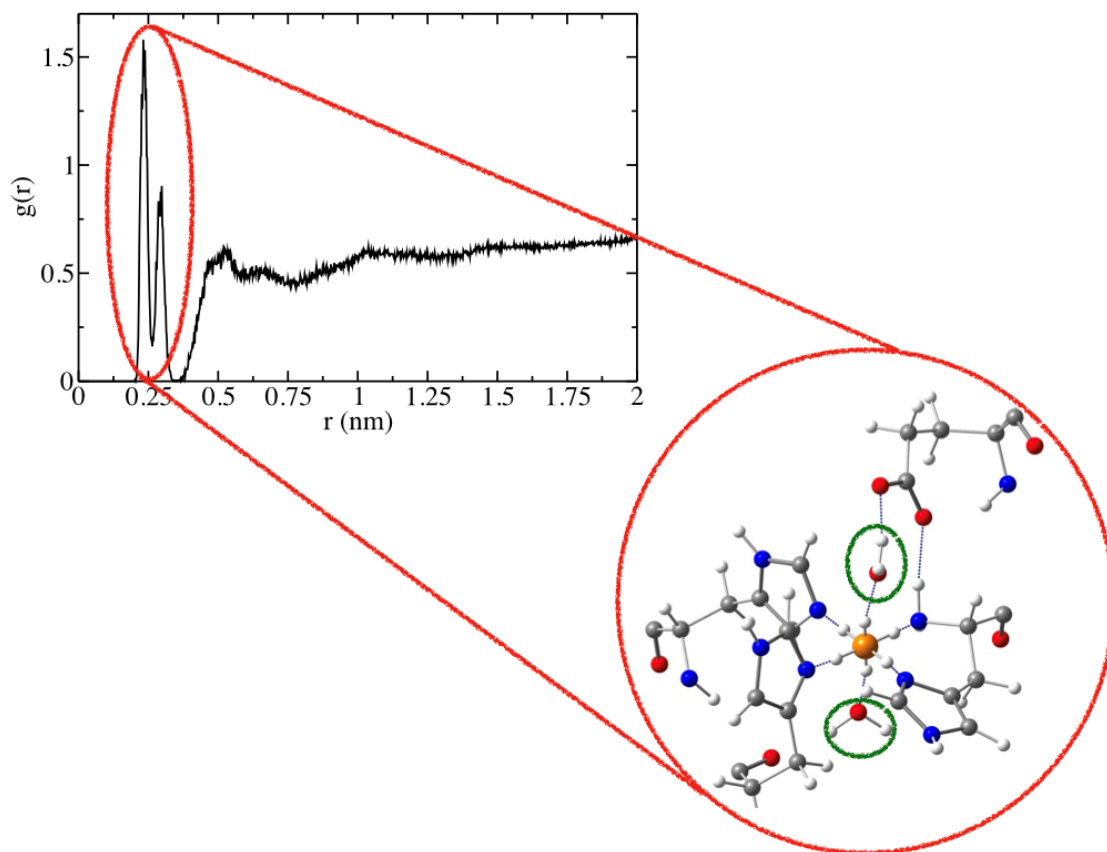


Fonte: Autores (2020).

O perfil da função de distribuição radial Cu-H<sub>2</sub>O mostra a existência de dois picos intensos e bem definidos entre 0,2-0,3 nm. Após esses dois picos foi observado um pico de menor intensidade e, um pouco mais largo entre 0,4 e 0,6 nm. A partir desse ponto não é mais observado nenhuma estruturação ordenada. Os dois picos entre 0,2-0,3 nm revela a existência de moléculas de água próximas de uma possível primeira esfera de coordenação do íon cobre. A integração desses dois picos revelou um número de coordenação de 2,287, o que pode ser interpretado como a coordenação média de duas moléculas de água. A figura 14 mostra uma ampliação dos dois primeiros picos de solvatação em torno do cobre, e uma representação da última estrutura gerada da dinâmica molecular de 500 ns.



**Figura 14.** Ampliação dos dois primeiros de picos de solvatação da função de distribuição radial  $\text{Cu}^{2+}\text{---H}_2\text{O}$ , os quais foram integrados para determinar o número de água diretamente coordenadas ao cobre. Em destaque é mostrado uma estrutura que mostra duas moléculas de água coordenadas ao cobre.



Fonte: Autores (2020).

As análises estruturais realizadas com a trajetória gerada da simulação de dinâmica molecular de 500 ns indicam que o sítio catalítico da pMMO é formado por um complexo mononuclear de cobre com a primeira esfera de coordenação composta pelos resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup>, His<sup>139</sup> e duas moléculas de água organizados numa estrutura octaédrica distorcida (Figura 13). Esse modelo difere do proposto por Ross e colaboradores (2019) apenas pela presença de mais uma molécula de água. Como já mencionado, Ross e colaboradores (2019) usaram recentemente espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica para investigar a natureza química do sítio da pMMO. Assim, a próxima etapa desse trabalho foi a realização de cálculos dos parâmetros de EPR do modelo proposto para em seguida realizar uma comparação com valores experimentais medidos por Ross e colaboradores (2019). Porém, nosso objetivo central é de alguma forma incluir, na determinação desses parâmetros, os efeitos da dinâmica estrutural da proteína influenciada também pelo meio solvente. Entretanto, é computacionalmente inviável a realização de cálculos quânticos para um conjunto enorme de

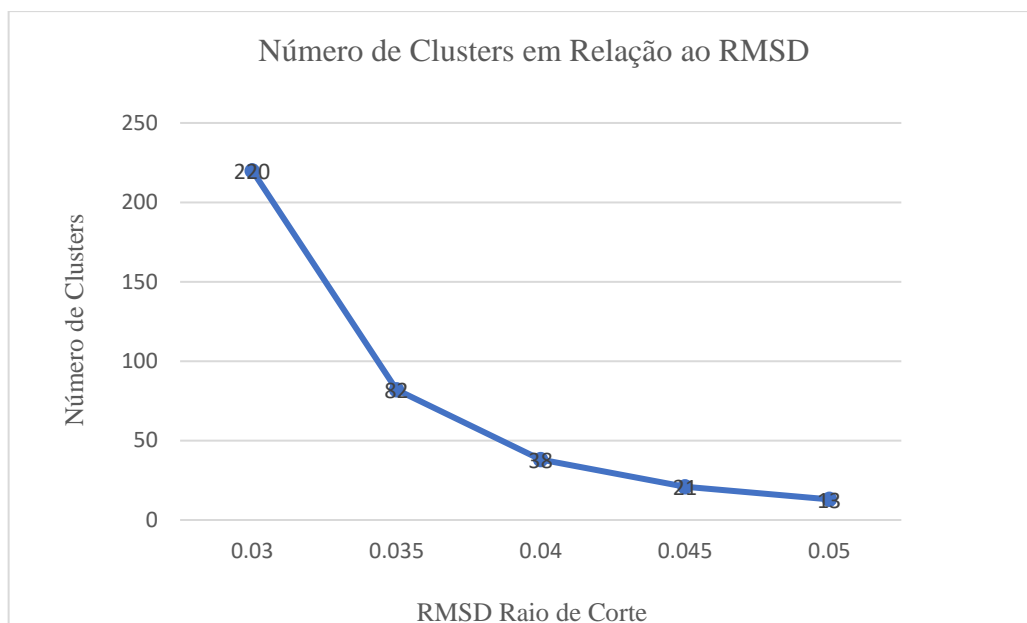
estruturas geradas da dinâmica molecular de 500 ns. Assim, com o objetivo de reduzir o número de estruturas, foi realizada uma seleção estatística das estruturas mais relevantes usando as bases o método de agrupamento de estruturas. Os detalhes e resultados dessa etapa estão descritos no próximo tópico.

## 5.2 ANÁLISE DE CLUSTER A PARTIR DOS ÚLTIMOS 50 ns

Neste tópico, é descrito a metodologia utilizada para selecionar estruturas médias que são representativas estatisticamente da dinâmica molecular de 500 ns. A análise foi realizada com 1.251 estruturas geradas nos últimos 50 ns da simulação de 500 ns.

Uma vez que foco central é a região do sítio ativo da pMMO, a análise de cluster foi limitada para a região contendo os resíduos que localizados numa esfera de raio 5 Å em relação ao íon cobre, que são os resíduos que podem ter contribuições mais importantes para o processo de catálise. Os resíduos selecionados foram: His<sup>33</sup>, Gly<sup>34</sup>, Glu<sup>35</sup>, His<sup>137</sup>, His<sup>139</sup> e duas moléculas de água (que durante a simulação permaneceram coordenadas ao átomo de cobre), não foram aplicadas restrições a nenhum dos átomos. Para essa análise foram escolhidos os raios de corte: 0,03 nm, 0,035 nm, 0,04 nm, 0,045 nm e 0,05 nm.

O método de cluster utilizado foi o método *Gromos*, formulado por Daura, *et. al* (1999) e Daura, Gunsteren e Mark (1999). Neste método, para encontrar grupos dentro de uma trajetória é selecionado um RMSD, e para cada RMSD, a estrutura com o maior número de “vizinhos” é tomada como o centro do cluster e, forma com esses vizinhos um (primeiro) cluster. As estruturas deste cluster foram posteriormente eliminadas do conjunto de estruturas total (pois já formou um cluster), a estrutura com a maioria desses vizinhos se torna o centro do segundo grupo de estruturas, as estruturas que pertencem ao segundo cluster também são removidas do grupo de estruturas total. O processo é repetido até que o conjunto de estruturas total pertença a um cluster (DAURA *et al.*, 1999; DAURA; VAN GUNSTEREN; MARK, 1999). Em termos mais simples, após essa análise há um agrupamento do maior número de possíveis estruturas em cada cluster, e o resultado gráfico que é obtido pode ser visualizado. Para cada um dos clusters formados é escrita uma estrutura média que é representativa para aquele cluster, estruturas que são energeticamente próximas umas das outras, sendo o primeiro cluster maior que os demais (mais populoso, com mais estruturas). Na figura 15, é mostrado o gráfico contendo o número de estruturas encontradas em relação a cada RMSD selecionado.

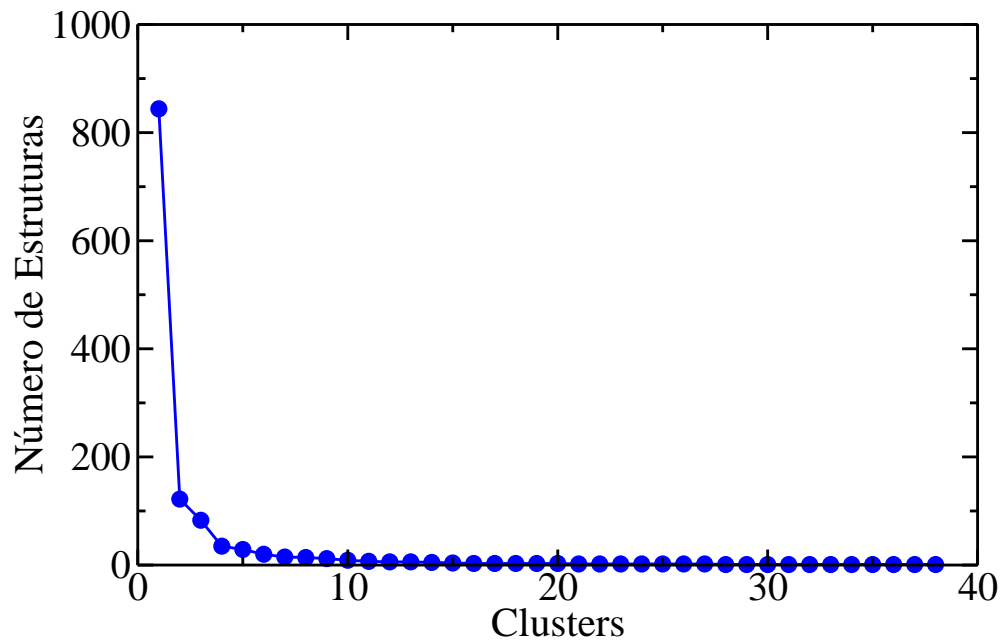
**Figura 15.** Número de clusters encontrados em relação ao RMSD selecionado.

Fonte: Autores (2020).

Os valores para o raio de corte precisam ser testados para que se escolha o melhor raio de corte, logo precisou-se testar vários raios de corte para a escolha do melhor. Os critérios propostos por Daura *et. al* (1999) e Singh, *et. al* (2017) para a escolha do melhor raio de corte estabelecem que um raio de corte satisfatório é aquele que leva em consideração que pelo menos 50% das estruturas estejam contidas em um único cluster e, que os clusters mais representativos (o que contenham mais estruturas), contenham pelo menos 80% de toda a trajetória e poucos clusters contenham apenas um membro. Dentro desses critérios, foi escolhido o raio de corte de 0,04 nm, o qual gerou um conjunto de 38 estruturas médias, as quais foram usadas como entrada para a realização dos cálculos dos parâmetros de EPR num esquema sequencial DM/DFT.

Na figura 16 é mostrado o gráfico que descreve o tamanho de cada cluster formado, ou seja, quantas estruturas são pertencentes a um determinado cluster (para o RMSD de 0.04 nm).

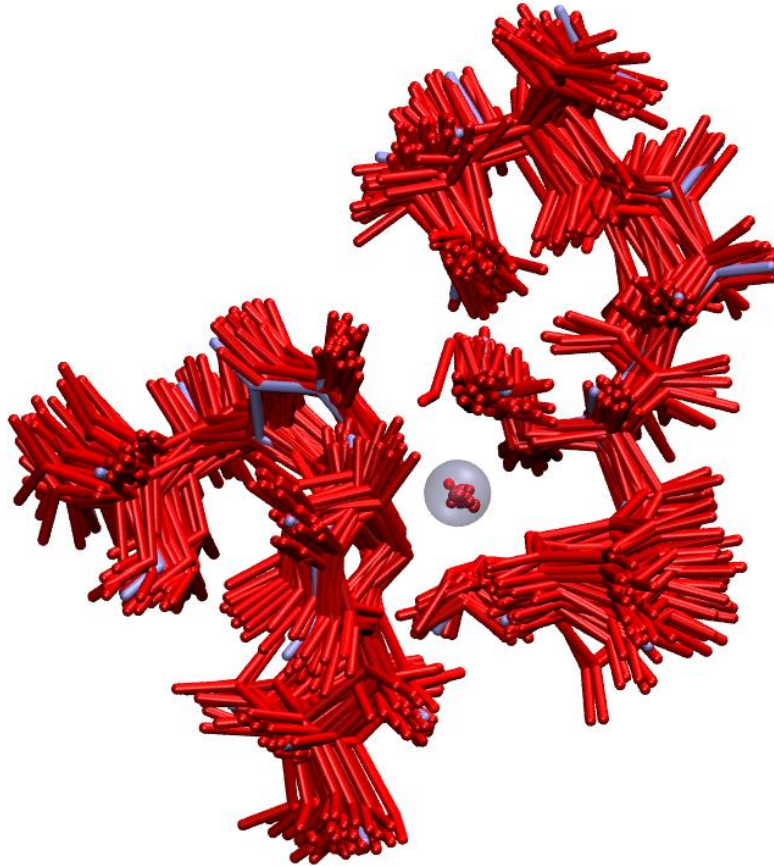
**Figura 16.** Tamanho de cada cluster para o RMSD de 0.04 nm.



Fonte: Autores (2020).

Cada ponto do gráfico da figura 16 corresponde a caracterização dos 38 aglomerados selecionados com o raio de corte do RMSD de 0,04 nm. Como pode ser observado, o primeiro cluster é o maior aglomerado em relação aos demais contendo aproximadamente 845 estruturas. Em sequência os aglomerados vão diminuindo em número de estruturas até o último conjunto formado por 1 estrutura. A figura 17 mostra uma sobreposição das 38 estruturas médias geradas da análise de cluster, bem como a estrutura média obtida a da média dessas 38.

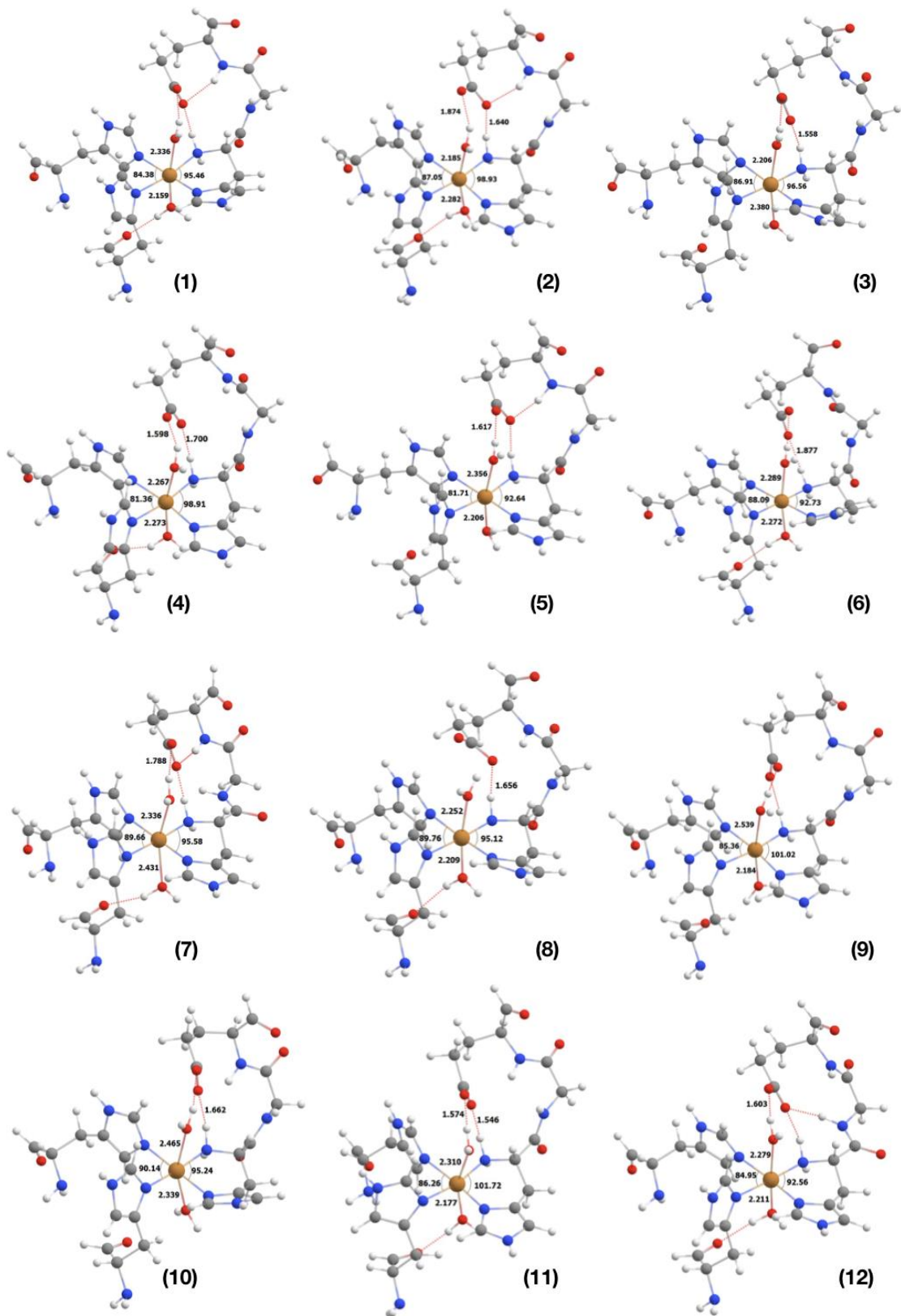
**Figura 17.** Representação das estruturas médias geradas da análise de cluster. Em lilás a estrutura obtida da média das 38 estruturas geradas da análise de cluster.



Fonte: Autores (2021).

A sobreposição das 38 estruturas médias geradas da análise de cluster fornece um indicativo da dinâmica estrutural na região do sítio ativo. A figura 18 mostra alguns parâmetros estruturais de 12 dessas 38 estruturas médias. As distâncias estão dadas em Angstrom e os ângulos em graus.

**Figura 18.** Doze estruturas médias geradas da análise de cluster feita com os últimos 50 ns da simulação de 500 ns.



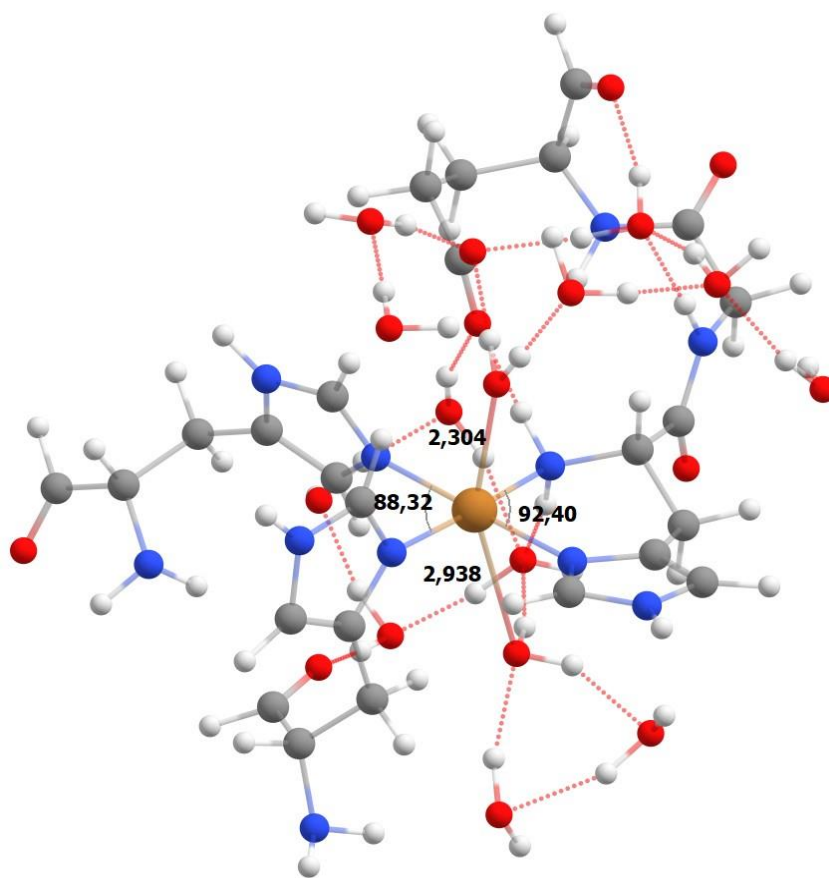
Fonte: Autores (2021).

A análise das dozes estruturas mostradas na figura 18, assim como as outras 26 que formam as 38 estruturas médias geradas da análise de cluster, mostra que o complexo de cobre do sítio da pMMO apresenta uma estrutura octaédrica distorcida principalmente no eixo axial, onde de acordo com os resultados da dinâmica molecular é ocupado por duas moléculas de água. É importante destacar que algumas dessas estruturas indicam que uma das moléculas de água apresentam uma coordenação mais frouxa ao íon cobre. Por exemplo, na estrutura 8 da figura 18 a distância do oxigênio de uma das águas para o cobre é de 2,54 Å. Em outros casos também é observado valores da distância  $d(\text{H}_2\text{O}---\text{Cu})$  na faixa de 2,40-2,80 Å. Como também pode ser visto nas estruturas mostradas na figura 18, o resíduo Glu35 interage fortemente via ligações de hidrogênio com uma das moléculas de água. Também é observado ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a cadeia lateral de alguns resíduos, como His<sup>33</sup> e His<sup>137</sup>. É importante destacar que a análise do número de moléculas de água num raio de 5 Å do íon cobre revelou que em média 10 moléculas de água acessam a região do sítio ativo. Dessa forma, o conjunto dessa rede cooperativa de ligações de hidrogênio juntamente com o considerável coeficiente de autodifusão da água em meio biológico, apontam para atestar a considerável dinâmica de moléculas de água na região do sítio ativo, justificando também a labilidade dessas moléculas de água coordenadas ao cobre. Assim, o conjunto desses fatores podem ajudar a explicar a proposta de Cao e colaboradores (2018) de que o sítio teria apenas uma molécula de água coordenada. Nesse estudo, os autores utilizaram a metodologia chamada refinamento quântico, onde é utilizado cálculos de química quântica para refinar dados cristalográficos, e a partir de um estudo sistemático considerando um conjunto de diferentes geometrias para complexos mono e dinucleares contendo uma ou duas moléculas de água, concluíram que a estrutura que melhor se ajusta aos dados cristalográficos é a de um sítio mononuclear de cobre com uma molécula de água extra coordenada.

Porém, uma possível limitação dessa proposta é o fato justamente de não ter sido levado em conta a dinâmica estrutural da proteína na presença do meio solvente. Assim, com base nos nossos resultados de dinâmica molecular, e também como será mostrado mais adiante suportados por cálculos DFT, sugerimos que exista uma alta possibilidade de que duas moléculas de água se coordene ao cobre, porém fatores como interações de ligações de hidrogênio entre moléculas de água, e delas com resíduos da primeira e segunda esfera de coordenação, bem como a própria capacidade de difusão da água, faz com que a sua coordenação ao centro de cobre apresente uma labilidade maior do que a observada, por exemplo, numa estrutura cristalográfica. E pensando em termos de mecanismo de ação essa labilidade passa a ter um papel importante no processo, pois é bem conhecido que a enzima só

catalisa metano na presença de oxigênio molecular, assim acreditamos que essa labilidade facilite a coordenação do O<sub>2</sub> ao cobre fazendo com que a reação de troca de ligante H<sub>2</sub>O por O<sub>2</sub> ocorra com uma barreira de ativação baixa. Vários estudos têm mostrado que ligações de hidrogênio também são dominadas por efeitos de natureza quântica (CHEN et al., 2003; LI; WALKER; MICHAELIDES, 2011; MORRONE; CAR, 2008; TRUHLAR, 2010). Dessa forma, decidimos avaliar o que alguns desses efeitos provocaria na estrutura do sítio ativo da pMMO. Então, foi realizado um cálculo de otimização de geometria ao nível B97-D3/def-SVP usando como estrutura de partida uma estrutura obtida da média das 38 geradas da análise de cluster. Além das duas moléculas de água coordenadas diretamente ao cobre, neste modelo também foi incluído no cálculo quântico as moléculas de água localizadas num raio de 5 Å em relação ao íon cobre. Isso foi feito para tentar captar a contribuição da rede de ligações de hidrogênio das águas próximas da região do sítio ativo. A estrutura obtida está mostrada na figura 19.

**Figura 19:** Geometria otimizada ao nível B97-D3/SVP do modelo contendo os resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup>, His<sup>139</sup>, Gly<sup>34</sup> e Glu<sup>35</sup>, e as moléculas de água contidas numa esfera de raio 5 Å em relação ao íon cobre.



Fonte: Autores (2021).



Como pode ser visto na figura 19, a estrutura obtida ao nível UB97-D3/SVP também é caracterizada como uma estrutura octaédrica distorcida com o eixo axial desviando cerca de 20° do valor ótimo de 180°. Os resultados dessa análise também indicam que a água oposta ao Glu<sup>35</sup> deva ser a mais lábil, uma vez que a distância para o íon cobre é consideravelmente maior do que a da molécula de água que forma ligação de hidrogênio com o Glu<sup>35</sup>. Isso sugere que este seja o canal cineticamente preferencial para a entrada da molécula de O<sub>2</sub> que corresponde a primeira etapa do ciclo catalítico da pMMO.

### 5.3 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE RPE PARA O SÍTIO MONONUCLEAR DE COBRE DA pMMO.

Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE ou do inglês *EPR-Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*), é uma técnica de ressonância que envolve transições que são induzidas por radiação na faixa de micro-ondas. Essa técnica é utilizada para obter informações de sistemas químicos que possuem elétrons desemparelhados, e por isso é de grande importância na caracterização de compostos de coordenação contendo íons de metais de transição (HOUSECROFT; SHARPE, 2012). O espectro de RPE é medido numa frequência fixada na região de micro-ondas e variando o campo magnético. Moléculas com elétrons desemparelhados possuem um dipolo magnético spin resultante. Na presença de um campo magnético  $H$ , a existência de um dipolo magnético do spin gera uma energia potencial de interação dada pela equação 16.

$$\Delta E_{mag} = g_j \mu_B M_j \cdot H \quad (16)$$

Onde  $g_j$  é chamado fator de Landé. O fator de Landé pode ser estimado de maneira aproximada pela equação 17:

$$g_j = 1 + \frac{J(J + 1) + S(S + 1) - L(L + 1)}{2J(J + 1)} \quad (17)$$

Onde  $J$  é o número quântico que mede o acoplamento spin-órbita,  $S$  é o número quântico total de spin e  $L$  é número quântico de momento angular. Para um elétron livre  $g = g_e = 2,0023193 \sim 2,00$ . Porém, na maior parte de situações práticas os elétrons não estão isolados, mas sim em moléculas e, assim como a componente de spin eles também sempre apresentam uma

componente orbital. Dessa forma, dependendo do tipo de orbital no qual o elétron está “localizado”, ele irá ressonar com um valor de  $g$  diferente do  $g_e$  do elétron livre. Assim, o valor do parâmetro  $g$  fornece informações estruturais através da componente orbital. (HAGEN, 2008; HOUSECROFT; SHARPE, 2012; JASNIEWSKI; HU; RIBBE, 2018). A diferença entre  $g$  e  $g_e$  é muito pequena para radicais orgânicos livres, mas pode ser significativa no caso de compostos paramagnéticos de íons de metais de transição, por isso essa técnica tem sido fundamental na caracterização de sistemas inorgânicos. Principalmente na caracterização de centros catalíticos de metaloenzimas que possuem íons de metais de transição (ABDULLIN; SCHIEMANN, 2020).

Na tabela 3, são mostrados os valores de  $g$  para diferentes metais e seus respectivos estados de oxidação e exemplos de onde podem ser encontrados estes metais em metaloproteínas/metaloenzimas.

**Tabela 3.** Valores de  $g$  para íons de metaloproteínas/metaloenzimas.

Íon Metálico	Spin	Exemplo	Valor de $g$ / intervalo
$\text{Fe}^{3+}$	$1/2$	Ferredoxinas (reduzida)	2.2-1.6
$\text{Co}^{2+}$	$1/2$	Cobalamina (vitamina $\text{B}_{12r}$ )	2.0-2.3
$\text{Cu}^{2+}$	$1/2$	Ceruloplasmina	2.02-2.3
$\text{Mo}^{5+}$	$3/2$	Nitrogenase	4.3-1.9

Fonte: Adaptado de Fee (1978).

O uso do Hamiltoniano efetivo de spin,  $\hat{H} = g\mu_B H \hat{S}$ , assume que  $g$  é uma matriz simétrica (3x3) (GISPERT, 2008). O Hamiltoniano deve ser escrito como:

$$\hat{H} = \mu_B [S_x S_y S_z] \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \end{bmatrix} \quad (18)$$

Para simplificar o tratamento matemático do tensor da equação 18, é feito um procedimento de diagonalização que transforma a matriz em:

$$\begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (19)$$

O que reduz o problema ao tratamento de apenas três valores de  $g$ :  $g_x$ ,  $g_y$  e  $g_z$ . Quando os três valores de  $g$  são diferentes se tem o caso de anisotropia total. Já quando a anisotropia é apenas axial (direção  $z$ )  $g_x = g_y \neq g_z$  com  $g_x = g_y = g_{\perp}$ , e  $g_z = g_{\parallel}$ . Este último caso é o mais frequentemente observado, por exemplo, em complexos de cobre.

Com o objetivo de auxiliar na interpretação dos dados de EPR determinados experimentalmente, e de avaliar a validade do modelo químico do sítio da pMMO proposto nesse trabalho a partir de simulação de dinâmica molecular, foram realizados cálculos dos parâmetros de EPR considerando as 38 estruturas médias obtidas da análise de cluster apresentada e discutida na seção anterior. Os cálculos de EPR, foram realizados utilizando os funcionais de troca-correlação: B3LYP, BHANDHLYP e revPBE. Um outro objetivo específico desse estudo foi avaliar o desempenho de diferentes funcionais de troca-correlação da DFT na determinação de parâmetros de parâmetros de EPR desse tipo de sistema bioinorgânico. Os resultados obtidos para as 38 estruturas geradas da análise de cluster (ver figura 17) estão apresentados nas figuras 20, 21 e 22. As tabelas com todos os valores usados para construir os gráficos das figuras 20, 21 e 22 estão apresentadas nos Apêndices **F**, **G** e **H**.

Os resultados obtidos quando comparados com a faixa de valores para o valor de  $g$  na tabela 3, eles estão dentro dos valores que são observados em outras metaloproteínas que contêm cobre. A análise do espectro de EPR medido por Ross e colaboradores (2019) para a pMMO (*M. capsulatus* (Bath)) revelou que o sítio de Cu (II) da subunidade pmoB é caracterizado pelos seguintes valores do parâmetro  $g = [2,035, 2,068, 2,242]$ , o que caracteriza que o íon cobre (II) está num ambiente com anisotropia. Os resultados apresentados nas tabelas dos Apêndices **F**, **G** e **H** reproduzem essa anisotropia. Os resultados experimentais de EPR também mostraram que o eixo axial ( $z$ ) tem um valor de  $g$  consideravelmente diferente dos eixos equatoriais ( $x$  e  $y$ ). Isso é um indicativo de que a natureza química do ligante axial é diferente dos ligantes equatoriais. De fato, no modelo aqui proposto a base equatorial é formada por ligantes nitrogenados e o eixo axial pelos átomos de oxigênio das duas águas coordenadas. Em termos quantitativos, todos os funcionais avaliados nesse estudo reproduzem de modo satisfatório o parâmetro  $g$  da base equatorial ( $g_x$  e  $g_y$ ). Entretanto, com relação ao  $g$  axial o funcional BHANDHLYP (Figura 22) é o que melhor reproduz o valor experimental.

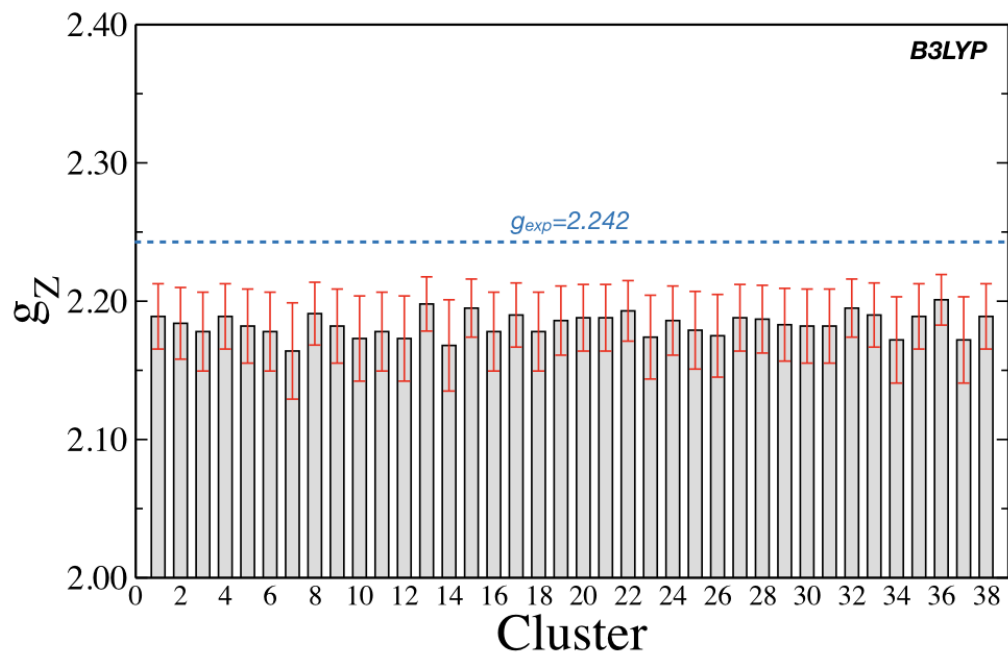
Para o caso do  $g$  axial ( $g_z$ ), considerando os três funcionais testados, apresentamos os resultados nas figuras 20, 21 e 22. Nas figuras, também estão apresentados os erros relativos para os valores calculados para cada um dos 38 frames com os três funcionais utilizados.

Para o cálculo do erro relativo, foi considerada a diferença entre o valor calculado e o valor experimental, como apresentado na equação 20.

$$E_R = \frac{(|V_c - V_e|)}{V_e} \quad (20)$$

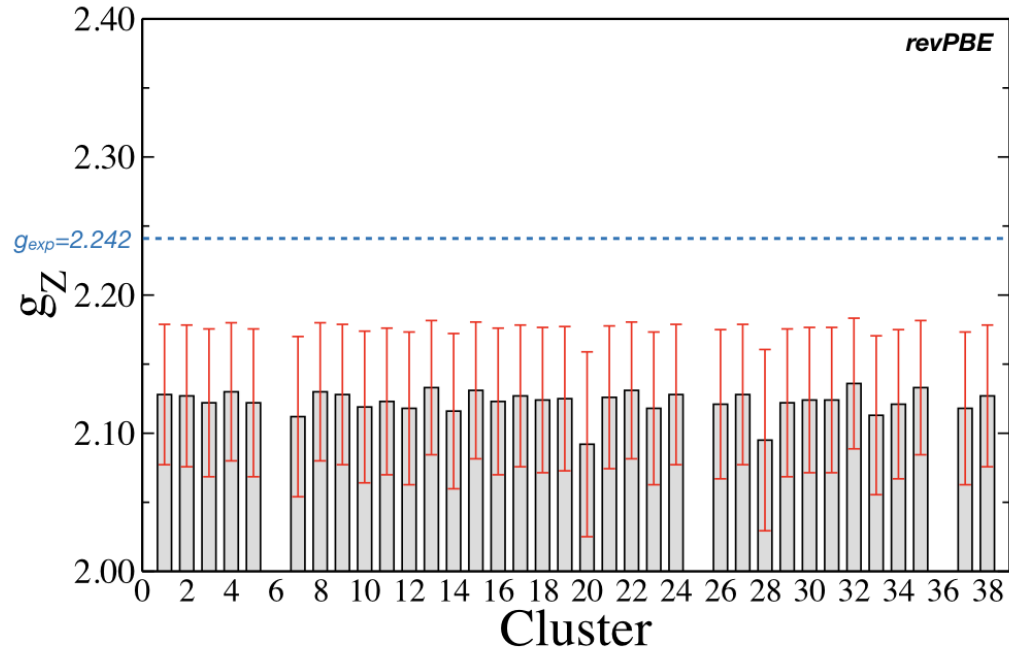
Onde  $E_R$  representa o erro relativo,  $V_c$  representa o valor calculado e  $V_e$ , representa o valor experimental. Para representar o erro percentual, basta que se multiplique o resultado por 100%.

**Figura 20.** Valores calculados para  $g_z$ , considerando o funcional B3LYP e o erro relativo associado a cada frame.



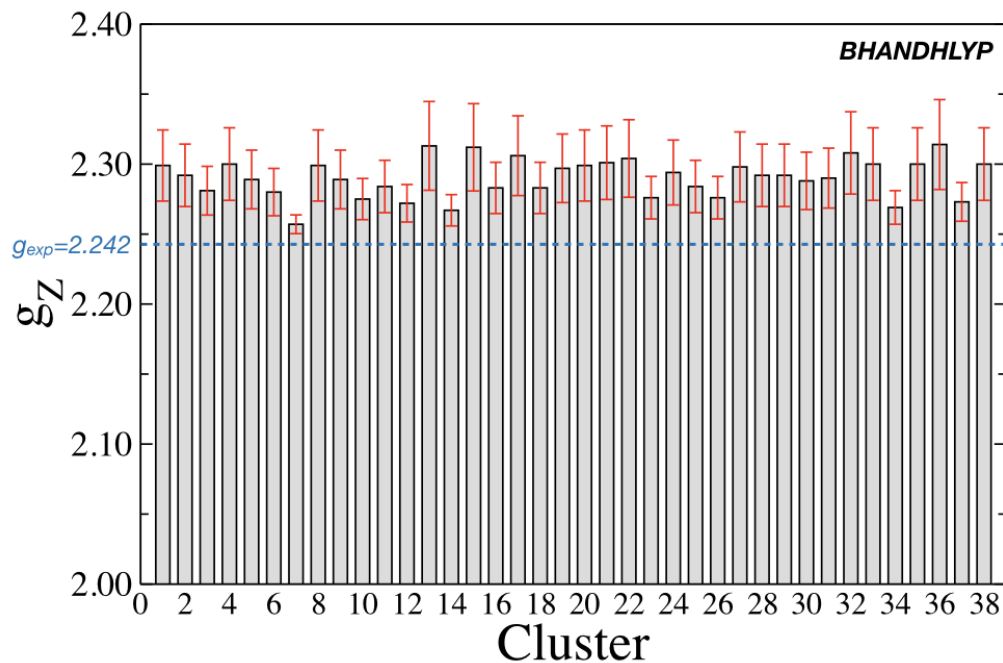
Fonte: Autores (2021).

**Figura 21.** Valores calculados para  $g_z$ , considerando o funcional revPBE e o erro relativo associado a cada frame.



Fonte: Autores (2021).

**Figura 22.** Valores calculados para  $g_z$ , considerando o funcional BHANDHLYP e o erro relativo associado a cada frame.



Fonte: Autores (2021).

Os dados do gráfico da figura 20 (que representa os valores de  $g_z$  calculados utilizando o funcional B3LYP), mostram que o funcional B3LYP subestima o valor experimental. De toda forma, considerando o módulo do erro relativo calculado, o erro associado em relação ao valor experimental varia entre 1,80-3,50%, o que mostra que este funcional descreve de maneira satisfatória o parâmetro  $g_z$ . O funcional revPBE (ver gráfico da figura 21) também, assim como o B3LYP, subestima o valor experimental de  $g_z$ . Porém, neste caso os valores calculados desviam consideravelmente do valor experimental, com erros entre 4,73% e 9,90% (erro também calculado em módulo), que já representa um aumento considerável quando comparado ao funcional B3LYP. Vale destacar que para o caso do revPBE, os cálculos dos frames 6 e 25 não convergiram, e desta forma não estão apresentados na figura 21.

Ao contrário do observado nos valores calculados com os funcionais B3LYP e revPBE, os resultados obtidos com o funcional BHANDHLYP (figura 22) superestimam o valor experimental. O erro relativo calculado para os resultados obtidos com funcional BHANDHLYP varia entre 0,67% e 3,21%, o que corresponde a menor faixa de erro dentre os funcionais avaliados. Vale destacar que valores calculados com o BHANDHLYP para alguns frames (por exemplo, frames 7, 14 e 34) praticamente reproduz exatamente o valor experimental. De modo geral, a análise dos resultados obtidos para o fator  $g_z$  mostram basicamente dois pontos importantes: (i) funcionais híbridos contendo termo de troca Hartree-Fock (B3LYP e BHANDHLYP) são mais adequados que funcionais puros (revPBE) para o cálculo de  $g_z$ . Obviamente, que para uma afirmação mais ampla seria necessário avaliar uma classe maior de funcionais de ambas naturezas, porém os resultados aqui obtidos estão em linha com o que vem sendo observado em estudos sobre cálculos de parâmetros de ERP em sistemas inorgânicos (AMES; LARSEN, 2009, 2010; NEESE, 2009; ORIO; PANTAZIS, 2021); (ii) Dentre os funcionais estudados, o BHANDHLYP é o que apresenta menor erro relativo em relação ao valor experimental.

O valor exato do parâmetro  $g$  depende consideravelmente do ambiente químico local do elétron desemparelhado. Isso significa que a frequência exata da ressonância de absorção depende de cada sistema molecular. Os núcleos também possuem spin, assim existe uma interação, ou acoplamento, entre o spin dos elétrons desemparelhados e o spin do núcleo, chamado  $I$ . Assim, o Hamiltoniano total de spin é dado por:

$$\hat{H} = g\mu_e H \hat{S} - g_n \mu_n H \hat{I} + A \hat{S} \cdot \hat{I} \quad (21)$$

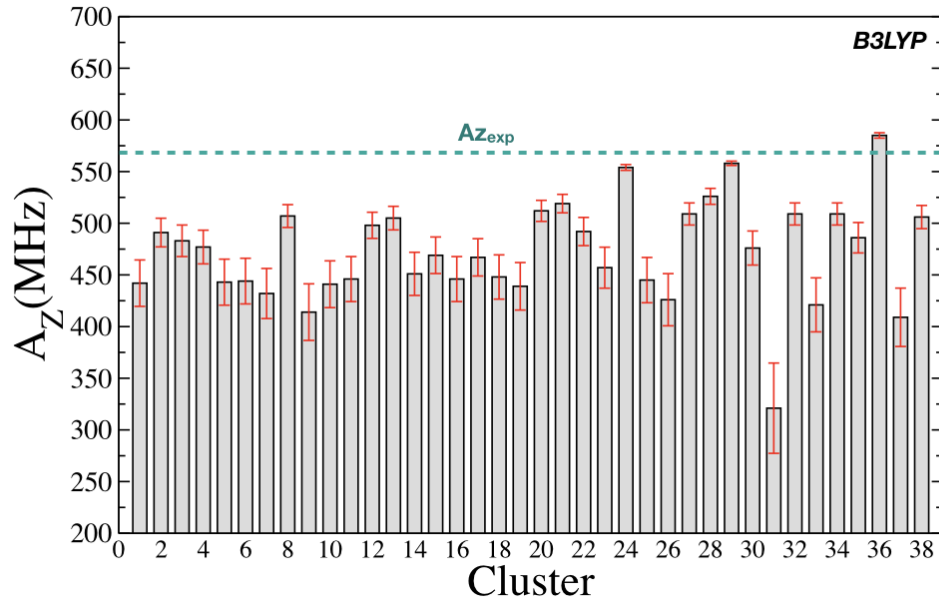
Onde os primeiros dois termos contabilizam as interações Zeeman eletrônica e nuclear, respectivamente. O terceiro termo descreve o acoplamento dos momentos de spin do elétron e do núcleo, onde  $A$  representa a constante de acoplamento elétron-núcleo também chamada de constante de acoplamento hiperfino. A constante de acoplamento hiperfino é uma quantidade relacionada com a probabilidade finita de um encontrar o elétron desemparelhado sobre um dado núcleo através da equação 22.

$$A = A_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \mu_e g_n \mu_n |\Psi_0|^2 \quad (22)$$

Onde  $|\Psi_0|^2$  é o quadrado do valor da função de onda do elétron desemparelhado avaliado no volume do núcleo (GISPERT, 2008). Dessa forma, a constante de acoplamento hiperfino é uma quantidade bastante útil no espectro de EPR porque pode trazer informações sobre em que átomo ou átomos o elétron desemparelhado está “localizado”.

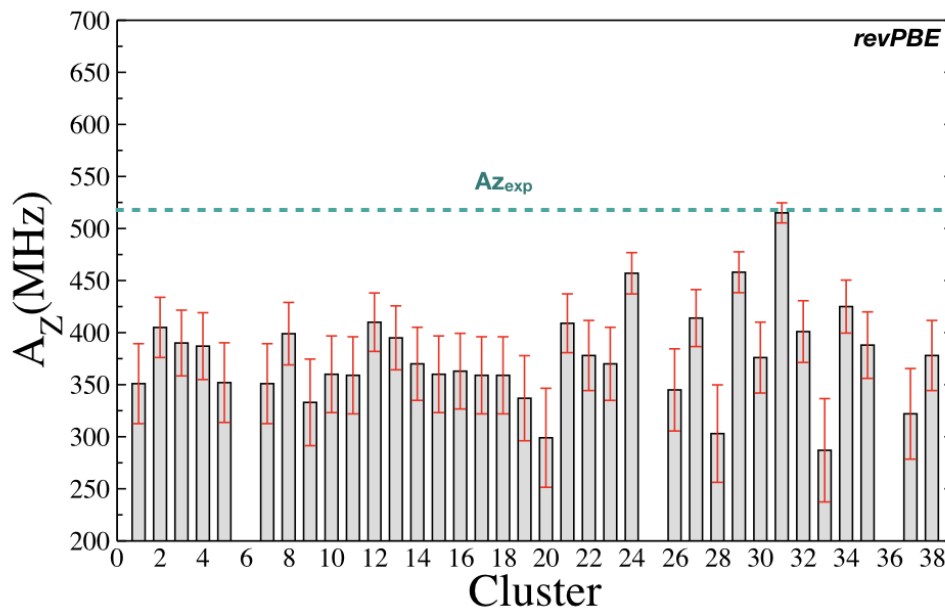
O estudo experimental de Ross e colaboradores (2019) determinou que a constante de acoplamento hiperfino ( $A_z$ ) do íon cobre é  $A_z = 570$  MHz ou  $190 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . Os valores de  $A_z$  foram calculados para cada frame utilizando também os funcionais: B3LYP, revPBE e BHANDHLYP, os resultados estão exibidos nas figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

**Figura 23.** Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino ( $A_z$ ) para o funcional B3LYP e o erro associado a cada frame.



Fonte: Autores (2021).

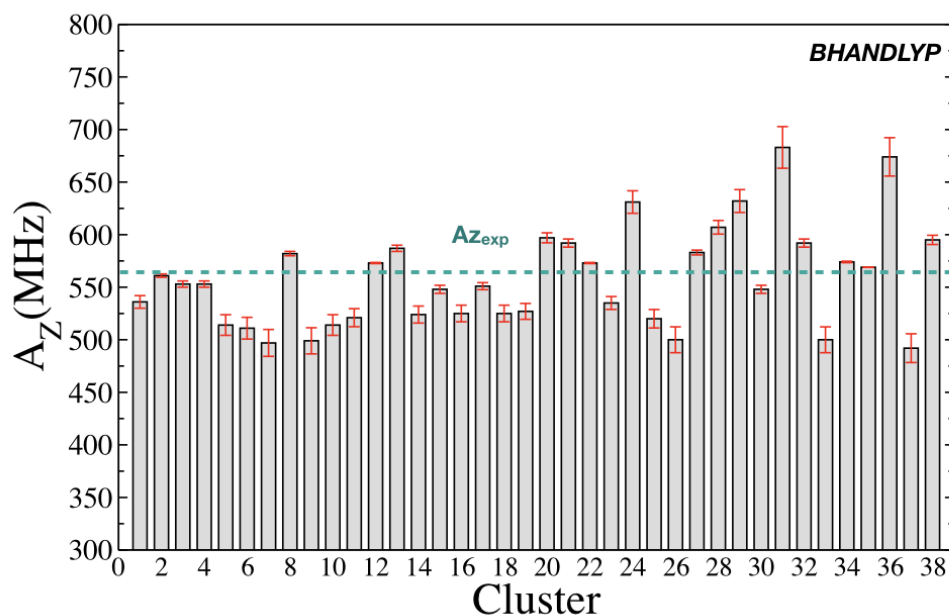
**Figura 24.** Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino ( $A_z$ ) para o funcional revPBE e o erro associado a cada frame.



Fonte: Autores (2021).



**Figura 25.** Resultado do cálculo de acoplamento hiperfino ( $A_z$ ) para o funcional BHANDHLYP e o erro associado a cada frame.



Fonte: Autores (2021).

Como já mencionado, a constante de acoplamento hiperfino é um parâmetro mais sensível do que o fator  $g$  em relação a natureza do ambiente químico onde o ocorre a maior probabilidade de se encontrar o elétron desemparelhado. Assim, é de se esperar que o cálculo de parâmetro seja também mais sensível ao nível/método de cálculo. Os resultados mostrados nas figuras 23, 24 e 25 comprovam isso. Ao contrário do observado nos resultados para  $g_z$ , onde os valores calculados para cada frame variam pouco, os valores de  $A_z$  variam razoavelmente de frame pra frame. Isso independente do funcional. Também pode observado que o erro relativo calculado para  $A_z$  é consideravelmente maior do que o obtido para  $g_z$ . Novamente independente do funcional. Em termos quantitativos, os erros relativos calculados com os três funcionais considerando as 38 estruturas geradas da análise de cluster variam nas seguintes faixas: BHANDHLYP (0,2-20,0%); B3LYP (2,0-44,0%) e revPBE (10,0-87,0%). Assim como o visto nos valores obtidos para o fator  $g_z$ , os funcionais híbridos apresentam melhores resultados do que os obtidos com o funcional puro revPBE, com o funcional BHANDHLYP apresentando o melhor desempenho dentre os funcionais utilizados. Vale destacar que para os frames 2, 3, 4, 13, 22, 34 e 35, os valores calculados com o BHANDHLYP praticamente reproduzem exatamente o valor experimental. Dessa forma, o conjunto dos resultados aqui obtidos indicam que o melhor funcional para descrição dos parâmetros de EPR do sistema investigado é o

funcional BHANDHLYP. Esse resultado pode servir de base para estabelecer uma metodologia para o estudo de espectro de EPR de complexos de cobre presentes em sistemas biológicos.

Em estudos de EPR é comum se avaliar a razão entre o valor do parâmetro  $g_z$  e o valor da constante de acoplamento para se obter informações estruturais em torno de um dado átomo. No trabalho de Ross e colaboradores (2019), de posse desse valor de  $A$  e do parâmetro  $g_z$  foi determinado uma razão  $g_z/A_z$  de  $\sim 118$  cm, o que a partir de comparações com outros estudos levou os autores a concluir que esse valor indica que o íon cobre (II) da pMMO possui um ambiente de coordenação equatorial altamente plano<sup>5</sup>, o que está em acordo com as estruturas médias da análise de cluster obtidas dos últimos 50 ns da dinâmica molecular de 500 ns (ver figura 18). Essa questão da estrutura plana da base equatorial do sítio de cobre da pMMO revelada por essas medidas de EPR também serve para validar qualidade dos parâmetros do pseudo-átomo de cobre desenvolvido por Liao, Kamerlin e Strodel (2015) e que foram usados nesse trabalho. Uma vez que o funcional BHANDHLYP foi o que forneceu a melhor descrição dos parâmetros  $g_z$  e  $A_z$  em comparação com o experimento, calculamos a média do valor de da razão  $g_z/A_z$  para compararmos com o resultado experimental. Considerando os resultados obtidos para as 38 estruturas da análise de cluster, calculou-se o valor médio da razão  $g_z/A_z$  e foi obtido um valor de  $124 \text{ cm} \pm 7,00$  (considerando a média de todos os frames), o que representa um ótimo acordo com o valor determinado experimentalmente (118 cm). Os valores dessa razão para os outros funcionais estão mostrados nos apêndices deste trabalho (apêndices **F**, **G** e **H**). Por fim, comparamos o valor médio dos parâmetros de EPR obtido a partir dos valores calculados com o funcional BHANDHLYP para as 38 estruturas da análise de cluster realizada com a trajetória dos últimos 50 ns da simulação de 500 ns, com os valores obtidos a partir da geometria otimizada ao nível UB397-D3/SVP (ver figura 19). Os valores obtidos, ao nível BHANDHLYP/Def2-TZVP, de  $g_z$  e  $A_z$  a partir da geometria otimizada da figura 19 foram 2,294 e 490,0 MHz, respectivamente. Esses valores estão em muito bom acordo com os valores médios de  $2,290 \pm 0,021$  e  $557 \pm 7,0$  MHz calculados com base nas 38 estruturas médias da análise de cluster. A constante de acoplamento hiperfino é uma grandeza bastante sensível ao ambiente químico, por isso acreditamos que a principal razão para a diferença entre o valor de  $A_z$  médio das 38 estruturas da análise de cluster e o calculado com base na geometria otimizada via DFT se deva ao fato de que a estrutura DFT foi obtida considerando as 10 moléculas de água que a análise da trajetória da dinâmica molecular revelou ser o número médio de moléculas

---

<sup>5</sup> Os valores da razão  $g_z/A_z \approx 105 - 135 \text{ cm}$ , indicam ambiente de coordenação quadrado plano (PATEL et al., 2009; POGNI et al., 2000).

de água que acessam uma região de 5 Å do íon cobre da pMMO, e a as estruturas da análise de cluster só levou em conta as duas moléculas diretamente coordenadas ao cobre.

Dessa forma, os resultados estruturais e eletrônicos aqui obtidos, e comparados com dados experimentais, fornecem boas bases para propor que o sítio catalítico da pMMO seja um complexo mononuclear de cobre coordenado pelos resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup> na base equatorial, e por duas moléculas de água no eixo axial, sendo uma dessas moléculas de água mais lábil o que pode sugerir uma coordenação mais frouxa ao íon cobre fazendo com o que ao longo do tempo, sob presença de meio solvente, o sítio da pMMO alterne entre uma estrutura octaédrica distorcida e uma estrutura piramidal de base quadrada com coordenação 5.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram investigadas as propriedades estruturais e eletrônicas da parte solúvel da forma particulada da enzima pMMO, a fim de compreender melhor a composição química da região do sítio catalítico da pMMO, incluindo a possibilidade da presença de moléculas de água, uma vez que sítio ativo está localizado numa região da proteína exposta ao solvente. O estudo foi realizado a partir da realização de simulações clássicas de dinâmica molecular e cálculos de química quântica utilizando a teoria do funcional da densidade.

A análise da variação da distância entre o Glu<sup>35</sup> e o centro de cobre, feita sobre os últimos 50 ns da simulação de 500 ns, mostrou que esse resíduo não deve compor a primeira esfera de coordenação do íon Cu (II), como proposto em outros trabalhos teóricos. A distância média calculada entre o grupo COO<sup>-</sup> e o Cu<sup>2+</sup> foi aproximadamente 4 Å durante a simulação de dinâmica molecular. A análise estrutural revelou que a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio do grupo COO<sup>-</sup> do Glu<sup>35</sup> com moléculas de água, e com outros resíduos próximo a ele, dificulta a sua coordenação ao íon cobre.

Também foi verificado o número médio de moléculas de água a 5 Å de distância do centro de cobre, com intuito de verificar a possibilidade de moléculas de água na primeira e segunda esferas de coordenação. Os resultados da análise dos últimos 50 ns de simulação revelou que em média 10 moléculas de água ocupam a região próxima a 5 Å do cobre. O cálculo da função de distribuição radial para o par Cu (II)-H<sub>2</sub>O e a integração dos dois primeiros picos de solvatação, revelou que duas moléculas de água ocupam a primeira esfera de coordenação do cobre junto com os resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup>. Até onde é de nosso conhecimento, esse é o primeiro modelo a propor a presença de duas moléculas de água coordenadas ao cobre.

Para que pudesse ser feito o estudo das propriedades eletrônicas do sítio ativo da pMMO, foi realizada uma análise estatística nos últimos 50 ns de simulação para selecionar as estruturas mais relevantes. Essa análise gerou um conjunto de 38 estruturas médias que foram usadas como entrada para a realização de cálculos dos parâmetros de EPR do complexo de cobre. Os resultados obtidos para a determinação do parâmetro  $g$  mostraram que os três funcionais utilizados (B3LYP, BHANDHLYP e REVPBE) reproduzem a anisotropia observada experimentalmente na medida do espectro de EPR da pMMO. Em termos quantitativos, todos os funcionais avaliados nesse estudo reproduziram de modo satisfatório o parâmetro  $g$  da base equatorial ( $g_x$  e  $g_y$ ). Entretanto, com relação ao  $g$  axial o funcional BHANDHLYP é o que melhor reproduziu o valor experimental. Tomando como base as 38 estruturas da análise de cluster, foi calculado o valor médio da razão  $g_z/A_z$  com funcional

BHANDHLYP, e foi obtido um valor de aproximadamente 124 cm, o qual está em ótimo acordo com o valor determinado experimentalmente (118 cm).

A comparação dos resultados aqui obtidos com dados experimentais recentes, principalmente dados de EPR, sugerem que o sítio catalítico da pMMO seja um complexo mononuclear de cobre coordenado pelos resíduos His<sup>33</sup>, His<sup>137</sup> e His<sup>139</sup> na base equatorial, e por duas moléculas de água no eixo axial, sendo uma dessas moléculas de água mais lábil do que a outra, o que gera uma coordenação mais frouxa ao íon cobre fazendo com o que ao longo do tempo, sob presença de meio solvente, o sítio da pMMO possa alternar entre uma estrutura octaédrica distorcida e uma estrutura piramidal de base quadrada com coordenação 5. Essa proposta pode ajudar na compreensão detalhada da primeira etapa do ciclo de ação da enzima, a qual envolve a coordenação e ativação da molécula de oxigênio para gerar a espécie catalítica ativa capaz de oxidar o metano.

Como principal perspectiva desse trabalho tem-se a ideia de utilizar o modelo elaborado aqui a partir da dinâmica molecular e cálculos DFT, e utilizar métodos híbridos do tipo QM/MM para investigar a reação de oxidação do metano, levando em consideração as principais etapas do mecanismo da reação, com a adequada caracterização de intermediários e estados de transição, a fim de elaborar o perfil cinético e termodinâmico da reação.

## REFERÊNCIAS

- ABASCAL, J. L. F.; VEGA, C. A general purpose model for the condensed phases of water: TIP4P/2005. **Journal of Chemical Physics**, v. 123, n. 23, p. 1–12, 2005.
- ABDELRAHEEM, E. M. M.; et al. Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 1878-1894, 2019.
- ABDULLIN, D.; SCHIEMANN, O. Localization of metal ions in biomolecules by means of pulsed dipolar EPR spectroscopy. **Dalton Transactions**, 2020.
- ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multilevel parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ADAMS, J. P. et al. Biocatalysis: A Pharma Perspective. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 361, n. 11, p. 2421–2432, 2019.
- ALLINGER, N. L.; YUH, Y. H.; LII, J.-H. Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 23, p. 8551–8566, 1989.
- AMES, W. M.; LARSEN, S. C. DFT calculations of the EPR parameters for Cu(ii) DETA imidazole complexes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 37, p. 8266–8274, 2009.
- AMES, W. M.; LARSEN, S. C. DFT Calculations of EPR Parameters for Copper(II)-Exchanged Zeolites Using Cluster Models. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 1, p. 589–594, 2010.
- ANTONY, J.; GRIMME, S. Density functional theory including dispersion corrections for intermolecular interactions in a large benchmark set of biologically relevant molecules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 45, p. 5287–5293, 2006.
- BALASUBRAMANIAN, R. et al. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. **Nature**, v. 465, n. 7294, p. 115–119, 2010.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, p. 3098–3100, 1988.

BECKER, O. M.; WATANABE, M. **Computational Biochemistry and Biophysics**. New York: CRC Press, v. 1, 2001.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.

CARVALHO, A. T. P. et al. Challenges in computational studies of enzyme structure, function and dynamics. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 54, p. 62–79, 2014.

CHEN, B. et al. Hydrogen bonding in water. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 21, p. 1–4, 2003.

COOPER, G. M. ; HAUSMAN, R. E. **The Cell. A molecular approach**. [s.l: s.n.]. v. 4.

CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **J. Am. Chem. SOC.**, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, 1995.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models**. [s.l: s.n.]. v. 43, 2003.

DA SILVA, J. C. S. et al. DFT Study of the Full Catalytic Cycle for the Propene Hydroformylation Catalyzed by a Heterobimetallic HPt(SnCl<sub>3</sub>)(PH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Model Catalyst. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1986–2000, 2010.

DA SILVA, J. C. S. Estudo Computacional da Reação de Ativação da Ligação C-H de

Alcanos Catalisada por Compostos de Platina em Solução e pela Enzima pMMO. **Tese (Doutorado em Química)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 122, 2013.

DA SILVA, J. C. S. et al. A radical rebound mechanism for the methane oxidation reaction promoted by the dicopper center of a pMMO enzyme: A computational perspective. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 6, p. 2492-2504, 2016

DAURA, X. et al. Peptide folding: When simulation meets experiment. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 38, n. 1-2, p. 236-240, 1999.

DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Folding-unfolding thermodynamics of a  $\beta$ -heptapeptide from equilibrium simulations. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 34, n. 3, p. 269-280, 1999.

DIAS, R. P. Investigação Teórica de Processos Catalíticos Homogêneos Promovidos por Compostos Organometálicos. **Tese (Doutorado em Química)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 171, 2012.

DUARTE, F. et al. Force Field Independent Metal Parameters Using a Nonbonded Dummy Model. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, p. 4351-4362, 2014

DUARTE, H. A. Chemical reactivity indexes from density functional theory: Formalism and perspectives. **Quimica Nova**, v. 24, n. 4, p. 501-508, 2001.

FEE, J. A. Transition Metal Electron Paramagnetic Resonance Related to Proteins. In: HIRS, C. H. W.; TIMASHEF, S. N. (org) **Methods in Enzymology**. 1978, p. 512-528.

FRENKEL, D. et al. **Understanding molecular simulation: from algorithms to applications**. San Diego: Academic Press, 2001.

GABBA, M. et al. Conformational state distributions and catalytically relevant dynamics of a hinge-bending enzyme studied by single-molecule fret and a coarse-grained simulation.



**Biophysical Journal**, v. 107, n. 8, p. 1913–1923, 2014.

GISPERT, J. R. **Coordination Chemistry**. Wiley, 2008.

GOERIGK, L.; GRIMME, S. A thorough benchmark of density functional methods for general main group thermochemistry, kinetics, and noncovalent interactions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 14, p. 6670–6688, 2011.

HAGEN, W. R. **Biomolecular EPR spectroscopy**. Boca Raton: CRC Press, [s.n.], 2009.

HARVEY, J. N. On the Accuracy of Density Functional Theory in Transition Metal Chemistry. **Annual Reports Section C: Physical Chemistry**, v. 102, p. 1–23, 2006.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic Bacteria. **Microbiological reviews**, v. 60, n.2, p. 439–471, 1996.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas\*. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 1964.

HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2239–2314, 1996.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions William. **Physical Review A**, v. 31, p. 1695–1697, 1985.

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. G. **Inorganic Chemistry, Fourth Edition**. Pearson, 2012.

HUGGINS, D. J. et al. Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2019.

ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis: Principles and applications**. [s.l: s.n.].

IUBMB. International Union of Biochemistry. 1981. Disponível em: <

<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/kinetics/> >. Acesso em: 11 jan. 2021.

JASNIEWSKI, A.; HU, Y.; RIBBE, M. W. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Metalloproteins. In: **Metalloproteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1876p. 197–211.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1996.

KAMINSKI, G. A. et al. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. **J. Phys. Chem. B**, v. 105, p. 6474–6487, 2001.

KJAERGAARD, C. H. et al. Spectroscopic and computational insight into the activation of O<sub>2</sub> by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 24, p. 8797–8802, 2014.

KOKKINIDIS, M.; GLYKOS, N. M.; FADOULOGLOU, V. E. Protein flexibility and enzymatic catalysis. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 87, p.181-218, 2012.

KUZMANIC, A. et al. Importance of the Force Field Choice in Capturing Functionally Relevant Dynamics in the von Willebrand Factor. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 10, n. 8, p. 1928–1934, 2019.

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

LEE, J. Y.; KARLIN, K. D. Elaboration of copper-oxygen mediated CH activation chemistry in consideration of future fuel and feedstock generation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, p. 184–193, 2015.

LEHNINGER, D. N.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. ed. Porto Alegre: 2014.

LEWARS, E. G. **Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics: Third Edition 2016**. 2016.

LI, H.; ROBERTSON, A. D.; JENSEN, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK<sub>a</sub> values. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 61, n. 4, p. 704–721, 2005.

LI, X. Z.; WALKER, B.; MICHAELIDES, A. Quantum nature of the hydrogen bond. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 16, p. 6369–6373, 2011.

LIAO, Q.; KAMERLIN, S. C. L.; STRODEL, B. Development and Application of a Nonbonded Cu<sub>2+</sub> Model That Includes the Jahn-Teller Effect. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 13, p. 2657–2662, 2015.

LIEBERMAN, R. L.; ROSENZWEIG, A. C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 177–182, 2005.

LO LEGGIO, L. et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

LONSDALE, R.; HARVEY, J. N.; MULHOLLAND, A. J. A practical guide to modelling enzyme-catalysed reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3025–3038, 2012.

MCCAMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, p. 585–590, 1977.

MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Molecular mechanics application in inorganic chemistry. **Quimica Nova**, v. 18, n. 3, p. 44–55, 1995.

MORRONE, J. A.; CAR, R. Nuclear quantum effects in water. **Physical Review Letters**, v. 101, n. 1, p. 1–4, 2008.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NEESE, F. Metal and ligand hyperfine couplings in transition metal complexes: The effect of spin-orbit coupling as studied by coupled perturbed Kohn-Sham theory. **Journal of Chemical Physics**, v. 118, n. 9, p. 3939–3948, 2003.

NEESE, F. Prediction of molecular properties and molecular spectroscopy with density functional theory: From fundamental theory to exchange-coupling. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 5–6, p. 526–563, 2009.

NOSÉ, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 1, p. 511–519, 1984.

ORIO, M.; PANTAZIS, D. A. Successes, challenges, and opportunities for quantum chemistry in understanding metalloenzymes for solar fuels research. **Chemical Communications**, v. 57, n. 33, p. 3952–3974, 2021.

OSÓRIO, R. E. M. B. Novos ligantes e complexos binucleares de cobre(ii) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidase e hidrolases/nucleases sintéticas. **Dissertação (Mestrado em Química)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 135, 2007.

PAISSONI, C. et al. A critical assessment of force field accuracy against NMR data for cyclic peptides containing  $\beta$ -amino acids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 23, p. 15807–15816, 2018.

PATEL, R. N. et al. Copper(II) complexes as superoxide dismutase mimics: Synthesis, characterization, crystal structure and bioactivity of copper(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 14, p. 4891–4898, 2009.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, v. 78, n. 7, p. 1396–1396, 1997.

PERDEW, J. P.; WANG, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Physical Review B**, v. 45, p. 13244–13249, 1992.

POGNI, R. et al. EPR characterization of mono (thiosemicarbazones) copper (II) complexes. Note II. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, p. 333–337, 2000.

PUNEKAR, N. S. **Enzyme Kinetic Data: Collection and Analysis**. Springer: 2018.

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.

ROSS, M. O.; ROSENZWEIG, A. C. A tale of two methane monooxygenases. **J. Biol. Inorg. Chem.** [s.n], 2016.

ROSS, M. O. et al. Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers. **Science**, v. 364, n. 6440, p. 566–570, 2019.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.

SCOTT, W. R. P. et al. The GROMOS biomolecular simulation program package. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 19, p. 3596–3607, 1999.

SHIOTA, Y.; JUHÁSZ, G.; YOSHIZAWA, K. Role of tyrosine residue in methane activation at the dicopper site of particulate methane monooxygenase: A density functional theory study. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 7907–7917, 2013.

SHIOTA, Y.; YOSHIZAWA, K. Comparison of the Reactivity of Bis ( $\mu$ -oxo) Cu Cu and Cu Cu Species to Methane Comparison of the Reactivity of Bis ( $\mu$ -oxo) Cu II Cu III and Cu III Cu III Species. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 838–845, 2009.

SILVA, C. P. DA et al. Aumento da Eficiência Energética do Método DFT Através da Redução do Tempo de Cálculo Utilizando GPU. **WPerformance - IX Workshop em Desempenho de Sistemas Computacionais e de Comunicação**, p. 1790–1803, 2010.

SILVA, J. A. B. DA. Compostos de Coordenação Oxo-Diperoxo de Molibdênio (Quirais) e a Oxidação de Sulfetos. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, p.84, 2004.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 3 ed. Porto Alegre: 2003.

SINGH, R. S. et al. Molecular modeling and structural characterization of a high glycine–tyrosine hair keratin associated protein. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 19, p. 8575-8583, 2017.

SLATER, J. C. A simplification of the Hartree-Fock method. **Physical Review**, v. 81, n. 3, p. 385–390, 1951.

SØRUP, P.(IPTS), TILS, C. (IPTS), WOLF, O. (IPTS). Biocatalysis : state of the art in europe. **Economic and environmental benefits**, p. 1–65, 1998.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. **Molecular Dynamics Simulations: Difficulties, Solutions and Strategies for Treating Metalloenzymes**. [s.l: s.n.]. v. 12

SUN, H. et al. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.

TRUHLAR, D. G. Tunneling in enzymatic and nonenzymatic hydrogen transfer reactions. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 660–676, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219–222, 2010

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A Leap-Frog Algorithm for Stochastic Dynamics. **Molecular Simulation**, v. 1, n. 3, p. 173–185, 1988.

VAN LENTHE, E.; SNIJDERS, J. G.; BAERENDS, E. J. The zero-order regular approximation for relativistic effects: The effect of spin-orbit coupling in closed shell molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 105, n. 15, p. 6505–6516, 1996.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200–1211, 1980.

VY, T. T. et al. Spontaneous hinge-bending motions of angiotensin I converting enzyme: Role in activation and inhibition. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020.

WARSHEL, A. Computer simulations of enzyme catalysis: Methods, progress, and insights. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 425–443, 2003.

YOSHIZAWA, K.; SHIOTA, Y. Conversion of methane to methanol at the mononuclear and dinuclear copper sites of particulate methane monooxygenase (pMMO): A DFT and QM/MM study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 30, p. 9873–9881, 2006.

ZINOVJEV, K.; TUÑÓN, I. Reaction coordinates and transition states in enzymatic catalysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2018

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – INPUT EQUILIBRAÇÃO NPT

```

; Equilibraco NpT
integrator = md ; Algorithm: Leap-Frog
dt = 0.002 ; Timestep: 2 fs
tinit = 0 ; Tempo inicial
nsteps = 500000 ; Número de etapas : 500 000 * 2 fs = 1000 000 fs = 1000 ps
comm-mode = Linear
nstcomm = 100

; Controle do arquivo de saida
nstxout = 50000 ; 100 trr output frames
nstvout = 50000
nstfout = 50000
nstxout-compressed = 5000 ; 1000 xtc output frames
nstlog = 1000
nstcalcenergy = 1000
nstenergy = 1000 ; 5000 energy output frames

; Busca por vizinhos
cutoff-scheme = Verlet ; Algoritmo para definir o raio de corte p/ interações nao ligadas
nstlist = 20 ; Frequência p/ atualizar a lista de vizinhos
ns-type = grid ; Cria o grid na caixa de simulação p/ avaliar os vizinhos
pbc = xyz ; Condições periódicas de contorno nas três dimensões

; Electrostatica
coulombtype = PME ; Particle-Mesh-Ewals
pme-order = 4 ; Ordem de interpolação PME
fourierspacing = 0.10 ; Espaçamento de pontos da grade no espaço de Fourier
rcoulomb = 1.2 ; Raio de corte p/ as interações de Coulomb

; VdW
rvdw = 1.2 ; Raio de corte p/ interações de Lennard-Jones
DispCorr = EnerPres ; aplicar correções de dispersão de longo alcance para energia e pressão

; Acoplamento de Temperatura
tcoupl = Nose-Hoover ; Algoritmo de acoplamento
nhchainlength = 1 ;
tc-grps = Protein Non-Protein ; Separa grupos de acoplamento
tau-t = 2.0 2.0 ; Constantes de tempo de oscilação por grupo
ref-t = 298 298 ; Temperaturas de acoplamento (K) por grupo
nsttcouple = 10 ; Frequência de acoplamento de temperatura

; Acoplamento de pressão
pcoupl = Parrinello-Rahman ; Algoritmo
tau-p = 2.0 ; Constante de tempo de relaxamento de acoplamento

```



```
pcoupltype      = isotropic      ; Escalonamento da caixa de simulação = isotropicamente
nas 3D
compressibility = 4.5e-5         ; Compressibilidade da agua
ref-p           = 1.0            ; Pressão de referência em bar
refcoord-scaling = all          ; Escale todas as coordenadas ao dimensionar o volume
da caixa
nstpcouple      = 10            ; Frequencia de acoplamento da pressao

; Gerador de velocidade
gen-vel         = no

; Bonds
continuation    = yes
constraints     = all-bonds
constraint-algorithm = LINCS
lincs-order     = 6
lincs-iter      = 1
lincs-warnangle = 30
```

## APÊNDICE B – INPUT PARA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA

;Input da etapa de minimização de energia

integrator = steep ; Algoritmo SD (steepest)

emtol = 500.0 ; Critério p/ energia = maximum force < 500.0 kJ/mol/nm

emstep = 0.001 ; tamanho da etapa (passo) da minimização

nsteps = 1000 ; Número máximo de etapas

nstxout = 10

nstlist = 1 ; Frequência para atualizar a lista de vizinhos e forças de longo alcance

cutoff-scheme = Verlet ; Algoritmo para definir o raio de corte p/ interações não ligadas

verlet-buffer-tolerance = 0.005 ; Define o erro máximo permitido para interações de pares por partícula

ns\_type = grid ; Método para determinar a lista de vizinhos

coulombtype = PME ; Tratamento de interações eletrostáticas de longo alcance

pme-order = 4 ; Ordem da serie da formulação PME

rcoulomb = 1.2 ; Raio de corte p/ interações eletrostáticas

rvdw = 1.2 ; Raio de corte p/ interações de Van der Waals

DispCorr = EnerPres ; aplicar correções de dispersão de longo alcance para energia e pressão

pbc = xyz ; Condições Periódicas de Contorno nas três dimensões

Constraints = none

## APÊNDICE C – ETAPA DE PRODUÇÃO

```

; Input 100 ns NpT
integrator = md ; Algoritmo de integracao: Leap-Frog
dt = 0.002 ; Timestep: 2 fs
tinit = 0 ; Tempo inicial
nsteps = 50000000 ; Número de etapas: 5000000 * 2 fs = 100000000 fs = 100000 ps
comm-mode = Linear
nstcomm = 100

; Controle do arquivo de saída (output)
nstxout = 0
nstvout = 0
nstfout = 0
nstxout-compressed = 20000 ; salvar coordenadas formato xtc
nstlog = 10000
nstcalcenergy = 10000
nstenergy = 10000 ; escrever energias no output

; Busca por vizinhos
cutoff-scheme = Verlet ; Algoritmo para definir o raio de corte p/ interações não ligadas
nstlist = 20 ; Frequência p/ atualizar a lista de vizinhos
ns-type = grid ; Cria o grid na caixa de simulação p/ avaliar os vizinhos
pbc = xyz ; Condições periódicas de contorno nas três dimensões

; Eletrostática
coulombtype = PME ; Particle-Mesh-Ewals
pme-order = 4 ; Ordem de interpolação PME
fourierspacing = 0.10 ; Espaçamento de pontos da grade no espaço de Fourier
rcoulomb = 1.2 ; Raio de corte p/ as interações de Coulomb

; VdW
rvdw = 1.2 ; Raio de corte p/ interações de Lennard-Jones
DispCorr = EnerPres ; aplicar correções de dispersão de longo alcance para energia e
pressão

; Acoplamento da temperatura
tcoupl = Nose-Hoover ; Algoritmo de acoplamento
nhchainlength = 1 ;
tc-grps = Protein Non-Protein ; Separa grupos de acoplamento
tau-t = 2.0 2.0 ; Constantes de tempo de oscilação por grupo
ref-t = 298 298 ; Temperaturas de acoplamento (K) por grupo
nsttcouple = 5 ; Frequência de acoplamento de temperatura

; Acoplamento da pressao
pcoupl = Parrinello-Rahman ; Algoritmo
tau-p = 2.0 ; Constante de tempo de relaxamento de acoplamento
pcoupltype = isotropic ; Escalonamento da caixa de simulação = isotropicamente
nas 3D
compressibility = 4.5e-5 ; Compressibilidade da agua

```

```
ref-p          = 1.0          ; Pressão de referência em bar
refcoord-scaling = all       ; Escalona todas as coordenadas ao dimensionar o volume da
caixa
nstpcouple     = 5           ; Frequência de acoplamento da pressão

; Velocity generation
gen-vel        = no

; Bonds
continuation   = yes
constraints    = all-bonds

constraint-algorithm = LINCS
lincs-order    = 6
lincs-iter     = 1
lincs-warnangle = 30
```

## APÊNDICE D – SIMULAÇÃO CURTA COM ÁTOMOS DA PROTEÍNA FIXOS

```

; input p/ simulacao de 200 ps c/ átomos da proteína fixos
define      = -DPOSRES      ; Algoritmo p/ impor restrições aos átomos "pesados" da proteína

; Run control
integrator  = md            ; Algoritmo de integração: Leap-Frog
dt          = 0.001        ; Timestep: 1 fs
tinit      = 0             ; Tempo inicial
nsteps     = 200000        ; Number of steps: 100 000 * 2 fs = 200 000 fs = 200 ps = 0.2 ns
comm-mode  = Linear
nstcomm    = 100

; Controle sobre a escrita dos arquivos de saída (output)
nstxout    = 5000          ; 10 trr output frames
nstvout    = 5000
nstfout    = 5000
nstxout-compressed = 500    ; 100 xtc output frames
nstlog     = 100
nstcalcenergy = 100
nstenergy  = 100          ; 500 energy output frames

; Busca por vizinhos
cutoff-scheme = Verlet    ; Algoritmo para definir o raio de corte p/ interações não ligadas
nstlist      = 20         ; frequência p/ atualizar a lista de vizinhos
ns-type      = grid       ; Cria o grid na caixa de simulação p/ avaliar os vizinhos
pbc          = xyz        ; Condições periódicas de contorno nas Três dimensões

; Controle do tratamento das interações eletrostáticas
coulombtype  = PME        ; Particle-Mesh-Ewals
pme-order    = 4          ; Ordem de interpolação PME.
fourierspacing = 0.10     ; Espaçamento de pontos da grade no espaço de Fourier
rcoulomb     = 1.2        ; Raio de corte p/ as interações de Coulomb

; VdW
rvdw        = 1.2        ; Raio de corte p/ interações de Lennard-Jones
DispCorr    = EnerPres   ; aplicar correções de dispersão de longo alcance para energia e pressão

; Acoplamento da Temperatura
tcoupl      = v-rescale    ; Algoritmo de acoplamento
tc-grps     = Protein Non-Protein ; Grupos de acoplamento separados
tau-t       = 0.1 0.1     ; Constantes de tempo de relaxamento de acoplamento por grupo
ref-t       = 298 298     ; Temperaturas de referencia (K) por grupo
nsttcouple  = 10          ; frequência de acoplamento de temperatura

; Acoplamento da pressão
pcoupl      = berendsen    ; Algoritmo p/ acoplamento da pressão
tau-p       = 1.0         ; Constante de tempo de relaxamento de acoplamento

```

```

pcoupltype      = isotropic    ; Escalonamento da caixa de simulação = isotropicamente nas
3D
compressibility = 4.5e-5      ; Compressibilidade da agua
ref-p           = 1.0         ; Pressão de referência em bar
refcoord-scaling = all        ; Escala todas as coordenadas ao dimensionar o volume da caixa
nstpcouple     = 10          ; frequência de acoplamento da pressão

; Velocity generation
gen-vel        = yes          ; Gera novas velocidades c/ base na distribuição de Boltzman
gen-temp       = 298          ; Temperatura de referencia (K)

; Bonds
continuation   = no           ; Aplicar restrições à configuração inicial
constraints    = all-bonds    ; Restringe os vínculos p/ tornar possível um intervalo de tempo
maior

constraint-algorithm = LINCS    ; Algoritmo de restrição
lincs-order     = 6           ;
lincs-iter      = 1
lincs-warnangle = 30

```

## APÊNDICE E – INPUT DE RPE

```

%pal nprocs 10 end
! uks bhandhlyp def2-tzvp/c NormalSCF ZORA Grid4 NoFinalGrid Direct SOMF(1X)
%scf MaxIter 1000
DampFac=0.90
DampErr=0.02 end
%basis newgto 8 "def2-tzvp" end
  newauxgto 8 "def2-tzvp/c" end
  newgto 1 "def2-tzvp" end
  newauxgto 1 "def2-tzvp/c" end
  newgto 7 "def2-tzvp" end
  newauxgto 7 "def2-tzvp/c" end
  newgto 6 "def2-tzvp" end
  newauxgto 6 "def2-tzvp/c" end
  newgto 29 "def2-tzvp" end
  newauxgto 29 "def2-tzvp/c" end
end
* xyz 1 2
N      1.28900000   0.02600000  -0.16900000
H      1.08800000   0.77100000  -0.81700000
H      1.58200000  -0.76500000  -0.73700000
C      2.55500000   0.59700000   0.23500000
H      2.30800000   1.63600000   0.46500000
C      3.18900000  -0.20100000   1.37400000
H      3.14700000  -1.26400000   1.14900000
H      4.23400000   0.00800000   1.57800000
C      2.50800000   0.06800000   2.68300000
N      1.13100000   0.07900000   2.90300000
C      3.13300000   0.37200000   3.87200000
H      4.17900000   0.46600000   4.11600000
C      0.96400000   0.35700000   4.19000000
H      0.04200000   0.44600000   4.74800000
N      2.14300000   0.45200000   4.82600000
H      2.36900000   0.65300000   5.78900000
C      3.47500000   0.45700000  -0.97400000
O      3.54200000  -0.65800000  -1.48600000
N      3.98200000   1.56400000  -1.51500000
H      3.81000000   2.40300000  -0.96800000
C      4.76900000   1.74300000  -2.71700000
H      5.68000000   2.28200000  -2.45900000
H      5.04700000   0.84200000  -3.26000000
C      4.09400000   2.54800000  -3.82500000
O      4.80900000   2.96300000  -4.72800000
N      2.80500000   2.83100000  -3.62400000
H      2.38700000   2.58900000  -2.74000000
C      1.96200000   3.50700000  -4.58700000
H      2.48700000   3.32300000  -5.52400000
C      0.58100000   2.84000000  -4.49700000
H      0.18600000   3.08100000  -5.48300000

```

H	0.73400000	1.76200000	-4.54700000
C	-0.45000000	3.22000000	-3.43800000
H	-0.75500000	4.25800000	-3.60800000
H	-1.27300000	2.54000000	-3.64900000
C	-0.00900000	2.98400000	-1.99900000
O	0.85600000	2.13800000	-1.69300000
O	-0.64400000	3.57600000	-1.10900000
C	1.97800000	4.99100000	-4.27300000
O	2.84137749	5.45827806	-3.48572554
C	-2.21500000	-3.58500000	3.99500000
H	-3.10600000	-3.26400000	4.55000000
C	-1.35400000	-2.32400000	3.99100000
H	-1.00100000	-2.15300000	5.00500000
H	-0.38100000	-2.43300000	3.50100000
C	-2.00800000	-1.01200000	3.64900000
N	-1.65000000	-0.17200000	2.59800000
C	-3.04900000	-0.45000000	4.34200000
H	-3.56200000	-0.85700000	5.20500000
C	-2.43400000	0.89700000	2.77300000
H	-2.48000000	1.75100000	2.11400000
N	-3.19300000	0.84200000	3.88000000
H	-3.90700000	1.48400000	4.21600000
C	-2.27800000	-4.20200000	2.61200000
O	-1.30441312	-4.08071956	1.82397068
C	-4.42600000	-3.27000000	-2.05800000
H	-5.28900000	-2.74400000	-1.65500000
C	-3.32800000	-2.45200000	-2.72500000
H	-2.61700000	-3.10500000	-3.22600000
H	-3.79200000	-1.79700000	-3.46200000
C	-2.69400000	-1.43700000	-1.81600000
N	-2.97800000	-0.08300000	-1.78700000
H	-3.47700000	0.52500000	-2.41300000
C	-1.73200000	-1.68700000	-0.87200000
H	-1.24100000	-2.60600000	-0.57600000
C	-2.22700000	0.42200000	-0.80200000
H	-2.24300000	1.47800000	-0.54300000
N	-1.46200000	-0.49400000	-0.20000000
C	-4.92000000	-4.19800000	-3.16100000
O	-4.37356038	-5.31856925	-3.33216907
Cu	-0.07800000	-0.18500000	1.24100000
O	-0.17900000	1.99400000	1.12100000
H	-0.06700000	2.50300000	0.31500000
H	-0.13600000	2.64600000	1.82000000
O	0.61800000	-2.35800000	1.28600000
H	0.01600000	-3.07500000	1.05800000
H	1.16900000	-2.72300000	1.98600000
H	1.25516802	5.64044493	-4.72092321
H	-5.73152306	-3.89684892	-3.78999790
H	-3.15030186	-4.74069074	2.30572930
N	-1.61207822	-4.56246410	4.91257793



```
H      -1.86972654 -4.34000967  5.85286053
H      -1.93989965 -5.47942956  4.68518518
N      -3.78967843 -4.13096545 -1.05066026
H      -4.48028107 -4.45258319 -0.40287170
H      -3.36564820 -4.91568623 -1.50277933
```

```
*
```

```
%epnmr nuclei = all Cu {aiso, adip, aorb, rho, sspso, ssfc}
  gtensor true
  dtensor ssandso
  dss direct
  Ori 70
end
```

## APÊNDICE F – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL B3LYP

Frames	$g_x$	$g_y$	$g_z$	Az (MHz)	$g_z/Az$	Erro	Erro	Erro	Erro
						Relativo $g_x$	Relativo $g_y$	Relativo $g_z$	Relativo Az
1	2.061	2.062	2.189	442	149	1.28%	0.29%	2.36%	22.46%
2	2.048	2.07	2.184	491	133	0.64%	0.10%	2.59%	13.86%
3	2.048	2.064	2.178	483	135	0.64%	0.19%	2.85%	15.26%
4	2.052	2.069	2.189	477	138	0.84%	0.05%	2.36%	16.32%
5	2.055	2.061	2.182	443	148	0.98%	0.34%	2.68%	22.28%
6	2.054	2.06	2.178	444	147	0.93%	0.39%	2.85%	22.11%
7	2.048	2.053	2.164	432	146	0.64%	0.73%	3.48%	24.21%
8	2.052	2.073	2.191	507	148	0.84%	0.24%	2.27%	11.05%
9	2.055	2.058	2.182	414	147	0.98%	0.48%	2.68%	27.37%
10	2.049	2.058	2.173	441	147	0.69%	0.48%	3.08%	22.63%
11	2.054	2.059	2.178	446	147	0.93%	0.44%	2.85%	21.75%
12	2.045	2.065	2.173	498	147	0.49%	0.15%	3.08%	12.63%
13	2.056	2.073	2.198	505	149	1.03%	0.24%	1.96%	11.40%
14	2.046	2.058	2.168	451	146	0.54%	0.48%	3.30%	20.88%
15	2.056	2.068	2.195	469	148	1.03%	0.00%	2.10%	17.72%
16	2.049	2.059	2.178	446	147	0.69%	0.44%	2.85%	21.75%
17	2.058	2.068	2.19	467	148	1.13%	0.00%	2.32%	18.07%
18	2.05	2.059	2.178	448	147	0.74%	0.44%	2.85%	21.40%
19	2.055	2.065	2.186	439	148	0.98%	0.15%	2.50%	22.98%
20	2.049	2.071	2.188	512	148	0.69%	0.15%	2.41%	10.18%
21	2.048	2.075	2.188	519	148	0.64%	0.34%	2.41%	8.95%
22	2.053	2.072	2.193	492	148	0.88%	0.19%	2.19%	13.68%
23	2.05	2.06	2.174	457	147	0.74%	0.39%	3.03%	19.82%
24	2.042	2.074	2.186	554	148	0.34%	0.29%	2.50%	2.81%
25	2.053	2.064	2.179	445	147	0.88%	0.19%	2.81%	21.93%
26	2.053	2.055	2.175	426	147	0.88%	0.63%	2.99%	25.26%
27	2.052	2.074	2.188	509	148	0.84%	0.29%	2.41%	10.70%
28	2.049	2.075	2.187	526	148	0.69%	0.34%	2.45%	7.72%
29	2.042	2.077	2.183	558	148	0.34%	0.44%	2.63%	2.11%
30	2.052	2.067	2.182	476	147	0.84%	0.05%	2.68%	16.49%
31	2.031	2.094	2.182	321	147	0.20%	1.26%	2.68%	43.68%
32	2.05	2.074	2.195	509	148	0.74%	0.29%	2.10%	10.70%
33	2.057	2.059	2.19	421	148	1.08%	0.44%	2.32%	26.14%
34	2.044	2.059	2.172	509	147	0.44%	0.44%	3.12%	10.70%
35	2.052	2.068	2.189	486	148	0.84%	0.00%	2.36%	14.74%
36	2.042	2.092	2.201	585	149	0.34%	1.16%	1.83%	2.63%
37	2.048	2.057	2.172	409	147	0.64%	0.53%	3.12%	28.25%
38	2.051	2.072	2.189	506	148	0.79%	0.19%	2.36%	11.23%

**APÊNDICE G – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL REVPBE**

Frames	$g_x$	$g_y$	$g_z$	Az (MHz)	$g_z/A_z$	Erro		Erro	
						Relativo $g_x$	Relativo $g_y$	Relativo $g_z$	Relativo Az
<b>1</b>	2.042	2.044	2.128	351	182	0.34%	1.16%	5.08%	38.42%
<b>2</b>	2.034	2.05	2.127	405	158	0.05%	0.87%	5.13%	28.95%
<b>3</b>	2.034	2.044	2.122	390	163	0.05%	1.16%	5.35%	31.58%
<b>4</b>	2.037	2.049	2.13	387	165	0.10%	0.92%	5.00%	32.11%
<b>5</b>	2.038	2.043	2.122	352	181	0.15%	1.21%	5.35%	38.25%
<b>6</b>									
<b>7</b>	2.034	2.038	2.112	351	181	0.05%	1.45%	5.80%	38.42%
<b>8</b>	2.038	2.05	2.13	399	160	0.15%	0.87%	5.00%	30.00%
<b>9</b>	2.04	2.041	2.128	333	192	0.25%	1.31%	5.08%	41.58%
<b>10</b>	2.036	2.041	2.119	360	177	0.05%	1.31%	5.49%	36.84%
<b>11</b>	2.038	2.041	2.123	359	177	0.15%	1.31%	5.31%	37.02%
<b>12</b>	2.032	2.046	2.118	410	155	0.15%	1.06%	5.53%	28.07%
<b>13</b>	2.042	2.05	2.133	395	162	0.34%	0.87%	4.86%	30.70%
<b>14</b>	2.034	2.041	2.116	370	172	0.05%	1.31%	5.62%	35.09%
<b>15</b>	2.041	2.046	2.131	360	178	0.29%	1.06%	4.95%	36.84%
<b>16</b>	2.035	2.042	2.123	363	175	0.00%	1.26%	5.31%	36.32%
<b>17</b>	2.041	2.047	2.127	359	178	0.29%	1.02%	5.13%	37.02%
<b>18</b>	2.036	2.041	2.124	359	177	0.05%	1.31%	5.26%	37.02%
<b>19</b>	2.036	2.074	2.125	337	189	0.05%	0.29%	5.22%	40.88%
<b>20</b>	2.03	2.035	2.092	299	210	0.25%	1.60%	6.69%	47.54%
<b>21</b>	2.033	2.052	2.126	409	156	0.10%	0.77%	5.17%	28.25%
<b>22</b>	2.038	2.049	2.131	378	169	0.15%	0.92%	4.95%	33.68%
<b>23</b>	2.035	2.043	2.118	370	172	0.00%	1.21%	5.53%	35.09%
<b>24</b>	2.031	2.051	2.128	457	140	0.20%	0.82%	5.08%	19.82%
<b>25</b>									
<b>26</b>	2.038	2.04	2.121	345	184	0.15%	1.35%	5.40%	39.47%
<b>27</b>	2.037	2.052	2.128	414	154	0.10%	0.77%	5.08%	27.37%
<b>28</b>	2.031	2.04	2.095	303	207	0.20%	1.35%	6.56%	46.84%
<b>29</b>	2.029	2.053	2.122	458	139	0.29%	0.73%	5.35%	19.65%
<b>30</b>	2.038	2.047	2.124	376	169	0.15%	1.02%	5.26%	34.04%
<b>31</b>	2.021	2.067	2.124	515	124	0.69%	0.05%	5.26%	9.65%
<b>32</b>	2.037	2.051	2.136	401	160	0.10%	0.82%	4.73%	29.65%
<b>33</b>	2.036	2.038	2.113	287	221	0.05%	1.45%	5.75%	49.65%
<b>34</b>	2.033	2.042	2.121	425	150	0.10%	1.26%	5.40%	25.44%
<b>35</b>	2.039	2.047	2.133	388	165	0.20%	1.02%	4.86%	31.93%
<b>36</b>	2.009	2.01	2.02	124	489	1.28%	2.80%	9.90%	78.25%
<b>37</b>	2.033	2.041	2.118	322	197	0.10%	1.31%	5.53%	43.51%
<b>38</b>	2.037	2.048	2.127	378	169	0.10%	0.97%	5.13%	33.68%

**APÊNDICE H – RESULTADOS PARA O FUNCIONAL BHANDHLYP**

Frames	$g_x$	$g_y$	$g_z$	Az (MHz)	$g_z/Az$	Erro		Erro	
						Relativo $g_x$	Relativo $g_y$	Relativo $g_z$	Relativo $A_z$
1	2.088	2.097	2.299	536	129	2.60%	1.40%	2.54%	5.96%
2	2.073	2.102	2.292	561	123	1.87%	1.64%	2.23%	1.58%
3	2.071	2.095	2.281	553	124	1.77%	1.31%	1.74%	2.98%
4	2.079	2.102	2.3	553	125	2.16%	1.64%	2.59%	2.98%
5	2.085	2.089	2.289	514	134	2.46%	1.02%	2.10%	9.82%
6	2.082	2.087	2.28	511	134	2.31%	0.92%	1.69%	10.35%
7	2.071	2.079	2.257	497	136	1.77%	0.53%	0.67%	12.81%
8	2.076	2.109	2.299	582	119	2.01%	1.98%	2.54%	2.11%
9	2.08	2.089	2.289	499	138	2.21%	1.02%	2.10%	12.46%
10	2.073	2.087	2.275	514	133	1.87%	0.92%	1.47%	9.82%
11	2.081	2.087	2.284	521	132	2.26%	0.92%	1.87%	8.60%
12	2.065	2.097	2.272	573	119	1.47%	1.40%	1.34%	0.53%
13	2.082	2.11	2.313	587	118	2.31%	2.03%	3.17%	2.98%
14	2.068	2.086	2.267	524	130	1.62%	0.87%	1.12%	8.07%
15	2.087	2.101	2.312	548	127	2.56%	1.60%	3.12%	3.86%
16	2.074	2.089	2.283	525	130	1.92%	1.02%	1.83%	7.89%
17	2.088	2.102	2.306	551	126	2.60%	1.64%	2.85%	3.33%
18	2.074	2.089	2.283	525	130	1.92%	1.02%	1.83%	7.89%
19	2.084	2.098	2.297	527	131	2.41%	1.45%	2.45%	7.54%
20	2.072	2.109	2.299	597	116	1.82%	1.98%	2.54%	4.74%
21	2.072	2.111	2.301	592	117	1.82%	2.08%	2.63%	3.86%
22	2.078	2.108	2.304	573	121	2.11%	1.93%	2.77%	0.53%
23	2.074	2.09	2.276	535	128	1.92%	1.06%	1.52%	6.14%
24	2.061	2.114	2.294	631	109	1.28%	2.22%	2.32%	10.70%
25	2.079	2.09	2.284	520	132	2.16%	1.06%	1.87%	8.77%
26	2.079	2.083	2.276	500	137	2.16%	0.73%	1.52%	12.28%
27	2.078	2.11	2.298	583	118	2.11%	2.03%	2.50%	2.28%
28	2.069	2.112	2.292	607	113	1.67%	2.13%	2.23%	6.49%
29	2.062	2.117	2.292	632	109	1.33%	2.37%	2.23%	10.88%
30	2.079	2.098	2.288	548	125	2.16%	1.45%	2.05%	3.86%
31	2.049	2.139	2.29	683	101	0.69%	3.43%	2.14%	19.82%
32	2.074	2.112	2.308	592	117	1.92%	2.13%	2.94%	3.86%
33	2.086	2.088	2.3	500	138	2.51%	0.97%	2.59%	12.28%
34	2.063	2.09	2.269	574	119	1.38%	1.06%	1.20%	0.70%
35	2.076	2.103	2.3	569	121	2.01%	1.69%	2.59%	0.18%
36	2.059	2.141	2.314	674	103	1.18%	3.53%	3.21%	18.25%
37	2.071	2.085	2.273	492	139	1.77%	0.82%	1.38%	13.68%
38	2.074	2.11	2.3	595	116	1.92%	2.03%	2.59%	4.39%

## APÊNDICE I - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM CONGRESSO.



XX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE QUÍMICA TEÓRICA 2019

# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "*Analysis of the Dynamical and Structural Properties of Soluble Part of pMMO Enzyme: A MD and QM/MM Study.*", do(s) autor(es) **William D. A. B. Da Silva**, **Roberta P. Dias**, **Júlio C. S. Da Silva**, foi apresentado em forma de Pôster no XX Simpósio Brasileiro de Química Teórica, realizado no período de 10 a 14 de novembro de 2019 Centro de Convenções da Paraíba.

João Pessoa-PB, 14 de novembro de 2019.

  
Prof.<sup>a</sup> Elizete Ventura do Monte  
Coordenadora Geral do Evento

Apoio: 

Patrocínio: 

**APÊNDICE J- CARGA HORÁRIA DAS DISCIPLINAS CUMPRIDAS E ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO (ATIVIDADES EXTRAS E ATIVIDADES DO PROGRAMA):**

<b>Disciplina/Atividade</b>	<b>Carga Horária</b>
Seminários de Química e Biotecnologia I	30h
Seminários de Química e Biotecnologia II	30h
Catálise Homogênea	60h
Materiais e Compostos Luminescentes: Princípios e Aplicações	30h
Tópicos em Química Inorgânica: Fronteira em Catálise	30h
Físico-Química Avançada I	60h
Química Inorgânica Avançada I	60h
Proficiência em Língua estrangeira (inglês)	Cumprido
Trabalho apresentado em Congresso	Cumprido
Estágio Docência	Cumprido.
Participação em Workshop online: Química computacional Avançada usando o ADF, ministrado pelo Prof. Dr. F. Matthias Bickelhaupt, do Departamento de Química Teórica (Amsterdam).	Dias: 30/11/20; 01/12/20 e 04/12/20 20h.
Participação em Webinários Online – I CICIT - Universidade Federal de Pernambuco	10h
Participação em Reunião Magna ABC- O mundo a partir da COVID-19	8h30min
Participação em Congresso online – Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos	-
Minicurso: Dinâmica Molecular Básica	10h
Minicurso: Métodos Quânticos Semiempíricos – Teoria e Prática	10h
Minicurso: Métodos de Aprendizagem da Máquina – Teoria e Prática	10h
<b>Carga Horária Total Cumprida*</b>	<b>360h30min</b>

\*Carga horária total, levando em consideração as atividades extras do workshop, eventos e webinários.