



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
MESTRADO

RENAN FARIA GUERRA

**MODELAGEM MOLECULAR VOLTADA PARA A  
CONSTRUÇÃO DE UM NANOBIOSSENSOR PARA  
DETECÇÃO DO HERBICIDA IMAZAQUIN**

UBERLÂNDIA  
2016

RENAN FARIA GUERRA

**MODELAGEM MOLECULAR VOLTADA PARA A  
CONSTRUÇÃO DE UM NANOBIOSENSOR PARA  
DETECÇÃO DO HERBICIDA IMAZAQUIN**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Coordenação do Curso de Pós Graduação  
em Química, como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria  
Franca

UBERLÂNDIA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G934m      Guerra, Renan Faria, 1992  
2016      Modelagem molecular voltada para a construção de um  
nanobiossensor para detecção do herbicida Imazaquin / Renan Faria  
Guerra. - 2016.  
113 f. : il.

Orientador: Eduardo de Faria Franca.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Biossensores - Teses. 3. Dinâmica molecular -  
Teses. 4. Microscopia de força atômica - Teses. I. Franca, Eduardo de  
Faria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 245/PPQUI.

DATA: 28/07/2016

DISCENTE: Renan Faria Guerra

MATRÍCULA: 11422QMI009

TÍTULO DO TRABALHO: Simulação computacional de um nanobiossensor para detecção do herbicida imazaquin.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Físico-Química de Macromoléculas e Coloides

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Controle molecular no desenvolvimento de nanobiossensores.

Às quatorze horas do dia vinte e oito de julho do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Odonório Abrahão Júnior, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Silvana Guilardi e Eduardo de Faria Franca, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

MODELAGEM MOLECULAR VOLTADA PARA A  
CONSTRUÇÃO DE UM NANOBIOSSENSOR PARA  
DETECÇÃO DO HERBICIDA IMAZAQUIM

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

UFTM

Profª Dra. Silvana Guilardi

UFU

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU

Às duas pessoas que fazem minha vida ter sentido: Marilane (Mãe) e Celida (Avó).  
Não fosse por e com vocês nada disso teria sentido e nem seria possível.

“Computers are incredibly fast, accurate and stupid.  
People are incredibly slow, inaccurate and remarkable.  
Together they are an inconceivable force.”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me manter firme em seus desígnios e pela fé renovada a cada manhã.

À minha Mãe pelo amor incondicional, pelo exemplo de dedicação, por ser a responsável pela minha formação de vida e por acreditar em mim mais que eu mesmo, sempre me apoiando em minhas escolhas acreditando na minha felicidade e realização pessoal. Muito Obrigado por TUDO.

À minha avó Célida pelo exemplo de vida, pelo amor e ajuda a mim concedidos, mas, sobretudo por me apoiar em seguir o caminho escolhido mesmo nele estando o ônus da sua ausência diária.

À minha tia Meire por me hospedar pronta e generosamente em sua casa, em especial, depois de cansativas viagens, tornando mais leve essa etapa.

Aos amigos do coração que tenho como irmãos e que levarei para o resto da vida: Rafa, Luiz André e Robertinha.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da UFU-Patos de Minas pelo companheirismo e pela compreensão com meus afastamentos semanais para a realização dessa etapa: Laís, Vanessa, Lucas, Luciana e Carla.

Aos colegas do Laboratório de Cristalografia e Química Computacional (LCQC), em especial, ao aluno de iniciação científica Gabriel pela colaboração na realização de parte desse trabalho.

Aos demais amigos e familiares que de alguma forma e em algum momento colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Franca pela confiança, pelos ensinamentos, paciência e constante disponibilidade nessa etapa da minha formação acadêmica. Exemplo a ser seguido como profissional, ao exercer com mestria o papel de orientador, e ser humano, ao saber como lidar com o próximo.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Fábio Amaral e à Prof<sup>a</sup> Dra. Sheila Canobre pelo exemplo de excelência na prática docente que tanto admiro, pela confiança e pelo enorme aprendizado a mim oferecido nos fundamentos da pesquisa científica.

Ao professor Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado pela participação e contribuições na banca de qualificação.

Aos professores Dra. Silvana Guilardi e Dr. Odonório Abrhão Jr. pela disponibilidade de participação na comissão examinadora desse trabalho e por suas contribuições.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Matheus de Souza, coordenador do Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares (LBAM), por disponibilizar um dos computadores para meu uso pessoal na realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia por ter sido uma extensão da minha casa nos últimos anos. Uma escolha acertada que me ofereceu formação acadêmica de qualidade e, ainda, me recebeu para exercer os ofícios da carreira de químico.

Aos órgãos de fomento CAPES/CNPq/FAPEMIG/RQ-MG pelos recursos financeiros disponibilizados para a realização desse trabalho.



## RESUMO

Nesse estudo, o objetivo foi desenvolver e descrever um modelo molecular da interação enzima-inibidor que seja base para a projeção otimizada de um nanobiossensor de AFM para a detecção de pesticidas utilizados na agricultura e seu controle dentro dos níveis estipulados pela legislação vigente. O herbicida estudado (imazaquin) é um representante do grupo das imidazolinonas e é inibidor da atividade da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS), responsável pela etapa inicial de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada. A análise das propriedades dessa enzima na presença de seus cofatores FAD e TPP foi realizada para se obter informações estruturais e de distribuição de cargas na superfície molecular para avaliar a funcionalização da ponteira do microscópio de força atômica por meio da imobilização da enzima. A simulação computacional do sistema, por Dinâmica Molecular, foi permitida com a obtenção dos parâmetros de campo de força para os cofatores e o herbicida utilizando a ferramenta online *SwissParam* e estes foram implementados no campo de força CHARMM27, utilizado pelo *software* GROMACS; em seguida, as devidas simulações foram realizadas para a validação dos mesmos. A orientação molecular da AHAS foi definida com base no mapa eletrostático e na disponibilidade do herbicida no sítio ativo. Realizou-se simulação de dinâmica molecular direcional (SMD), seguida de cálculos quânticos para os frames mais representativos, segundo a metodologia QM/MM sequencial, em uma direção específica de retirada do herbicida do sítio ativo. Para isso, aplicou-se forças harmônicas externas com constantes de força similares à do cantilever do AFM para simular experimentos de detecção desse herbicida pelo nanobiossensor proposto. Foram calculados um valor de força de 1391 pN e uma energia de ligação de  $-14048,52 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Palavras-chave: nanobiossensor enzimático, Microscopia de Força Atômica (AFM), Acetohidroxiácido Sintase (AHAS), Imazaquin, Dinâmica Molecular.

## ABSTRACT

In this study, our goal was develop and describe a molecular model of the enzyme-inhibiting interaction which can be used for an optimized projection of a Microscope Force Atomic nanobiosensor to detect pesticides molecules, used in agriculture, to evaluate its accordance with limit levels stipulated in valid legislation for its use. The studied herbicide (imazaquin) is a typical member of imidazolinone family and is an inhibitor of the enzymatic activity of Acetohydroxiacid Synthase (AHAS) enzyme that is responsible for the first step of pathway for the synthesis of side-chains in amino acids. The analysis of this enzyme property in the presence of its cofactors was made to obtain structural information and charge distribution of the molecular surface to evaluate its capacity of became immobilized on the Microscopy Atomic Force tip. The computational simulation of the system, using Molecular Dynamics, was possible with the force-field parameters for the cofactor and the herbicides obtained by the online tool *SwissParam* and it was implemented in force-field CHARMM27, used by software GROMACS; then appropriated simulations were made to validate the new parameters. The molecular orientation of the AHAS was defined based on electrostatic map and the availability of the herbicide in the active site. Steered Molecular Dynamics (SMD) Simulations, followed by quantum mechanics calculations for more representative frames, according to the sequential QM/MM methodology, in a specific direction of extraction of the herbicide from the active site. Therefore, external harmonic forces were applied with similar force constants of AFM cantilever for to simulate herbicide detection experiments by the proposed nanobiosensor. Force value of 1391 pN and binding energy of  $-14048.52 \text{ kJ mol}^{-1}$  were calculated.

**Keywords:** enzymatic nanobiosensor, Atomic Force Microscopy (AFM), Acetohydroxyacid Synthase (AHAS), Imazaquin, Molecular Dynamic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Participação das classes de defensivos agrícolas na quantidade vendida, em Produto Comercial no Brasil, em 2014. ....	1
Figura 2 – Configuração básica de um biossensor. ....	6
Figura 3 – Número de trabalhos publicados na área nos últimos quinze anos utilizando-se a base de dados <i>ScienceDirect</i> . *Trabalhos publicados/aceitos para publicação até 14 de março/2016. ....	9
Figura 4 – Diagrama esquemático dos principais componentes de um microscópio de força atômica. ....	11
Figura 5 – Representação esquemática dos modos de operação do AFM: contato (a), não-contato (b) e intermitente (c). ....	12
Figura 6 – Estrutura geral dos $\alpha$ -aminoácidos. ....	14
Figura 7 – Estruturas covalentes dos 20 aminoácidos mais comuns encontrados em proteínas, apresentadas em seu estado de ionização predominante em pH neutro, classificadas de acordo com a característica química do agrupamento R (porções sombreadas). ....	15
Figura 8 – Reação de condensação entre aminoácidos formando uma ligação peptídica. ....	16
Figura 9 – Níveis da estrutura das proteínas. ....	17
Figura 10 – Energias de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) das reações não catalisada e catalisada por enzima em função da coordenada de reação. ....	18
Figura 11 – Via da síntese dos ACR catalisada pela enzima AHAS. ....	19
Figura 12 – Representação da estrutura química das moléculas TPP (a) e FAD (b). ....	21
Figura 13 – Representação tipo <i>new cartoon</i> da enzima AHAS utilizando o programa VMD. Os cofatores FAD (verde) e TPP (vermelho) e o herbicida imazaquin (amarelo) estão representados no modelo <i>licorice</i> e o íon $Mg^{2+}$ (roxo) no modelo de bolas. ....	22
Figura 14 – Principais herbicidas comerciais da classe das imidazolinonas capazes de inibir a atividade enzimática da AHAS: a) Imazapic (CADRE®); b) Imazapyr (ARSENAL®); c) Imazaquin (SCEPTER®) e d) Imazethapyr (PURSUIT®). ....	23
Figura 15 – Forma aniônica do imazaquin em pH maiores que o pKa. ....	26
Figura 16 – Representação de uma molécula sob a ótica da Mecânica Molecular. ....	29
Figura 17 – Representação de ângulo diedro. ....	32
Figura 18 – Representação das condições periódicas de contorno em três dimensões. .	37
Figura 19 – Representação do Raio de Corte esférico para um sistema periódico em duas dimensões. ....	38
Figura 20 – Representação dos modelos de água do tipo: SPC e TIP3P (a), TIP4P (b) e TIP5P (c); $I_1$ e $I_2$ representam as distâncias entre o átomo hidrogênio e oxigênio; $q_1$ e $q_2$ representam as cargas atômicas do hidrogênio e oxigênio, respectivamente; $\theta$ e $\Phi$ são os ângulos de ligação e $\sigma$ é a distância para o potencial zero. ....	40
Figura 21 – Nomenclatura utilizada na identificação dos átomos dos cofatores da enzima AHAS: FAD (a) e TPP (b). ....	51

Figura 22 – Energia total envolvida durante os 10 ns de simulação para os cofatores da enzima AHAS: a) FAD e b) TPP. ....	54
Figura 23 – Evolução temporal do RMSD para as estruturas dos cofatores da enzima AHAS: a) FAD e b) TPP. ....	55
Figura 24 – Estruturas inicial (a) e otimizada (b) da molécula do imazaquin. ....	57
Figura 25 – Nomenclatura utilizada na identificação dos átomos do imazaquin. ....	57
Figura 26 – Energia total do sistema ao longo da dinâmica molecular. ....	62
Figura 27 – Variação temporal da energia associada às interações do tipo: a) Coulômbicas; b) van der Waals ou de Lennard-Jones. ....	63
Figura 28 – Evolução temporal da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) (a) e do RMSDist (b). ....	64
Figura 29 – Representação da distribuição radial de um átomo $i$ a uma distância $r + dr$ de um átomo $j$ . ....	65
Figura 30 – Distribuição Radial de Pares para os átomos mais eletronegativos da molécula do imazaquin com a água em função da distância das ligações ( $r$ ). ....	66
Figura 31 – Energia total dos sistemas enzimáticos simulados em solução aquosa. ....	68
Figura 32 – Diagrama Ramachandran para a estrutura inicial (a) e após 20 ns de simulação (b) da enzima AHAS. ....	70
Figura 33 – Flutuação quadrática média (RMSF) dos 7 resíduos do sítio ativo responsáveis pela ligação do herbicida imazaquin. ....	73
Figura 34 – Mapa do potencial eletrostático plotado na superfície molecular da enzima AHAS apresentada de acordo com a visão frontal (a) e traseira (b) ao longo do eixo $z$ , indicando o sítio ativo de interação do herbicida com a enzima (c). Os potenciais positivos (azul), negativos (vermelho) e neutros (branco) correspondem à faixa de $-3,0K_B T/e$ e $+3,0K_B T/e$ . ....	76
Figura 35 – Dinâmica Molecular Direcional no caminho sugerido para retirada do herbicida. Sendo $\Delta x$ a distância entre o centro de massa da enzima e o do grupo carbonila do imazaquin, e $k$ a constante de força que representa a mesma do cantilever. ....	78
Figura 36 – Perfil de força aplicado ao longo do eixo $z$ durante a Dinâmica Molecular Direcional. ....	79
Figura 37 – Curva da energia total do sistema para os 65 ps iniciais de simulação. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível e o transdutor utilizado. ....	7
Tabela 2 – Comparação das características desejáveis das formas livre e imobilizada do componente biológico, para aplicação em biossensores enzimáticos. ....	8
Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas do herbicida imazaquin. ....	24
Tabela 4 – Potenciais envolvidos na descrição do campo de força CHARMM utilizados na DM. ....	31
Tabela 5 – Comparação dos parâmetros de diferentes modelos de molécula de água. ...	40
Tabela 6 – Descrição dos sistemas dos cofatores simulados. ....	46
Tabela 7 – Descrição dos sistemas enzimáticos simulados. ....	49
Tabela 8 – Diedros não identificados pelo programa <i>SwissParam</i> para a molécula TPP e parametrizados separadamente. ....	52
Tabela 9 – Parâmetros diedrais não identificados para o cofator TPP obtidos a partir da estrutura análoga TTPP empregados no campo de força CHARMM27. ....	53
Tabela 10 – Diedros próprios e impróprios não gerados pelo <i>SwissParam</i> e seus diedros análogos na molécula do imazaquin. ....	58
Tabela 11 – Parâmetros diedrais não identificados para a molécula do imazaquin obtidos a partir dos diedros análogos da própria molécula empregados no campo de força CHARMM27. ....	59
Tabela 12 – Cargas atômicas parciais para a molécula do herbicida Imazaquin, seguindo o modelo RESP. ....	61
Tabela 13 – Número médio das ligações de hidrogênio possíveis e seus respectivos tempos de vida para a interação do imazaquin com o solvente ao longo de toda a trajetória. ....	67
Tabela 14– Número de ligações de hidrogênio formadas ao longo da simulação do sistema enzimático na presença do herbicida imazaquin. ....	71
Tabela 15 – Valores médios de energia de interação imazaquin-AHAS obtidos por cálculos de QM/MM Sequencial. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACR – Aminoácidos de Cadeia Ramificada
- AFM – Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy)
- AHAS – Acetohidroxiácido Sintase
- ALS – Acetolactato Sintase
- AM1 – Método Austin 1
- Asp – Aspartato
- Arg – Arginina
- C – Coulomb
- CHARMM – Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
- Da – Dalton
- DFT – Teoria do Funcional de Densidade
- DM – Dinâmica Molecular
- e* – Carga elementar
- EPSPs – 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
- FAD – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
- fs – femtossegundos ( $10^{-15}$  s)
- Gly – Glicina
- HF – Hartree-Fock
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
- IQ – Imazaquin
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
- $K_B$  – Constante de Boltzmann
- $K_m$  – Constante de Ativação
- LH – Ligação de Hidrogênio
- LJ* – Lennard-Jonnes
- Lys – Lisina
- MC – Monte Carlo
- Met – Metionina
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MM – Mecânica Molecular  
MO – Orbital Molecular  
NpT – Ensemble isotérmico-isobárico  
ns – nanossegundos ( $10^{-9}$  s)  
PDB – Protein Data Bank  
PM3 – Método Paramétrico 3  
PME – Particle Mesh Ewald  
PMF – Potencial de Força Média  
pN – pico Newtons  
ps – picossegundos ( $10^{-12}$  s)  
QM/MM – Mecânica Quântica/Mecânica Molecular  
® – Marca Registrada  
Rc – Raio de Corte  
RDF – Função Radial de Distribuição  
RESP – Potencial Eletrostático Restrito (Restrained Electrostatic Potential)  
Rg – Raio de Giro  
RMSD – Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio  
RMSF – Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média  
Ser – Serina  
SMD – Dinâmica Molecular Direcional  
SMT – Microscopia de Tunelamento  
SPC – Single Point Charge  
SPM – Microscopia de Varredura por Sondas  
T – Temperatura  
TIP – Transferable Intermolecular Potentials  
TPP – Tiamina Pirofosfato/Difosfato  
Trp – Triptofano  
UB – Urey-Bradley  
UHF – Hartree-Fock Irrestrito  
UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Ultra Performance Liquid Chromatography)  
VMD – Visual Molecular Dynamics

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	V
<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	XII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	5
2.1 OBJETIVO GERAL .....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3 ASPECTOS TEÓRICOS</b> .....	6
3.1 NANOBIOSENSORES ENZIMÁTICOS .....	6
3.1.1 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	10
3.1.2 Enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS).....	13
3.1.3 Herbicidas Inibidores da enzima AHAS – Imazaquin .....	22
3.2 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	26
3.3 MECÂNICA MOLECULAR (MM) .....	28
3.3.1 Campo de Força CHARMM .....	30
3.3.2 Ferramenta <i>SwissParam</i> .....	33
3.4 DINÂMICA MOLECULAR.....	33
3.4.1 Algoritmo (Leap-Frog).....	35
3.4.2 <i>Ensemble</i> NpT .....	35
3.4.3 Condições Periódicas de Contorno.....	36
3.4.4 Raio de Corte.....	37
3.4.5 Modelos de moléculas de água para solvatação explícita .....	39
3.5 MECÂNICA QUÂNTICA.....	41
3.6 METODOLOGIA HÍBRIDA QM/MM .....	43
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	45
4.1 PARAMETRIZAÇÃO E SIMULAÇÃO MOLECULAR DOS COFADORES DA ENZIMA AHAS .....	45
4.1.1 Parametrização do campo de força dos cofadores da enzima AHAS .....	45
4.1.2 Simulações por Dinâmica Molecular .....	45



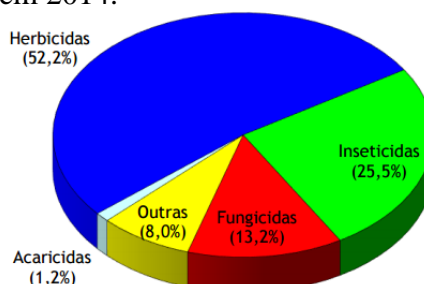
4.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MOLECULAR E PARAMETRIZAÇÃO DOS CAMPOS DE FORÇA PARA O HERBICIDA IMAZAQUIN (IQ).....	47
4.2.1 Otimização conformacional .....	47
4.2.2 Parametrização do campo de força do herbicida imazaquin .....	47
4.2.3 Cálculo das cargas RESP ( <i>Restrained Electrostatic Potential</i> ) .....	47
4.2.4 Simulações por Dinâmica Molecular .....	48
4.3 SIMULAÇÃO DA ENZIMA AHAS E DO SISTEMA AHAS-IQ .....	48
4.4 CÁLCULO DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA ENZIMA AHAS .....	49
4.5 DESCRIÇÃO ATOMÍSTICA E PREVISÕES MOLECULARES NO PROCESSO DE DETECÇÃO DO HERBICIDA PELO NANOBIOSENSOR .....	50
4.5.1 Dinâmica Molecular Direcional e cálculos QM/MM.....	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 PARAMETRIZAÇÃO E SIMULAÇÃO MOLECULAR DOS COFATORES DA ENZIMA AHAS.....	51
5.1.1 Parametrização do campo de força dos cofatores da enzima AHAS .....	51
5.1.2 Simulações por Dinâmica Molecular .....	54
5.2 DESENVOLVIMENTO DE MODELO MOLECULAR E PARAMETRIZAÇÃO DOS CAMPOS DE FORÇA PARA O HERBICIDA IMAZAQUIN (IQ).....	56
5.2.1 Otimização conformacional .....	56
5.2.2 Parametrização do campo de força do herbicida imazaquin .....	57
5.2.3 Cálculo das cargas RESP ( <i>Restrained Electrostatic Potential</i> ) .....	60
5.2.4 Simulações por Dinâmica Molecular .....	62
5.3 SIMULAÇÃO DA ENZIMA AHAS E DO SISTEMA AHAS-IQ .....	67
5.4 CÁLCULO DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA ENZIMA AHAS .....	74
5.5 DESCRIÇÃO ATOMÍSTICA E PREVISÕES MOLECULARES NO PROCESSO DE DETECÇÃO DO HERBICIDA PELO NANOBIOSENSOR .....	77
5.5.1 Dinâmica Molecular Direcional e cálculos QM/MM.....	77
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>7 TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>83</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população mundial veio acompanhado de uma maior demanda por alimentos fazendo com que, desde o século XIX, a produção fosse aprimorada, como resultado do uso de maquinários mais modernos e de agroquímicos mais eficientes (JHA et al., 2011; MOUSAVI; REZAEI, 2011).

No Brasil, o atual modelo agrário baseia-se em monocultivos para exportação que fazem uso intenso de tecnologias mecanizadas e de agroquímicos. Não por menos o país é hoje o maior consumidor mundial de agrotóxicos (PORTO; SOARES, 2012). De acordo com dados de 2015 do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), o país mostrou, na última década, uma tendência crescente no uso de defensivos agrícolas. Em 2014, as cifras movimentadas por esse mercado ultrapassaram os 12 bilhões de dólares. Conforme apresentado no gráfico da Figura 1, merece destaque nesse mercado a classe dos herbicidas: defensivos destinados ao combate do florescimento de ervas daninhas, visto que quando aplicados às plantas, reagem com seus constituintes morfológicos ou interferem em seus sistemas bioquímicos, causando efeitos morfológicos ou fisiológicos de graus variáveis, resultando na morte total ou parcial das mesmas (CARVALHO, 2013).

Figura 1 – Participação das classes de defensivos agrícolas na quantidade vendida, em Produto Comercial no Brasil, em 2014.



Fonte: SINDIVEG. Dados Básicos. São Paulo, 2015.

No entanto, o uso indiscriminado e inadequado desses pesticidas tem deixado os ecossistemas vulneráveis às ações desses compostos altamente tóxicos (GOODLAND, 1997) trazendo uma série de transtornos e modificações para o ambiente. Os problemas estão associados à contaminação direta ou por efeitos cumulativos nos componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas, ou ainda, à exposição humana a esses contaminantes acarretando efeitos nocivos à saúde (COLOSIO; MORETTO, 2008; PERES; MOREIRA, 2007).

Dessa forma, torna-se primordial a detecção e quantificação desses agroquímicos empregados nas culturas valendo-se de técnicas analíticas, dentre as quais as mais empregadas são: cromatografia líquida de alta e/ou ultra eficiência (HPLC e UPLC) (FENOLL et al., 2012; GHOBADI; YAMINI; EBRAHIMPOUR, 2015; LI et al., 2016), cromatografia gasosa (GC) (KUMAZAWA et al., 1995; TADEO; SÁNCHEZ-BRUNETE, 2013) e espectrometria de massas (MS) (DONG et al., 2016; GOSCINNY, et al., 2012). No entanto, esses estudos deparam-se com problemas analíticos complexos ocasionados pela gama de substâncias existentes a serem determinadas, em geral, presentes em nível de traços (MARQUES; MARQUES; NUNES, 2006). Sendo assim, é necessária a busca por metodologias alternativas a serem empregadas na detecção de herbicidas, sendo promissor o uso de biossensores (DING et al., 2014; ESPINOZA et al., 2014; LEE, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Um biossensor é um dispositivo que contém um sistema de bioreconhecimento – estruturas como enzimas, anticorpos, DNA, células, microrganismos, entre outros – associado a um transdutor físico-químico que converte o sinal obtido da interação do componente biológico com o analito de interesse em um sinal útil e quantificável, ou seja, em um sinal elétrico proporcional à concentração da espécie investigada (BĂNICĂ, 2012; FILHO; CAPELATO, 1992). Um das etapas primordiais na elaboração de um biossensor é a escolha do bioelemento a fim de que este forneça elevado grau de seletividade e/ou especificidade, para a substância ou grupo/classe de substâncias de interesse, de modo que a partir daí seja feita a escolha do transdutor adequado, dentro da faixa de medida (THÉVENOT et al., 2001). Isso porque a partir da combinação física bem sucedida desses dois elementos é possível criar, em nível molecular, um ambiente semelhante àquele em que o componente biológico opera em condições fisiológicas (SIGRIST; GAO, 1999).

Um dos critérios de classificação desses biossensores refere-se ao material de reconhecimento empregado (ARORA, 2013). Quando o elemento biológico utilizado para interagir com o analito de interesse é uma enzima tem-se um biossensor enzimático. Esses sensores são baseados no princípio da inibição enzimática pelo analito, monitorando-se a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor (AMINE et al., 2015). Historicamente, o primeiro sensor desse tipo foi apresentado, em 1962, por Guilbault e colaboradores (GUILBAULT, G; KRAMER, D; CANNON, 1962). No entanto, são recentes os maiores esforços no desenvolvimento e compreensão desses dispositivos analíticos para aplicação nas mais diversas áreas.

A classificação do biossensor pode ser extrapolada considerando-se a escala métrica de operação. Em vias de priorizar maior sensibilidade e seletividade do sensor, torna-se viável a miniaturização de suas partes sensoriais, fazendo com que a operação de detecção do analito seja realizada em escala nanométrica com o auxílio da Nanotecnologia, de modo que os eventos investigados sejam compreendidos numa escala que varia de 1 a 100 nm. Nesse contexto, tem-se o grupo de técnicas de Microscopia de Varredura por Sondas, SPM (do inglês, *Scanning Probe Microscopy*). Em especial a Microscopia de Força Atômica, AFM (do inglês, *Atomic Force Microscopy*) que tem ganhado destaque pela sua operação de varredura da superfície de estudo utilizando sondas (ponteira + cantilever) de tais dimensões (WEEKS, 2008). Estudos recentes apontam para o avanço da aplicação do AFM no reconhecimento molecular de moléculas alvo, para desenvolvimento de nanobiossensores. Para tanto, utiliza-se micro-cantilevers (hastes flexíveis) e técnicas de modificação química da superfície da ponteira (*tip*), suportadas pela Ciência dos Materiais, por meio da sua funcionalização com agrupamentos químicos específicos que promovam uma ligação covalente para imobilizar ou adsorver, de forma efetiva, uma molécula sensorial (elemento de reconhecimento biológico) (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Neste contexto, pode-se utilizar nanobiossensores enzimáticos para detectar uma classe de herbicidas que seja inibidora da atividade de uma enzima específica. Isso pode ser realizado pela imobilização da enzima (camada receptora) na ponteira de um biossensor do tipo AFM, a fim de que essa estabeleça uma interação com a amostra a ser analisada o que resulta na deflexão do cantilever. Essa deflexão, resultado da força interatômica entre a enzima e o analito, é diretamente proporcional à concentração do pesticida. Dessa forma, esses dispositivos de detecção podem ser úteis no monitoramento de herbicidas nas culturas para avaliar seus níveis de concentração, de modo que os mesmos se enquadrem nos limites estabelecidos pela legislação vigente no país ou, até mesmo, pelo mercado mundial no tocante à qualidade dos alimentos oriundos do campo.

A enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), é essencial na fase inicial do processo de metabolização dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (MAZUR; FALCO, 1989). É justamente esse o alvo primário de ação de diferentes classes de herbicidas, dentre as quais cita-se as sulfonilureias, imidazolinonas, triazolopirimidinas e pirimidiloxitiobenzoatos (CHRISTOFFOLETI, 1997) . Sendo assim, ao se utilizar essa enzima como elemento de biorreconhecimento em nanobiossensores do tipo AFM, pode-se realizar a detecção de qualquer uma das classes de herbicidas supracitados. Baseando-se no trabalho de Leite e

Colaboradores (2013), que desenvolveram o biossensor para um herbicida representante da classe das sulfonureias (DA SILVA et al., 2013), o presente trabalho propõe um biossensor para herbicidas da classe das imidazolinonas.

A análise da viabilidade de construção e a fabricação desses nanobiossensores otimizados requer um conhecimento, *a priori*, de várias características. Logo, valendo-se das técnicas de modelagem molecular é possível descrever, em nível atômico, as propriedades de tal sistema molecular (LEACH, 2001). Utilizar métodos teóricos computacionais torna-se uma alternativa extremamente útil haja visto que é possível simular o processo de detecção do herbicida pelo biossensor a partir da funcionalização da ponteira do AFM com a enzima AHAS, a partir do conhecimento da interação entre substrato e sítio catalítico da enzima, de modo a sugerir as condições ideais para o seu funcionamento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Simular computacionalmente, em nível molecular, o funcionamento de um nanobiossensor enzimático durante o processo de detecção do herbicida imazaquin, inibidor da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), visando propor um mecanismo de funcionamento e subsidiando o desenvolvimento desse novo biossensor.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de propor computacionalmente o biossensor, conforme mencionado acima, o presente trabalho apresentou os seguintes objetivos específicos:

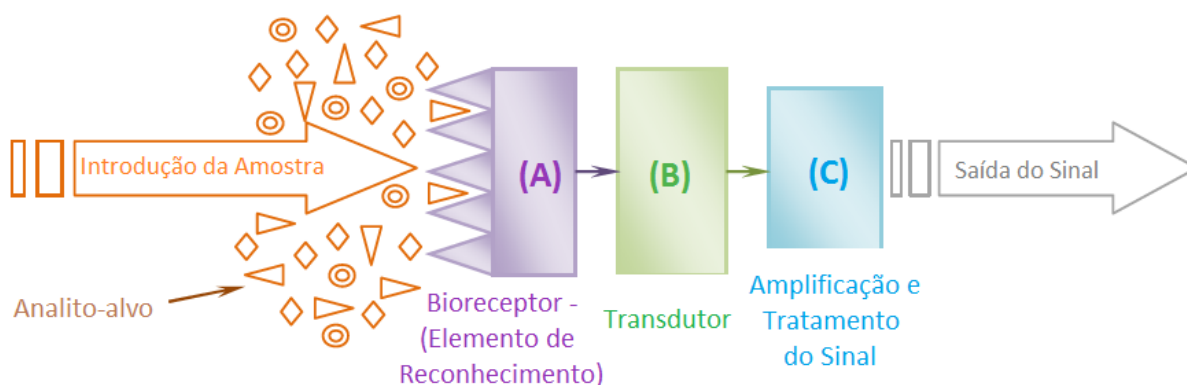
- Estudar os cofatores da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS);
- Simular a dinâmica estrutural da enzima AHAS em solução aquosa com todos os seus cofatores;
- Criar um modelo atômico do herbicida imazaquin, inibidor da atividade enzimática da AHAS e validar essa metodologia de parametrização;
- Descrever as interações específicas entre o herbicida e a enzima AHAS em fase condensada;
- Simular o processo de detecção do herbicida pelo nanobiossensor para propor um mecanismo de funcionamento, calculando sua força e energia de interação.

### 3 ASPECTOS TEÓRICOS

#### 3.1 NANOBIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), um “biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento transdutor”. A Figura 2 ilustra a organização dos componentes funcionais desses dispositivos.

Figura 2 – Configuração básica de um biossensor.



Fonte: Adaptado de (CALIL, 2011)

As variações na natureza do composto de biorreconhecimento e/ou no sistema de transdução utilizados possibilitam inúmeras estratégias alternativas no desenvolvimento de biossensores, cada qual apresentando soluções para problemas analíticos nas mais diversas áreas de aplicação. Dessa forma, a classificação desses biossensores é realizada baseando-se no componente biológico e no transdutor, visto que as escolhas adequadas dos mesmos dependem das propriedades da amostra a ser analisada e da natureza da grandeza física a ser medida. Na Tabela 1 é apresentada uma esquematização da classificação dos biossensores de acordo com esses dois critérios.

Tabela 1 – Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível e o transdutor utilizado.

Biossensor	Biorreceptor
Imunossensor	Anticorpo/Antígeno
Sensor Celular	Células
Sensor Enzimático	Enzimas
Sensor Microbiológico	Microorganismos
Sensor Tecido	Tecidos Animais ou Vegetais
Sensor Organela	Organelas
Biossensor/Transdutor	Grandeza Física Resultante
Amperométrico	Corrente Elétrica
Calorimétrico	Calor
Condutimétrico	Condutância
Mecânico	Deslocamento/Movimento
Ótico	Variação de Luminosidade/Índice de Refração
Piezoelétrico	Variação de Massa
Potenciométrico	Diferença de Potencial (Voltagem)

Fonte: (FILHO; CAPELATO, 1992; SALGADO, 2001)

Resumidamente, torna-se possível dizer que a viabilidade de construção de um biossensor está intrinsicamente relacionada à seletividade do elemento biológico para reconhecimento do analito de interesse, e a sensibilidade do transdutor em converter o sinal obtido dessa interação em um sinal quantificável. Sendo assim, durante a etapa de seleção do elemento de biorreconhecimento é necessário analisar diversas características tais como:

- Disponibilidade do sítio ativo para reagir/interagir com a espécie analisada;
- Estabilidade química e física frente às condições do meio;
- Possibilidade de sofrer modificações ou serem imobilizadas sem que tenham seu desempenho afetado (SALGADO, 2001).

Em virtude de se adequar a essas características é que a grande maioria dos biossensores desenvolvidos utiliza enzimas como componente biológico (DU; ZHOU; CAI, 2008). De acordo com Lehninger (1989), enzimas são compostos biológicos formados em sua



maioria por proteínas cujo principal papel é o de biocatalisadores. Dessa forma, em função da elevada especificidade de seu sítio ativo com a molécula de substrato, as mesmas são responsáveis pela diminuição da energia de ativação e, portanto, a aceleração de diversas reações metabólicas sob diversas condições fisiológicas de pH e temperatura (NELSON; COX, 2011).

Considerando-se o exposto até então são inegáveis as vantagens de aplicar enzimas como componente biológico. No entanto, há obstáculos práticos relacionados à sua aplicação nesses dispositivos, para emprego nos setores industriais e na pesquisa científica. A dificuldade principal está relacionada à solubilização dessas enzimas nos meios reacionais e a sua posterior retirada para reutilização ou adição de uma nova enzima a cada nova medida tornando as análises demasiadamente dispendiosas (NUNES; JEANTY; MARTY, 2004). No entanto, esse problema tem sido contornado aplicando-se a técnica de imobilização. Esse processo consiste na fixação do material biológico no suporte do transdutor, ou seja, na insolubilização da enzima (COULET; BLUM, 1991; FILHO; CAPELATO, 1992). A comparação entre as características de uso das enzimas nas formas livre e imobilizada encontra-se apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação das características desejáveis das formas livre e imobilizada do componente biológico, para aplicação em biossensores enzimáticos.

Característica	Forma Livre	Imobilizadas
Estabilidade	Menor	Maior
Reutilização	Não ocorre	Ocorre
Tempo de uso e armazenamento	Menor	Maior
Custo	Maior	Menor
Atividade	Fácil inativação em função de fatores biológicos, químicos e físicos	Variável

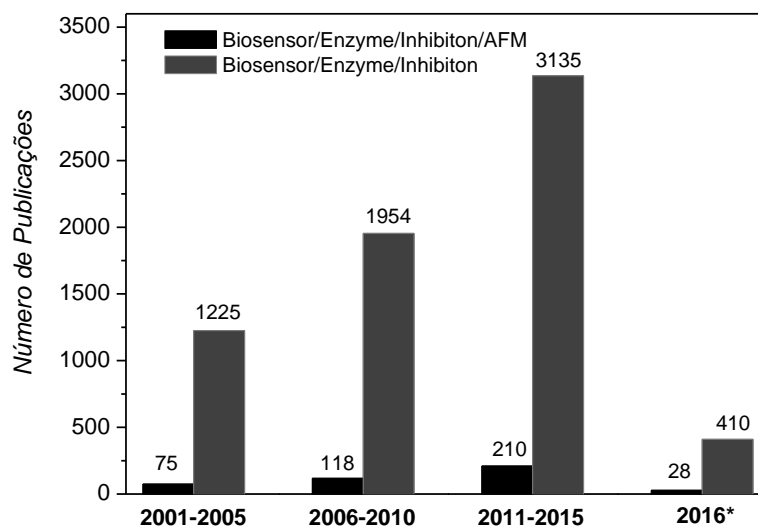
Fonte: (COULET; BLUM, 1991; FILHO; CAPELATO, 1992)

Em se tratando da escolha do transdutor, uma opção ainda pouco explorada, mas que tem se mostrado eficiente, são os sensores baseados em ponteiros associadas a cantilevers como os utilizados em Microscopia de Força Atômica (AFM) - maiores detalhes a respeito

dessa técnica serão abordados na Seção 3.1.1, ou seja, dispositivos sensoriais com mecanismo de transdução mecânica. A escolha desse tipo de sistema se baseia na possibilidade de utilização de um método de análise promissor que permite a detecção de diferentes analitos mapeando interações intermoleculares específicas com os agrupamentos funcionais do substrato em escala micro e nanométrica o que acaba conferindo maior sensibilidade à técnica (DA SILVA et al., 2013, 2014; MORAES et al., 2015). É por essa escala de operação que se extrapola a definição de “biossensores” para “nanobiossensores” enzimáticos.

Esses dispositivos constituem uma área multidisciplinar e, por isto, são desenvolvidos para as mais diversas aplicações, tais como: saúde e medicina (D’ORAZIO, 2003), controle de processos industriais (BAEUMNER, 2003; YU et al., 2005), garantia da qualidade de produtos alimentícios (TERRY; WHITE; TIGWELL, 2005) e monitoramento da qualidade ambiental (RODRIGUEZ-MOZAZ; LOPEZ DE ALDA; BARCELO, 2006). Conforme já mencionado na Seção 1, desde a década de 60 diversos biossensores enzimáticos tem sido desenvolvidos. No entanto, são recentes os maiores esforços em aperfeiçoar esses dispositivos a fim de que sejam utilizadas nas áreas supracitadas atendendo aos interesses dos setores industriais. O gráfico a seguir mostra o número de publicações científicas que apresentam como assunto central esses dispositivos analíticos.

Figura 3 – Número de trabalhos publicados na área nos últimos quinze anos utilizando-se a base de dados *ScienceDirect*. \*Trabalhos publicados/aceitos para publicação até 14 de março/2016.



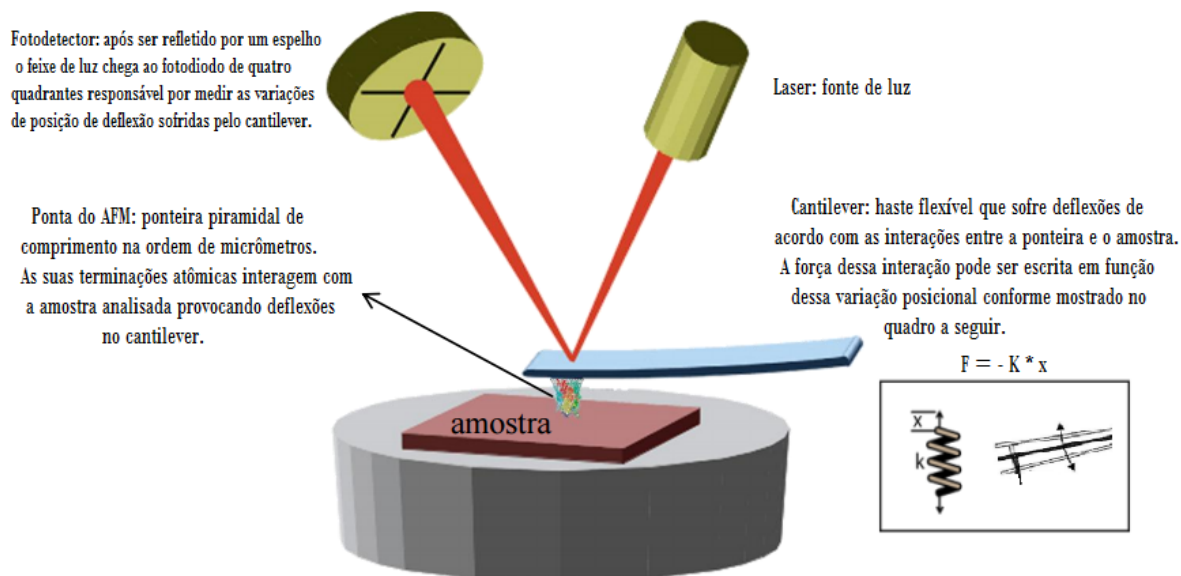
Fonte: Autor - *ScienceDirect*.

Os dados apresentados no gráfico foram obtidos pelo sistema de busca de artigos da base de dados *ScienceDirect* utilizando as palavras-chave “biosensor”, “enzyme”, “inhibition” para a tendência geral e as mesmas palavras-chave acrescidas de “atomic force microscopy” para o objeto de estudo do presente trabalho. O gráfico faz uma comparação entre o quantitativo de *papers*, dos últimos 15 anos, que apresentam como tema principal os biossensores baseados em inibição enzimática como um todo e aqueles que utilizam a técnica de microscopia de força atômica para a detecção do analito. Conforme apresentado na Figura 3 é possível observar, nos dois casos, uma tendência crescente, durante o período analisado, indicando assim o interesse pelo estudo desses dispositivos em diversas universidades e institutos de pesquisa em nível mundial. Nota-se ainda que os biossensores enzimáticos que se valem da AFM ainda correspondem a uma parcela pequena dentro do contexto geral tornando-se assim um promissor objeto de estudo.

### 3.1.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Em 1981, Binning e Rohrer conciliaram a elevada resolução dos microscópios de varredura e de transmissão (MEV e MET) com a possibilidade de obter imagens em meio aquoso dos microscópios ópticos, ao apresentarem a técnica conhecida como Microscopia de Varredura por Tunelamento- SMT (do inglês, *Scanning Tunneling Microscopy*) (BEVERIDGE; KOVAL, 1981). Esta técnica é útil no imageamento de superfícies de substâncias condutoras de elétrons, sendo pioneira na implementação da ciência e engenharia em nanoescala. Como continuidade no avanço das técnicas nanométricas, cinco anos depois, os pesquisadores Binning, Quate e Gerber inventaram o Microscópio de Força Atômica – AFM (do inglês, *Atomic Force Microscopy*), também conhecido com SFM (do inglês, *Scanning Force Microscopy*) (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986), que produz imagens de superfícies condutoras e não condutoras, como por exemplo, metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes (OHNESORGE; BINNIG, 1993). Dentro da classe das microscopias esses instrumentos (SMT e AFM) formam juntos um novo conjunto conhecido como SPM's (do inglês, *Scanning Probe Microscopies*) (CHICHESTER, 1998). A Figura 4 ilustra os componentes básicos do sistema de microscopia de força atômica e suas respectivas funções.

Figura 4 – Diagrama esquemático dos principais componentes de um microscópio de força atômica.



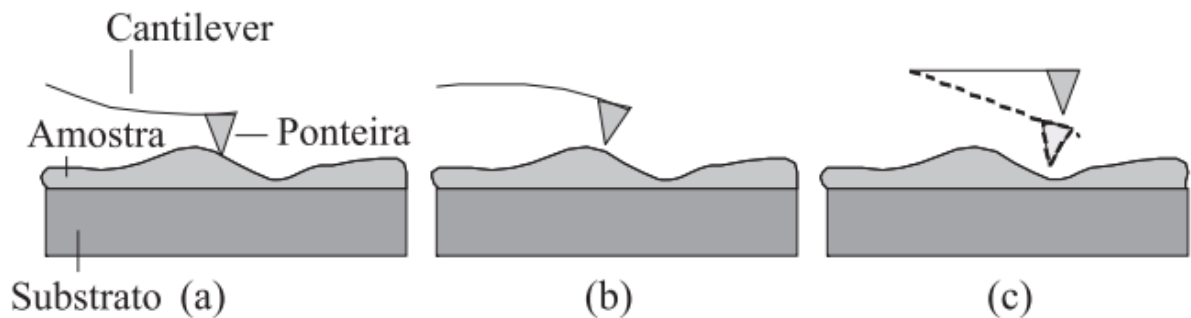
Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA, 2013)

Além de suas aplicações topográficas, a microscopia de força atômica pode ser aplicada em sistemas de sensoriamento de amostras em escala nanométrica. Valendo-se das técnicas de modificação química das ponteiros do microscópio de força atômica e dos microcantilevers, é possível identificar e quantificar diferentes analitos. Esses são os nanobiossensores de ponta de AFM. Nesses dispositivos, a detecção ocorre por meio do reconhecimento molecular da interação entre a ponteira do cantilever com um substrato específico ou entre a molécula imobilizada no topo da ponteira modificada com o analito de interesse (CHICHESTER, 1998). A resposta a esta interação é dada pela força responsável pela deflexão do cantilever, que atua como um transdutor de força, em função da distância que este é mantido da superfície da amostra. Com base nessa distância é que são diferenciados os modos de operação na técnica de AFM que se encontram descritos em maiores detalhes a seguir e ilustrados na Figura 5.

- Modo contato: a distância entre o cantilever e a superfície da amostra é de poucos ângstrons (Å), gerando imagens de excelente resolução e fazendo prevalecer forças repulsivas de van der Waals. O contato existente faz com que, por vezes, a amostra seja danificada;

- Modo de não-contato: a distância entre o cantilever e a superfície da amostra varia entre dezenas e centenas de ângstrons (Å), gerando imagens de resolução mais baixa e fazendo prevalecer forças atrativas eletrostáticas e de van der Waals. Sem os efeitos de atrito entre a ponteira e a amostra, seu dano não ocorre;
- Modo intermitente (*tipping mode*): contorna os problemas de baixa resolução e da prevalência das forças adesivas do modo de não-contato e do contato constante existente no modo contato ao se valer de uma ponteira vibrante que fica mais próxima da amostra (CHICHESTER, 1998).

Figura 5 – Representação esquemática dos modos de operação do AFM: contato (a), não-contato (b) e intermitente (c).



Fonte: (FERREIRA; YAMANAKA, 2006)

Conforme mostrado previamente na Figura 4, a força de interação entre a ponteira e a superfície da amostra é que provoca a deflexão do cantilever, de modo, que essas duas grandezas são diretamente proporcionais e estão relacionadas pela Lei de Hooke apresentada na Equação 1:

$$F = -k \cdot \Delta x \quad (1)$$

onde,  $F$  é a força de interação,  $k$  constante de mola (*spring constant*) característica de cada cantilever,  $\Delta x$  é a deflexão sofrida pelo cantilever (BOWEN; HILAL, 2009).

Para que as medidas dessas interações específicas sejam realizadas com precisão é necessária a realização da modificação química da ponteira do AFM, ou seja, a sua funcionalização com grupos moleculares bem definidos. No presente caso, a enzima, cuja ação é inibida pelo herbicida a ser detectado, é imobilizada por adsorção na superfície da ponteira do AFM, de modo que os grupamentos funcionais do sítio ativo estejam disponíveis

para interação com o agroquímico, conferindo maior sensibilidade à análise. As forças responsáveis por essa interação específica enzima-herbicida são forças fracas, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals – estas últimas mais comumente associadas a técnica de AFM (MÜLLER et al., 1996). Dessa forma, a aplicação do método de imobilização mais adequado, a fim de garantir que os grupamentos chave estejam disponíveis para promoverem as ligações, é uma etapa crítica na projeção de um nanobiossensor enzimático. Isso pode ser conseguido valendo-se das técnicas de modelagem molecular que descrevem em escala atômica os eventos envolvidos nessa interação e que, portanto, serão utilizadas no presente trabalho.

O presente grupo de pesquisa e colaboradores apresentaram, em estudos recentes que são a base para este trabalho, a aplicabilidade das técnicas de modelagem molecular no design de nanobiossensores e sua correlação com estudos experimentais. Inicialmente, Franca et al. (2011) estudaram a funcionalização da ponteira do AFM com a enzima ACCase (monômero e dímero) para detecção dos herbicidas atrazina e diclofop. Esse estudo apresentou as bases metodológicas que norteiam essa linha de pesquisa e mostrou a utilização das técnicas de modelagem molecular na predição de propriedades estruturais e eletrostáticas de biomoléculas utilizadas em biossensores. Os cálculos foram validados com dados prévios de curvas de força do AFM indicando a seletividade desse como dispositivo de sensoriamento. Posteriormente, Deda et al. (2013) consolidaram, com dados experimentais, a efetividade da funcionalização da ponteira do AFM utilizando a enzima ALS para detecção de agroquímicos. Mais recentemente, um modelo teórico-computacional para a ponteira do AFM funcionalizada foi proposto por Oliveira et al. (2013) assim como o tratamento geométrico e matemático denominado de “Modelo Rígido” para calcular a área superficial disponível e o número de enzimas necessárias para recobrimento da superfície da ponteira (AMARANTE et al., 2014). Ademais, vale considerar ainda que estudos similares tem sido desenvolvidos para a detecção do herbicida glifosato, o herbicida mais utilizado em escala mundial, pela sua interação específica com a enzima EPSPs.

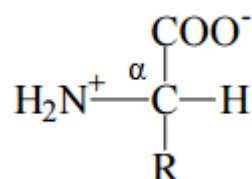
### 3.1.2 Enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS)

Dentre as macromoléculas biológicas, as proteínas são as mais abundantes, pois estão no centro da ação dos processos biológicos, sendo encontradas em todas as células. O termo

proteína vem do grego, *proteios*, e significa primário. Tal terminologia foi adotada por G. J. Mulder (1983) ao denominar uma classe de compostos naturais contendo o elemento químico nitrogênio, e que são essenciais à nutrição animal (VOET, D; VOET, J. G.; PRATT, 2008).

As proteínas são constituídas por unidades estruturais, os aminoácidos. Todos eles apresentam em comum os grupamentos amino e carboxil ligados a um carbono  $\alpha$  e se distinguem uns dos outros pela cadeia lateral (grupo R), que afeta suas propriedades, conforme apresentado na Figura 6 (NELSON; COX, 2011).

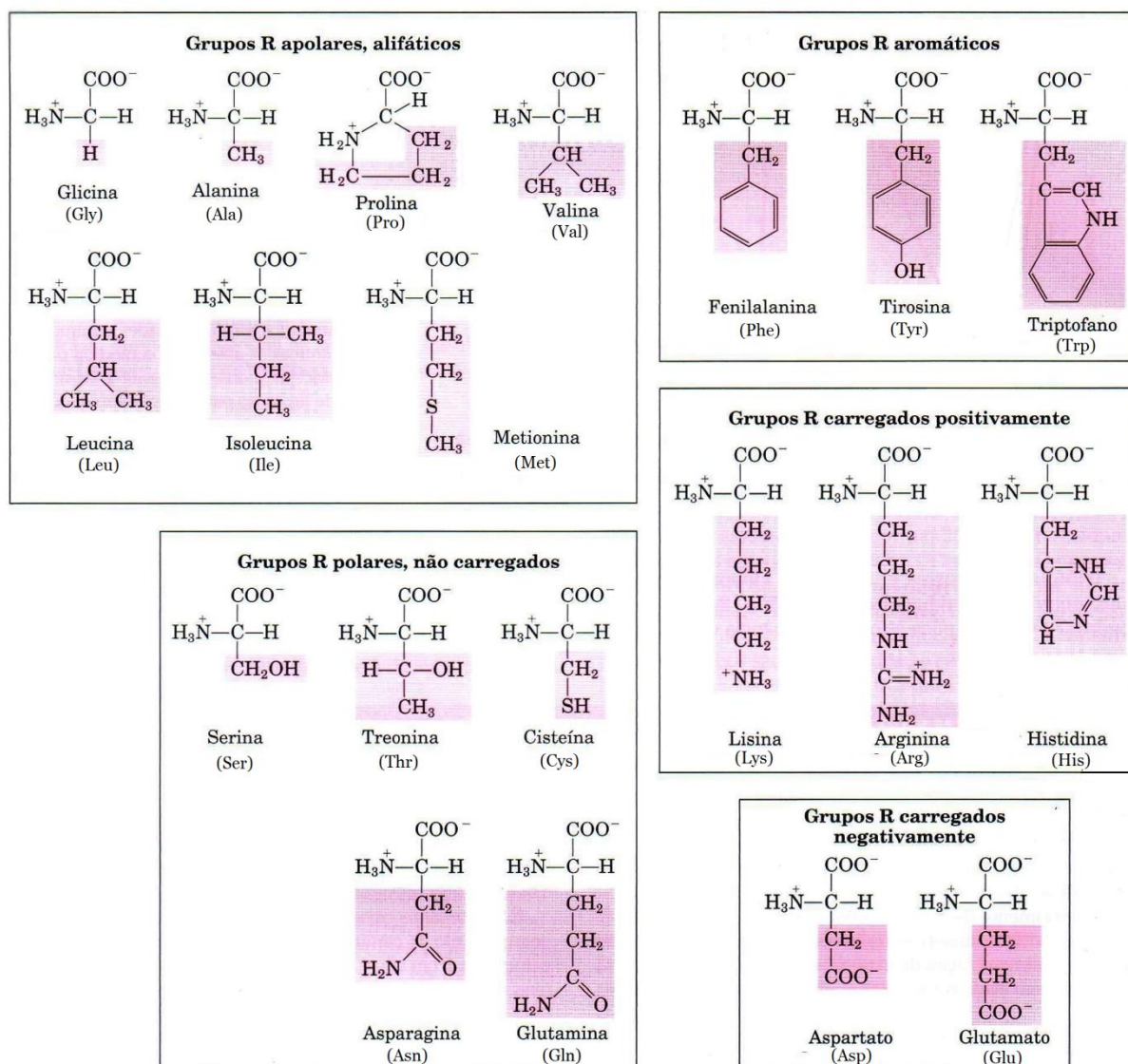
Figura 6 – Estrutura geral dos  $\alpha$ -aminoácidos.



Fonte: Autor

Ao todo, os aminoácidos abrangem 20 estruturas fundamentais usadas pelas células para formarem as proteínas. São os chamados  $\alpha$ -aminoácidos. Conforme observado, o carbono alfa está covalentemente ligado a quatro grupos distintos o que o torna centro quiral, ou seja, há para cada uma dessas estruturas dois estereoisômeros (L- e D-) que são capazes de desviar o plano da luz polarizada. Na Figura 7 estão apresentadas as estruturas dos aminoácidos, classificadas de acordo com as características fundamentais do grupo R (NELSON; COX, 2011).

Figura 7 – Estruturas covalentes dos 20 aminoácidos mais comuns encontrados em proteínas, apresentadas em seu estado de ionização predominante em pH neutro, classificadas de acordo com a característica química do agrupamento R (porções sombreadas).



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

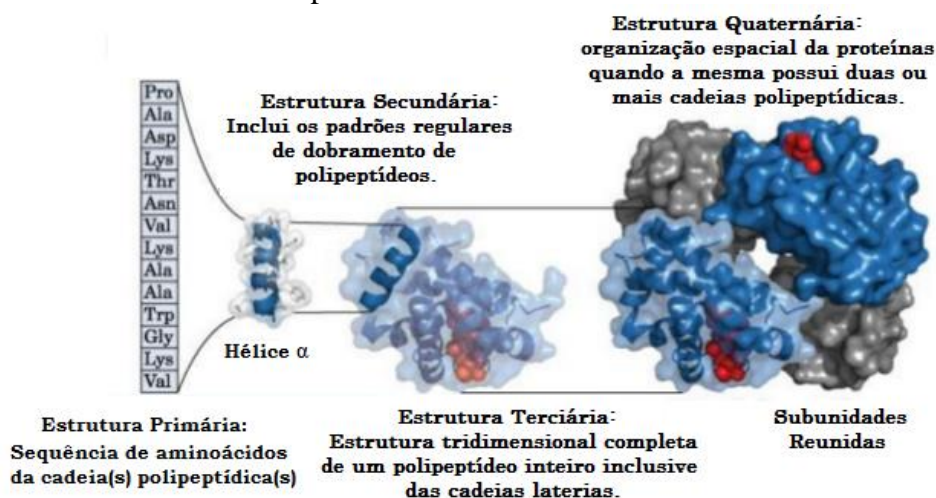
Torna-se possível observar que em  $\text{pH} = 7,0$  todos os aminoácidos encontram-se na forma iônica, na qual os grupamentos amino e carboxil estão carregados positiva e negativamente, respectivamente. Isso se deve a uma particularidade do comportamento químico dessas estruturas: o caráter zwitteriônico. Isso significa que em solução aquosa nas condições fisiológicas essas estruturas podem se comportar como ácido (doador de prótons) ou como base (receptor de prótons) (SOLOMONS, 2005).

A ligação entre duas moléculas de aminoácidos ocorre por meio de uma reação de condensação, em que o agrupamento  $\alpha$ -amino de uma se liga ao agrupamento  $\alpha$ -carboxil da





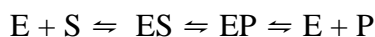
Figura 9 – Níveis da estrutura das proteínas.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

As enzimas são, em sua grande maioria, de natureza proteica, e constituem uma classe importante de macromoléculas, pois são as responsáveis por catalisar com eficiência e seletividade as reações bioquímicas essenciais à vida no planeta. A propriedade característica das reações enzimaticamente catalisadas é a de que essas ocorrem confinadas em uma região específica da enzima, denominada sítio ativo, de modo que alguns aminoácidos específicos participam diretamente do processo catalítico.

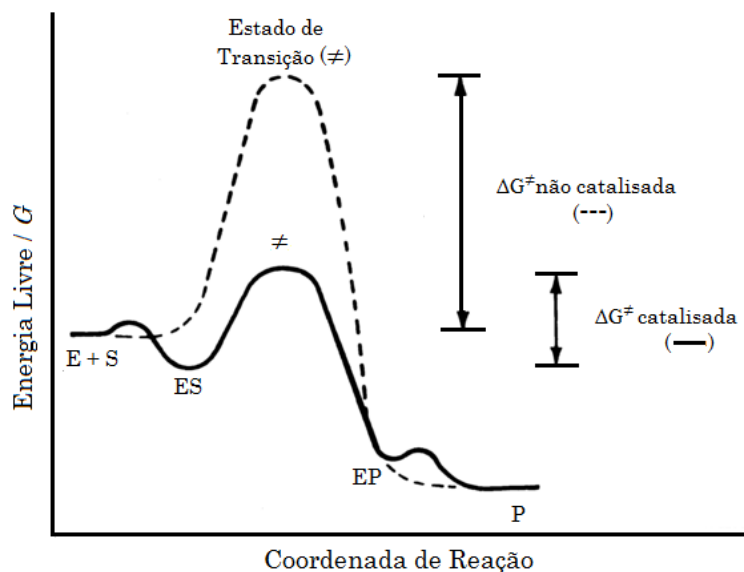
Conforme proposto por Michael Polanyi (1921) e Haldane (1930) uma reação enzimática simples pode ser descrita conforme o esquema reacional:



onde a enzima (E) reconhece e se liga ao substrato (S), formando o complexo transitório ES. Em seguida, o substrato é convertido no produto final da reação, de modo que, ao final da reação a enzima é recuperada do complexo molecular enzima-produto final (EP), liberando, assim, o produto final (P) da reação (ALBERTS et al., 2002; MALAJOVICH, 2009; NELSON; COX, 2011).

No estado de transição da reação, a espécie intermediária (ES) é formada pelo estabelecimento de uma série de interações fracas como, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas sendo, portanto, a força propulsora do processo de catálise enzimática por ocasionar a liberação da energia livre de Gibbs e diminuir a energia de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) da reação, conforme apresentado no gráfico da Figura 10.

Figura 10 – Energias de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) das reações não catalisada e catalisada por enzima em função da coordenada de reação.



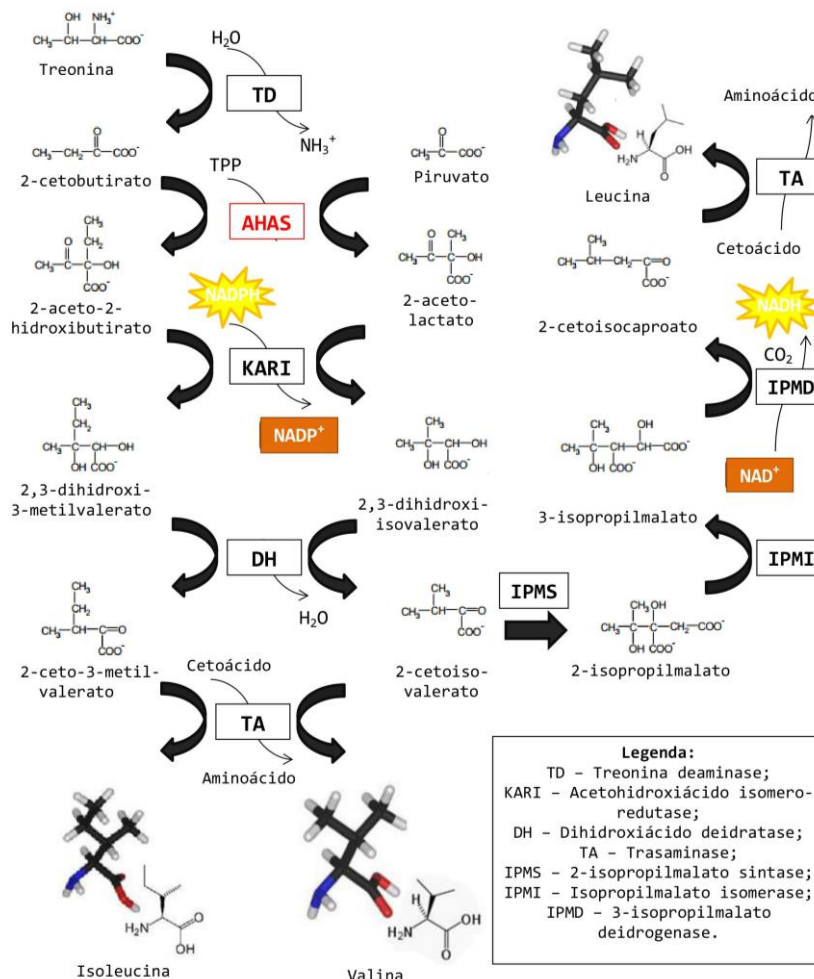
Fonte: Autor

A enzima acetohidroxiácido sintase (do inglês, *acetohydroxyacid synthase*, AHAS) é fundamental na rota biossintética dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) valina, leucina e isoleucina. Comumente, as nomenclaturas acetohidroxiácido sintase e acetolactato sintase (do inglês, *acetolactate synthase*, ALS) são encontradas na literatura como sinônimas. No entanto, a AHAS corresponde à forma anabólica envolvida na síntese dos aminoácidos supracitados, enquanto a ALS se refere à forma catabólica da enzima responsável pela fermentação do 2,3-butanodiol e compostos afins (GOLLOP et al., 1990). Além disso, reações que não envolvem redução nem oxidação e são catalisadas pela AHAS requerem a molécula do dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) como cofator (*FAD-dependent*), enquanto a atividade catalítica da forma ALS da enzima é independente do mesmo (STÖRMER, 1968). Vale colocar ainda que enquanto a ALS é encontrada apenas em alguns microrganismos a AHAS já foi identificada e sequenciada em uma grande variedade de espécies de plantas, fungos, algas e bactérias (DUGGLEBY; PANG, 2000).

A enzima AHAS está envolvida na etapa inicial da rota de biossíntese dos ACR que apresenta uma característica particular: etapas paralelas ocorrem na formação da valina e da isoleucina. Essa participação no início da rota é de extrema importância, pois são essas reações que determinarão a extensão da cadeia carbônica ligada ao aminoácido sintetizado. A

Figura 11 ilustra o mecanismo de catálise da AHAS apresentando todas as estruturas envolvidas na rota biossintética.

Figura 11 – Via da síntese dos ACR catalisada pela enzima AHAS.



Fonte: Autor

A AHAS é composta por uma subunidade catalítica que apresenta todos os mecanismos necessários para a efetividade do processo catalítico, e possui peso molecular de aproximadamente 65 kDa, e por uma outra subunidade de menor tamanho com função regulatória e peso molecular variando entre 9 e 54 kDa, de acordo com a espécie de origem. A subunidade regulatória é a responsável por estimular a atividade e permitir a inibição enzimática pelos produtos finais, os ACR (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008; MCCOURT et al., 2006). Uma característica comum entre ambas é a terminação da cadeia peptídica com um agrupamento amino (N-terminal) responsável pelo transporte da proteína

até as mitocôndrias ou cloroplastos nos fungos e plantas, respectivamente, para que desempenhem sua função (DUGGLEBY; MCCOURT; GUDDAT, 2008).

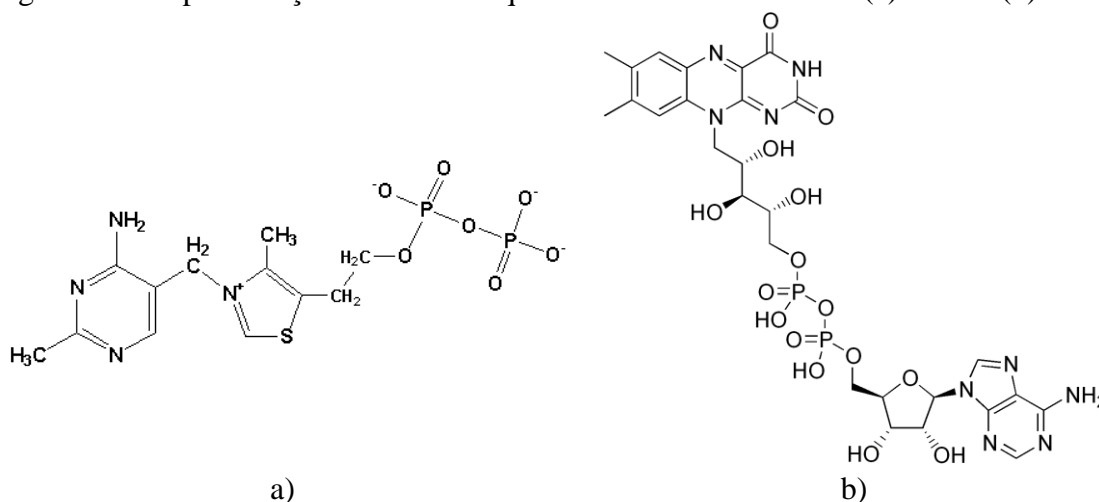
Algumas enzimas para exercer sua atividade catalítica necessitam apenas das cadeias de aminoácidos, no entanto, outras requerem a presença de cofatores que podem se tratar de íons metálicos e/ou moléculas orgânicas complexas (coenzima). A AHAS tem sua ação dependente de três cofatores: o íon inorgânico  $Mg^{2+}$ , a Tiamina Difosfato (TPP, do inglês *Thiamin Diphosphate*) e o Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD, do inglês *Flavin Adenine Dinucleotide*).

- Tiamina Difosfato (TPP): também denominada de Tiamina Pirofosfato, esse cofator encontra-se no centro do sítio ativo da enzima, ou seja, na interface de contato entre os dois monômeros (A e B). Esse cofator interage com o íon metálico  $Mg^{2+}$  através de interações do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio (PANG; DUGGLEBY; GUDDAT, 2002). Nos experimentos, em geral, é incluído em concentrações da ordem de 50  $\mu M$  (DUGGLEBY; PANG, 2000), de modo que a constante de ativação ( $K_m$ ) é 25  $\mu M$  para a enzima AHAS da espécie *Arabidopsis thaliana* (CHANG; DUGGLEBY, 1998) cuja estrutura tridimensional obtida experimentalmente será utilizada no presente trabalho.
- Íon metálico divalente: todas as enzimas dependentes da TPP tem em comum o fato de requerem um íon metálico divalente para a manutenção das suas atividades. No caso da AHAS, trata-se do íon  $Mg^{2+}$  cuja função principal é “ancorar” a TPP à estrutura da enzima visto que coordena-se a dois átomos de oxigênio de grupos fosfato da molécula de TPP e a duas cadeias laterais de aminoácidos (HAWKINS; BORGES; PERHAM, 1989). Apesar da dificuldade observada em relação à remoção completa de íons metálicos da estrutura enzimática, é possível observar que, de modo semelhante ao TPP, há uma dependência hiperbólica da atividade catalítica da AHAS em relação a esse cofator, ou seja, a enzima se torna praticamente inativa na sua ausência e tem sua atividade completamente restaurada em relação à inicial quando o íon é novamente adicionado (DUGGLEBY; PANG, 2000) – constante de ativação em relação a esse cofator para a espécie enzimática aqui tratada é de 64  $\mu M$  (CHANG; DUGGLEBY, 1998).
- Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD): como as reações catalisadas pela AHAS não envolvem transferência de elétrons sabe-se que o FAD não participa das reações principais e torna-se incomum a sua necessidade como cofator (DUGGLEBY; PANG,

2000). Mesmo assim, é conhecida a relação entre a sua presença e a dependência da atividade e da integridade estrutural da enzima (elevada afinidade resultado de sua ligação estabelecida por intermédio de numerosas ligações de hidrogênio e interação de van der Waals), apesar de o  $K_m$  para a espécie enzimática em questão ser de apenas 1,5  $\mu\text{M}$  (CHANG; DUGGLEBY, 1998). Sendo assim, não há ainda uma resposta definitiva para a função da molécula do FAD como cofator da enzima AHAS, no entanto, tem sido aceita a ideia de que a molécula de FAD é um vestígio remanescente da enzima piruvato oxidase (POX) que permaneceu por questões de favorecimento estrutural (CHANG; CRONAN, 1988) e, também, de que atua como um aceptor de elétrons em reações laterais mais lentas também catalisadas pela enzima AHAS oriundas de espécies bacterianas (TITTMANN et al., 2004).

A representação estrutural das moléculas de TPP e FAD pode ser observada na Figura 12.

Figura 12 – Representação da estrutura química das moléculas TPP (a) e FAD (b).

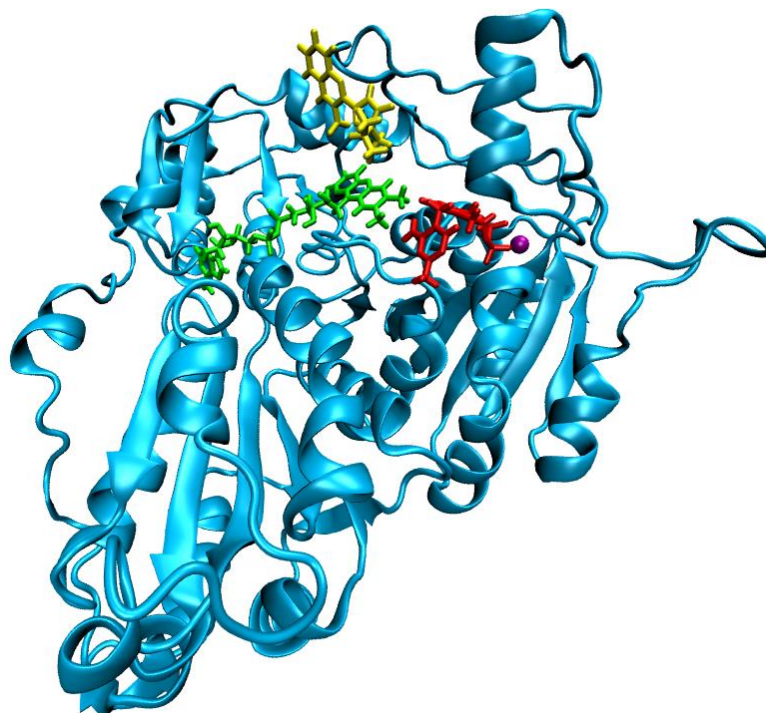


Fonte: Autor

As estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas, em especial as proteínas, podem ser encontradas na base de dados RCBS PDB (*Protein Data Bank*) (BERNSTEIN et al., 1978), que é atualmente a mais completa disponível. Dessa forma, foi desse banco de dados que foi escolhida a estrutura utilizada nessa dissertação: a estrutura da enzima AHAS complexada com o herbicida imazaquin, representante da classe das imidazolinonas - herbicidas inibidores da atividade enzimática da enzima em questão. Depositada na base em 2005 por McCourt e colaboradores, registrada sob o código PDB 1Z8N, é a mais

representativa estrutura tridimensional obtida por métodos experimentais para a enzima AHAS cataliticamente ativa (Figura 13), onde o herbicida imazaquin está ligado à subunidade catalítica da enzima de origem da espécie vegetal *A. thaliana* (MCCOURT et al., 2006).

Figura 13 – Representação tipo *new cartoon* da enzima AHAS utilizando o programa VMD. Os cofatores FAD (verde) e TPP (vermelho) e o herbicida imazaquin (amarelo) estão representados no modelo *licorice* e o íon  $Mg^{2+}$  (roxo) no modelo de bolas.



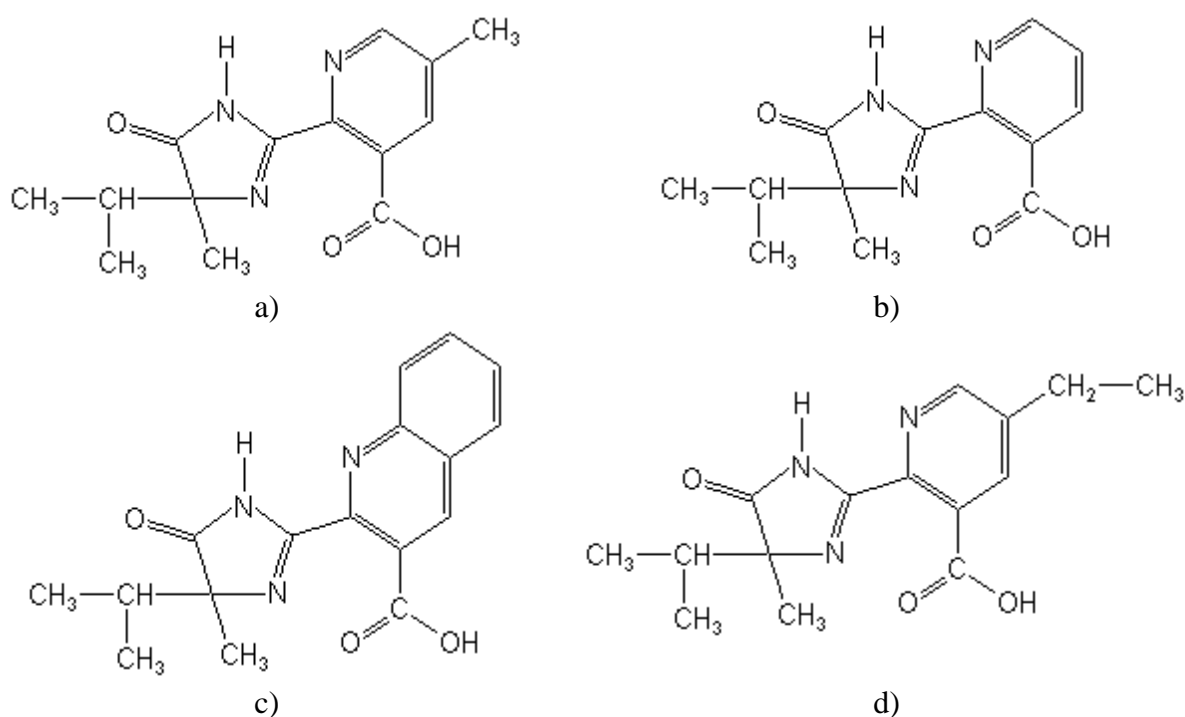
Fonte: Autor

### 3.1.3 Herbicidas Inibidores da enzima AHAS – Imazaquin

A síntese dos aminoácidos alifáticos de cadeia lateral pode ser bloqueada pela ação de algumas classes de herbicidas que tem no seu mecanismo de ação a inibição da enzima AHAS. A interrupção logo no início da síntese desses aminoácidos leva à diminuição no DNA e na síntese de proteínas, o que adversamente afeta a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento da planta (FLORIDO et al., 2014; SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984). A atividade catalítica dessa enzima é inibida pelas seguintes classes: sulfonureias, imidazolinonas, triazolopirimidinas e pirimidiloxitiobenzoatos, sendo as duas primeiras as principais representantes do grupo B.

Como o grupo de pesquisa parceiro (Laboratório de Neurobiofísica da Universidade Federal de São Carlos) já investigou a projeção de nanobiossensores para os herbicidas do grupo das sulfonureias, tratando o herbicida metsulfuron-metil como representante (DA SILVA et al., 2013), o presente trabalho investigará a classe das imidazolinonas. Na Figura 14 temos um resumo dos principais inibidores da AHAS.

Figura 14 – Principais herbicidas comerciais da classe das imidazolinonas capazes de inibir a atividade enzimática da AHAS: a) Imazapic (CADRE®); b) Imazapyr (ARSENAL®); c) Imazaquin (SCEPTER®) e d) Imazethapyr (PURSUIT®).



Fonte: Autor

Essa classe de herbicidas foi descoberta no final da década de 70 do século passado nos Estados Unidos pela *American Cyanamid Company*, mas suas formulações comerciais foram patenteadas apenas na década seguinte (HESS et al., 2001). Muitos dos estudos realizados sobre o mecanismo de ação das imidazolinonas foram realizados com o herbicida imazaquin.

O herbicida de nome genérico ácido 2-[4,5dihidro-4-metil-4-(1- metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-quinolino-carboxílico, comercialmente conhecido como imazaquin (Scepter technical) é caracterizado dentro desse grupo pelo agrupamento quinolina. Na Tabela 3 estão listadas suas principais características físicas e químicas. Trata-se de um herbicida



primeiramente testado em 1984 e comercializado a partir de 1986 na forma de um sal de amônio (CONGLETON; VANCANFORT; LIGNOWSKI, 1987). Este é amplamente utilizado e registrado no Brasil para controle de plantas daninhas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas associadas à cultura da soja (DE OLIVEIRA et al., 2004), mas também possui aplicação em culturas de milho e algodão.

Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas do herbicida imazaquin.

Fórmula Empírica	Massa Molar	Aspecto Físico	Ponto de Ebulição	Solubilidade em água (298 K)
$C_{17}H_{17}N_3O_3$	$311 \text{ g mol}^{-1}$	Sólido acastanhado	219-222 °C	60-120 ppm $L^{-1}$
Pressão de Vapor (318 K)	Taxa de Aplicação	$K_{oc}^1$	$I_{50}^2$	$T_{1/2}^3$
$< 2,0 \times 10^{-8} \text{ mmHg}$	$70-140 \text{ g ha}^{-1}$	$13-40 \text{ L kg}^{-1}$	$\approx \mu\text{M}$	16-30 semanas

<sup>1</sup>  $K_{oc}$ , coeficiente de distribuição no solo normalizado pelo teor de carbono total; <sup>2</sup>  $I_{50}$ , dose necessária para redução de 50 % da atividade enzimática da AHAS; <sup>3</sup>  $T_{1/2}$ , meia-vida no solo, tempo requerido para degradação de 50 % da dose inicial.

Fonte: Adaptado de (HESS et al., 2001; KAH; BROWN, 2006)

O imazaquin é aplicado no controle de ervas daninhas em culturas, em especial, de soja devido a sua alta seletividade e eficiência nesta cultura, oriunda do rápido metabolismo responsável por inativar compostos nas plantas daninhas (CONGLETON; VANCANFORT; LIGNOWSKI, 1987). De acordo com Shaner et al. (1984), o imazaquin é aplicado em pré-plantio, antes do plantio da cultura, e em pré (PRE) ou pós-emergência (POS) de ervas daninhas, ou seja, antes ou após o surgimento de culturas indesejáveis (SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984). A absorção do herbicida pela planta ocorre tanto através das raízes quanto das folhas, enquanto a sua translocação ocorre pelo floema e xilema, acumulando-se no meristema da planta, zona de crescimento, onde ocorre a necrose (FLORIDO et al., 2014).

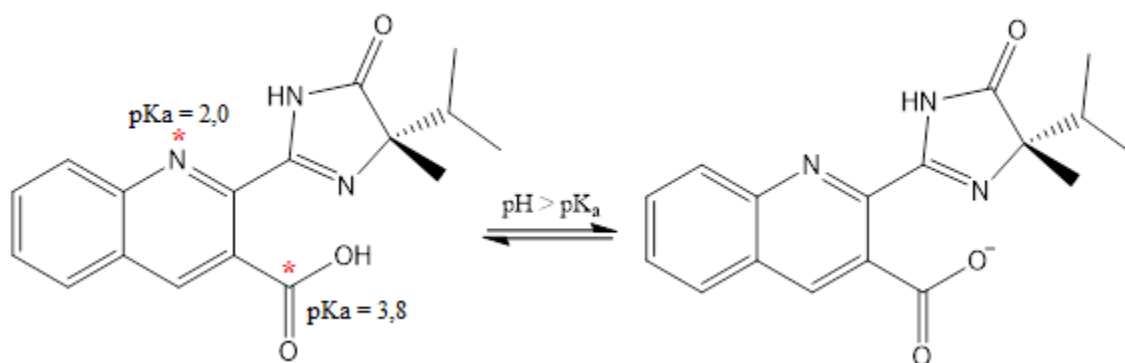
Este herbicida possui baixa toxicidade em mamíferos, uma vez que a via da biossíntese catalisada pela enzima AHAS não existe em animais, ademais, estudos toxicológicos demonstraram sua não mutagenicidade e carcinogenicidade, além deste apresentar pouca mobilidade. Testes em ratos via oral e dérmicos em coelhos, resultaram em

valores de LD<sub>50</sub> (dose letal do ingrediente ativo de determinada substância tóxica necessária para matar metade dos animais testados) iguais a 5000 mg kg<sup>-1</sup> (CONGLETON; VANCANFORT; LIGNOWSKI, 1987).

Algumas potenciais formas de exposição ao herbicida incluem alimentação e ingestão de água em áreas residenciais, porém sob as atuais condições de uso, a contaminação da população geral é considerada baixa (EDWARDS, 2005). Segundo Kraemer et al. (2009), o imazaquin apresenta grande persistência no solo, em função do elevado tempo de meia-vida do herbicida (ver Tabela 3), podendo causar danos às culturas suscetíveis e contaminar águas subterrâneas e superficiais (KRAEMER et al., 2009). No caso do controle de ervas daninhas na soja, um tempo de meia-vida maior é bom, pois fornece o controle durante todo o ciclo dessa cultura. A dissipação e amenização dos efeitos de resíduos da imizadolinona no solo e na água podem ocorrer via fotólise, degradação microbiana, lixiviação e fitorremediação (FLORIDO et al., 2014).

Do ponto de vista químico, o herbicida imazaquin é uma molécula orgânica ionizável que contém dois grupos funcionais ionizáveis: um grupo carboxílico (ácido fraco) com pK<sub>a</sub> igual a 3,8 e um grupo quinolina (base fraca) com constante de dissociação igual a 2,0. Desta forma, a molécula apresenta caráter anfótero (REGITANO; ALLEONI; TORNISIELO, 2001). Segundo estes autores, em níveis mais elevados de pH, onde o pH é maior que o pK<sub>a</sub>, e na faixa mais comum de pH dos solos tropicais (pH entre 5,0 e 6,5), o imazaquin se comporta como um herbicida ácido, visto que este ioniza-se predominando a sua forma aniônica. A ionização aumenta a solubilidade em água e diminui a sorção do herbicida no solo. Isto acontece porque grande parte dos solos apresenta carga elétrica líquida negativa, que por forças eletrostáticas repulsivas repelem a sorção do imazaquin aos colóides presentes (MONACO et al., 2002).

Figura 15 – Forma aniônica do imazaquin em pH maiores que o pKa.



Fonte: Autor

De acordo com o equilíbrio de ionização do herbicida (Figura15), observa-se que em níveis de pH menores, na qual o pH se aproxima ao  $pK_a$ , ocorre a protonação do imazaquin, a molécula neutra passa a ser predominante, aumentando a sorção do herbicida não-iônico no solo (DE OLIVEIRA et al., 2004; REGITANO; ALLEONI; TORNISIELO, 2001). Vários fatores, como pH, mineralogia, retenção de água no solo, carga, força iônica, e teores de carbono orgânico, influenciam o comportamento das imidazolinonas no solo e devem ser levadas em conta na predição da sorção de um herbicida no solo (REGITANO; ALLEONI; TORNISIELO, 2001).

### 3.2 QUÍMICA COMPUTACIONAL

Nas últimas décadas, o avanço computacional nos aspectos relacionados ao aprimoramento no *hardware* e *software*, em especial, o aumento na velocidade dos cálculos, o uso de memórias maiores e mais eficientes e a obtenção de resultados mais precisos como resultado da melhoria nos métodos matemáticos e algoritmos propiciaram a ascensão da ciência computacional. Essa área do conhecimento tem como objeto de estudo a elucidação de sistemas reais e de suas propriedades sob a ótica de cálculos realizados, com base em modelos matemáticos, utilizando computadores. Desta forma, as técnicas computacionais vêm sendo cada vez mais utilizadas na formulação de modelos para processos biomoleculares, que possam ser simulados em computadores (CUNHA, 2013). Sendo assim, quando se usa tais

procedimentos para solucionar problemas de natureza química nomeamos Química Computacional.

A necessidade da representação de sistemas moleculares em escala atômica e do conhecimento sobre o comportamento destes sistemas deu origem à modelagem molecular. A modelagem molecular visa a utilização de métodos teóricos na amostragem e manipulação da estrutura de moléculas, contribuindo assim para a obtenção de suas propriedades físicas e químicas dependentes das estruturas tridimensionais (LEACH, 2001). Para tanto, a modelagem molecular incorpora uma gama de técnicas computacionais que possibilitam que todas essas análises sejam realizadas com êxito. Resumidamente, os objetivos da modelagem molecular são o uso de modelos teóricos, em escala atômica, que permitam o manuseio de estruturas moleculares e a avaliação do comportamento químico visando descrever ou interpretar as propriedades macroscópicas valendo-se de uma série de técnicas computacionais que possibilitam a construção, a visualização, a manipulação e a estocagem de modelos moleculares tridimensionais (LEACH, 2001).

Para a descrição adequada de um determinado sistema deve-se levar em conta, na escolha do método a ser utilizado, as seguintes características: resolução espacial (tamanho), escala de tempo e graus de liberdade (CUNHA, 2013). Dentre os modelos teóricos disponíveis pode-se utilizar métodos da mecânica quântica ou da mecânica estatística clássica (mecânica molecular).

Os métodos de mecânica quântica têm a vantagem de fornecer resultados mais precisos, no entanto, demandam um maior tempo e capacidade de memória computacional. Para tanto levam em consideração dados sobre a estrutura eletrônica, baseando-se no formalismo de orbitais moleculares com diferentes abordagens (LEVINE, 1991). Os pacotes de programas de métodos quânticos são *ab initio* e semi-empíricos. Algumas técnicas quânticas mais usadas são: a teoria da densidade funcional (DFT), método Hartree-Fock (HF) e diversas aproximações semiempíricas destas técnicas, tais como as aproximações Modelo Austin 1 (AM1) (DEWAR et al., 1985), Modelo Recife 1 (RM1) (ROCHA et al., 2006), Método Paramétrico 3 (PM3) (STEWART, 1989), 6 (PM6) (STEWART, 2007) e 7 (PM7) (STEWART, 2013).

Os métodos da mecânica estatística clássica (mecânica molecular) tem a vantagem de permitir rapidez na avaliação de sistemas complexos, sendo adequada na simulação de processos que não envolvam a transferência eletrônica e quebra e/ou formação de ligação química, visto que os átomos são tratados como as unidades fundamentais e não os elétrons

ou prótons. Sendo assim, permitem o entendimento das interações intermoleculares, do comportamento das moléculas em solução e a previsão das propriedades de líquidos, soluções e sólidos (ALLEN; TILDESLEY, 1993). A escala de distâncias está na faixa de nanômetros até micrômetros e os eventos ocorrem em intervalos de tempo de pico a nanossegundos (ROSSETTI, 2006). Por essas razões, essa técnica será utilizada na simulação do nanobiossensor proposto nessa dissertação. Dentre as técnicas de mecânica estatística destacam-se: Monte Carlo (MC) e Dinâmica Molecular (DM).

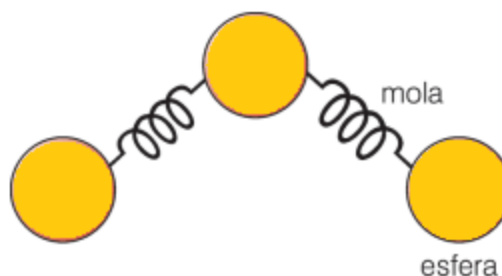
Nos tópicos a seguir serão abordados com maiores detalhes os princípios da Mecânica Molecular e de sua aplicação através da Dinâmica Molecular, pois se trata da metodologia principal utilizada no presente trabalho, e com maior brevidade as metodologias de Mecânica Quântica que foram úteis na obtenção de dados importantes para o enriquecimento da descrição do sistema de estudo.

### 3.3 MECÂNICA MOLECULAR (MM)

O termo Mecânica Molecular surgiu na década de 70 para se referir a aplicação da mecânica clássica na determinação de estruturas moleculares em equilíbrio. A mecânica molecular é um método empírico que descreve as moléculas em termos dos “átomos ligados”, na qual sofreram distorções de alguma geometria idealizada devido à forças de van der Waals (estéricas) e interações coulômbicas (carga-carga). A MM se baseia na aproximação de Born-Oppenheimer, teoria que considera que os núcleos atômicos por serem mais pesados apresentam movimentação mais lenta quando comparada aos elétrons que se ajustam rapidamente aos movimentos nucleares possibilitando o seu estudo, das suas vibrações e das rotações separadamente. Por essa razão, os métodos de Mecânica Molecular negligenciam a movimentação dos elétrons e a energia é calculada somente em função das posições nucleares (LEVINE, 1991). Por isso toda a dinâmica dos átomos é tratada através da Mecânica Clássica utilizando-se as Leis de Newton.

De acordo com os princípios da Mecânica Clássica para a estrutura molecular, átomos são esferas indivisíveis unidas por molas, devidamente calibradas, com constantes de força características que são as ligações químicas conforme representado na ilustração da Figura 16.

Figura 16 – Representação de uma molécula sob a ótica da Mecânica Molecular.



FONTE: Adaptado de (RODRIGUES, 2001).

O sucesso da mecânica molecular depende do alto grau de transferabilidade dos parâmetros geométricos de uma molécula à outra, ou seja, na capacidade de representar as moléculas em termos das estruturas de valência. Isso porque o comprimento das ligações e os ângulos podem ser transferidos de uma molécula para outra resultando na diminuição da necessidade de determinação de parâmetros para compostos diferentes respeitando a semelhança entre suas estruturas químicas, e a dependência previsível dos parâmetros da hibridação atômica (HEHRE, 2003).

Os métodos de mecânica molecular se diferem com relação ao número e a natureza dos termos incorporados e nos detalhes específicos da parametrização. A forma funcional e a parametrização, quando em conjunto, constituem o que se chama “campo de força” (*Force Field*) (ROSSETTI, 2006). Com base nesse campo é que se definem as forças que atuam em cada átomo do sistema em sua posição e velocidade.

O campo de força define então os potenciais ligados: potencial harmônico de ligação ou linear  $V_d$  (comprimento de ligação), potencial harmônico angular  $V_\theta$  (ângulo de ligação), potencial Urey-Bradley de ligação  $V_{UB}$  (distância entre átomos nas posições 1-3), potencial torcional ou diedral (ângulo diedro) próprio  $V_{\varphi \text{ prop}}$  e impróprio  $V_{\varphi \text{ improp}}$ ; e os potenciais não-ligados ou intermoleculares: potencial de van der Waals ou de Lennard-Jones  $V_{LJ}$  e potencial de Coulomb  $V_C$  (eletrostáticas). Tem-se, assim, uma equação (Equação 2) para avaliar o valor da energia potencial total (MORGON; COUTINHO, 2007)

$$V_{\text{total}} = V_d + V_\theta + V_{UB} + V_{\varphi \text{ prop}} + V_{\varphi \text{ improp}} + V_{LJ} + V_C \quad (2)$$

Uma rápida abordagem sobre o campo de força utilizado nesse trabalho será apresentada a seguir.

### 3.3.1 Campo de Força CHARMM

De acordo com definição da IUPAC, campo de força pode ser descrito como “um conjunto de funções e parametrização usadas em cálculos de mecânica molecular” ao fornecer, em detalhes, informações a respeito dos átomos e suas interações em uma molécula, considere-se aqui os termos relacionados às interações entre átomos ligados e não-ligados entre si. Dentre os campos de força mais utilizados atualmente cita-se: AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), GROMOS (*Groningen Molecular Simulation packages*), OPLS (*Optimized Parameters for Liquid Simulation*), CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) e Martini. Apesar de semelhantes, as equações que os definem possuem particularidades que devem ser levadas em conta ao optar por determinado campo de força a ser utilizado no estudo de certo sistema, por isso não trata-se de uma escolha trivial. Tal conclusão foi adequadamente resumida por van Gunsteren e Berendsen (1990): “Não existe o melhor campo de força. A melhor opção de modelo e campo de força depende do tipo de sistema molecular e o tipo de propriedade na qual se tem interesse” (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

O campo de força escolhido para desenvolver esse estudo foi o CHARMM27 (MACKERELL et al., 1998), considerando que seus parâmetros foram obtidos e otimizados para a descrição adequada de biomoléculas, em especial proteínas. Além disso, a equação de energia potencial total é composta por sete termos sendo, portanto, mais completa que os demais campos de força empíricos. Ademais, esse campo de força é compatível com o *software* GROMACS de distribuição gratuita e pode ter seus parâmetros, para estruturas orgânicas, obtidos pela ferramenta *SwissParam*, utilizada nesse trabalho para a parametrização das moléculas estudadas (cofatores da AHAS e herbicida imazaquin).

O significado e as expressões de cada um dos termos da Equação 2 para esse campo de força se encontram descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Potenciais envolvidos na descrição do campo de força CHARMM utilizados na DM.

Potencial		Descrição
Ligados	Harmônico Linear	Também conhecido como potencial de ligação química e descreve a energia associada ao estiramento entre dois átomos ligados como o desvio a uma distância de equilíbrio, $d_0$ (Equação 3).
		$V_d = k_d (d - d_0)^2 \quad (3)$ Onde: $d$ é o comprimento da ligação entre os dois átomos, $d_0$ é o comprimento de equilíbrio e $k_d$ é a constante de força da ligação. Sendo $d_0$ e $k_d$ os parâmetros envolvidos no campo de força.
	Harmônico Angular	Descreve o desvio de ângulos, formados entre três átomos ligados por ligações covalentes como o desvio em relação ao seu valor de equilíbrio $\theta_0$ , (Equação 4).
		$V_\theta = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (4)$ Onde: $\theta$ é o ângulo definido pela ligação, $\theta_0$ é o ângulo de equilíbrio e $k_\theta$ é a constante elástica da força.
	Urey-Bradley	Diz respeito às interações entre pares de átomos separados por duas ligações covalentes, conhecida como interação 1,3 <sup>1</sup> (Equação 5).
		$V_{UB} = k_{UB} (r_{1,3} - r_{1,3;0})^2 \quad (5)$ Onde: $r_{1,3}$ é a distância entre os átomos 1-3, $r_{1,3;0}$ é a distância de equilíbrio e $k_{UB}$ é a constante de força da interação Urey-Bradley.
	Torsional/Diedral Próprio	Considera-se um conjunto de quatro átomos ligados ( $i, j, k$ e $l$ ) onde o ângulo diedro $\varphi$ é definido como o ângulo entre os planos formados pelos átomos $ijk$ e $jkl$ , em que o valor zero corresponde à conformação cis, na qual os átomos $i$ e $j$ estão do mesmo lado. Dessa forma, $V_\chi$ é a representação explícita da barreira energética atribuído à rotação dos átomos $i$ e $l$ ao redor da ligação $j - k$ (Equação 6).
		$V_\chi = k_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta))^2 \quad (6)$ Onde: $k_\chi$ é a constante que define a extensão da barreira energética para torção, $n$ é o número de mínimos na curva de energia potencial versus ângulo de torção, $\chi$ é o ângulo diedral da ligação central em relação a quatro átomos e $\delta$ é a diferença de fase do ângulo $\varphi$ podendo o mesmo ser $0^\circ$ ou $180^\circ$ correspondendo, respectivamente, a um ponto de máximo ou de mínimo da curva.
Não-Ligados	Diedral Impróprio	Está associado com deformações dos ângulos de torção impróprios, ou seja, aqueles associados a átomos de hibridização $sp^2$ , que geram deformações fora do plano. Termo presente em campos de força mais elaborados assim com o termo de Urey-Bradley (Equação 7).
		$V_{\varphi \text{ improp}} = k_{\varphi \text{ improp}} (\varphi - \varphi_0)^2 \quad (7)$ Onde: $k_{\varphi \text{ improp}}$ é a constante de força do diedro impróprio, $\varphi$ é o ângulo diedral impróprio e $\varphi_0$ é ângulo diedral de equilíbrio.
	Lennard-Jones	O potencial de Lenard-Jones $V_{LJ}$ é utilizado para descrever interações intra e intermoleculares do tipo van der Waals entre átomos não ligados. No caso de átomos em uma mesma molécula apenas são consideradas interações entre átomos separados por três ou mais ligações covalentes (Equação 8).
		$V_{LJ} = \epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/r_{ij})^6] \quad (8)$ Onde: $r_{ij}$ é a distância entre os átomos $i$ e $j$ , $\epsilon$ é a profundidade do poço de energia potencial e $\sigma$ é o diâmetro de Lennard-Jones que é dependente da natureza dos átomos envolvidos. O primeiro termo corresponde à repulsão entre dois átomos e o segundo a atração.
	Coulomb	O potencial de Coulomb $V_c$ é utilizado para descrever as interações puramente eletrostáticas (de cargas) entre dois átomos $i$ e $j$ (Equação 9).
		$V_C = (q_i \cdot q_j) / (\epsilon_0 \cdot r_{ij}) \quad (9)$ Onde: $r_{ij}$ é a distância entre os átomos $i$ e $j$ , $q_i$ e $q_j$ são as cargas dos átomos, $\epsilon$ a constante dielétrica do meio e $\epsilon_0$ a permissividade no vácuo.

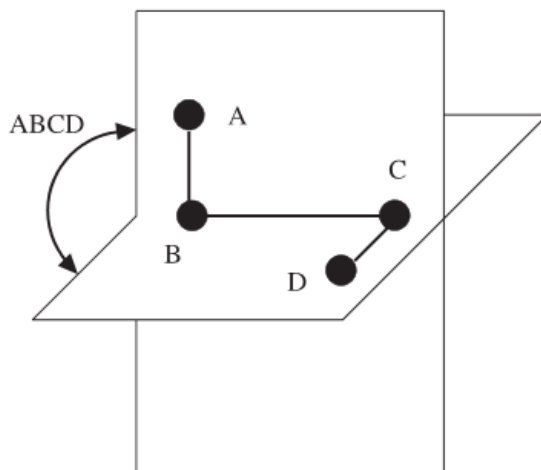
Fonte: Dados compilados de (LIMA, 2006; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1977; RAPPÉ; CASEWIT, 1997)

<sup>1</sup> Para átomos no ângulo 1-2-3 a interação 1,3 refere-se a distorção da ligação dos átomos localizados nas posições 1 e 3.



A Figura 17 ilustra um ângulo diedro com intuito de facilitar a compreensão em relação aos termos potenciais associados a essas variações.

Figura 17 – Representação de ângulo diedro.



Fonte: (HINCHLIFFE, 2003)

Os potenciais diedrais descrevem a parte da variação energética associada a torção em torno da ligação B-C, em uma sequência de quatro átomos, A-B-C-D, onde A-B, B-C e C-D estão ligados conforme mostrado na figura acima. Por interpretação, o ângulo diedro é periódico. Como em muitos casos a energia mínima está associada a uma torção de  $180^\circ$  (arranjo anti) convencionalmente o período de torção é  $-180^\circ \leq \varphi \leq +180^\circ$ . Distintamente, os diedros próprios são aqueles associados a uma rotação completa em torno da ligação B-C, enquanto para os diedros impróprios essa rotação é limitada e, portanto, são responsáveis por manter os grupos planares ou para evitar que as moléculas se sobreponham sobre suas imagens especulares. Suponhamos que a ligação C-D seja um fragmento C-H de um grupamento metil poderia se esperar uma rotação completa sobre a ligação B-C e uma simetria tripla (multiplicidade) na expressão de energia potencial. Por outro lado, uma união -CH-CH- no anel benzênico deve apresentar apenas uma flexão angular moderada em seu valor planar ( $\varphi = 0^\circ$ ) (HINCHLIFFE, 2003).

Depois de descrever a forma analítica do campo de força, o problema passa a ser a atribuição de valores numéricos para os parâmetros das equações. Este procedimento é conhecido como parametrização que, no processo de criação de modelos de campo de força, é certamente uma etapa crítica e árdua que acaba demandando tempo e memória computacional em função dos cálculos quânticos que devem ser realizados com intuito de obter os parâmetros escolhidos a serem descritos, e que afetarão todas as etapas subsequentes dos

cálculos de DM. Uma alternativa breve para superar essas dificuldades está associada à obtenção *online* de parâmetros de campo de força para moléculas orgânicas pequenas utilizando uma ferramenta conhecida como *SwissParam* que será descrita a seguir.

### 3.3.2 Ferramenta *SwissParam*

É uma tarefa desafiadora encontrar parâmetros para moléculas orgânicas compatíveis com a maioria dos campos de força existentes, em função da diversidade de funções químicas e estruturas envolvidas nesse tipo de composto. Para tanto, o Instituto Suíço de Bioinformática propôs uma ferramenta de geração rápida e *online* de parâmetros de campo de força, para moléculas orgânicas pequenas (de 5 a 136 átomos), que são compatíveis com o campo de força CHARMM, chamada *SwissParam* (ZOETE et al., 2011).

A topologia e os parâmetros gerados por essa ferramenta são baseados no campo de força genérico *Merck Molecular Force Field* (MMFF) que foi desenvolvido para fornecer uma maior possibilidade de transferabilidade dos parâmetros permitindo sua aplicação a moléculas não explicitamente incluídas. Para tanto, teve sua parametrização realizada utilizando dados computacionais de alta qualidade (cálculos quânticos) validados para cerca de 2800 compostos do CSD (*Cambridge Structural Database*) (ALLEN, 2002), ou seja, englobando quase a totalidade dos compostos orgânicos estáveis (ZOETE et al., 2011).

Na validação dessa ferramenta foram utilizadas estruturas tridimensionais no formato Mol2 obtidas do Zinc database, *e.g.* zinc.docking.org (IRWIN; SHOICHET, 2005), de modo que as topologias e os parâmetros foram adequadamente gerados para 99,6 % das estruturas propostas confirmando sua aplicabilidade (ZOETE et al., 2011).

## 3.4 DINÂMICA MOLECULAR

A Dinâmica Molecular (MD) consiste na aplicação das leis clássicas do movimento a um sistema molecular descrevendo o seu comportamento em função do tempo. Mais formalmente de acordo com a IUPAC, a “dinâmica molecular é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de

movimento de Newton”. As equações do movimento de Newton fornecem a relação entre a força e a variação nas posições atômicas. Cada nova posição atômica é gerada a partir da resolução da segunda lei de Newton ( $F = m \cdot a$ ) na sua forma diferencial conforme Equação 10:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (10)$$

As forças são as derivadas negativas de uma energia potencial  $V$  obtido do campo de força. Em suma, simulações de dinâmica molecular resolvem as equações de movimento de Newton para um número  $N$  de átomos.

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (11)$$

As equações de Newton na forma diferencial são numericamente integradas simultânea e sucessivamente para cada um dos átomos do sistema. Esse processo é conhecido como *passo* e a apresentação cronológica de  $n$  passos gera o que conhecemos como *trajetória*. Dessa forma, a cada novo passo as equações são novamente integradas com adição de determinado  $\Delta t$  o que acarreta a alteração da velocidade e da posição atômica em função do tempo (CUNHA, 2013). A escolha de um tempo adequado de integração tem relação direta com o tamanho da simulação e, conseqüentemente, o custo computacional. Mas vale considerar que esses pequenos intervalos de tempo devem ser da ordem de femtossegundos ( $1\text{fs} = 10^{-15}$  segundos) ou menores (LEACH, 2001) para que sejam capazes de modelar com precisão suficientes eventos moleculares (rotações e vibrações) que, caracteristicamente, ocorrem em frequências da ordem de  $10^{11}$ - $10^{14} \text{ s}^{-1}$ , referentes a comprimentos de onda na faixa de  $3$ - $3300 \text{ cm}^{-1}$ . Além disso, se o tamanho do passo temporal for muito grande pode acarretar a supressão de eventos moleculares importantes e ocasionar erros significativos nos cálculos das forças e da energia potencial total do sistema. Logo, as propriedades macroscópicas são obtidas a partir das médias temporais do conjunto de trajetórias em equilíbrio (VAN DER SPOEL et al., 2005).

Descrições mais detalhadas sobre o método de simulação por dinâmica molecular podem ser encontradas nas referências bibliográficas que se seguem (ALLEN; TILDESLEY, 1988; LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007; VAN GUNSTEREN et al., 2001).

### 3.4.1 Algoritmo (Leap-Frog)

A integração das equações de movimento é realizada através de algoritmos baseados no modelo descrito anteriormente. A ampla variedade de algoritmos disponíveis para uso pode tornar difícil a escolha do método apropriado. Vários fatores devem ser levados em conta na escolha do algoritmo, como a capacidade computacional requerida (memória RAM) e a conservação da energia. Dentre os integradores capazes de efetuar a integração numérica das equações acima mencionadas, os mais comuns são: *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *Leap-frog*. Esses algoritmos são mais frequentemente utilizados em função do menor consumo de memória RAM e processamento (VERLET, 1967). O algoritmo de *Verlet* utiliza as posições e as acelerações dos átomos em um determinado tempo  $t$  e as posições no passo anterior  $r(t - \delta t)$  para determinar a posição no tempo  $t + \delta t$ . A grande desvantagem do uso desse algoritmo é o fato de que as velocidades não aparecem explicitamente podendo ocasionar problemas de conexão com *ensembles* isotérmicos (VERLET, 1967). Esse problema pode ser contornado fazendo-se uso do algoritmo *Leap-frog* - método simplificado para a integração das equações de movimento que inclui explicitamente a velocidade em seus cálculos - composto por dois passos (HOCKNEY, 1970):

- 1) Cálculo das velocidades na metade do intervalo de integração (Equação 12)

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t a(t) \quad (12)$$

- 2) Cálculo das novas posições utilizando as velocidades calculadas (Equação 13).

$$r(t + \delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (13)$$

A desvantagem com relação ao uso desse algoritmo é a não-simultaneidade na determinação das posições e velocidades pelo fato de eles estarem em descompasso por  $\frac{1}{2}\delta t$ .

### 3.4.2 Ensemble NpT

Outro parâmetro a ser ajustado ao se realizar uma dinâmica molecular é a escolha do *ensemble*. Conforme definido por Atkins e Paula (2009), esse termo tem o seu significado

associado ao vocábulo “conjunto” e refere-se, portanto, ao conjunto imaginário de réplicas da caixa de simulação com grandezas físicas idênticas (ATKINS; PAULA, 2009). Nas simulações realizadas no presente trabalho foi utilizado um ensemble isotérmico-isobárico (NpT) caracterizado por manter ao longo de toda a simulação a mesma composição, temperatura e pressão. Para a manutenção do equilíbrio térmico e da pressão é necessário o acoplamento do sistema molecular a um banho de aquecimento externo ou de pressão, respectivamente (BERENDSEN et al., 1984). Já as partículas não ficam restritas a entrar ou sair do sistema de acordo com as condições periódicas de contorno, descritas na seção a seguir.

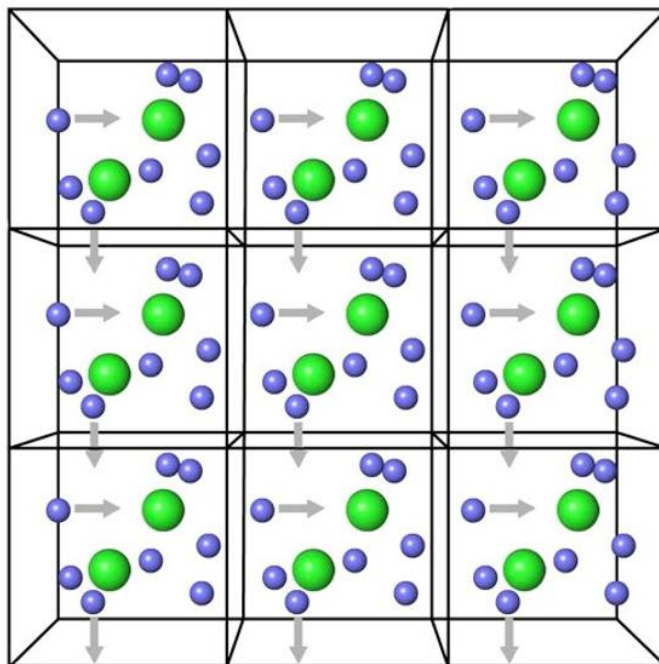
### 3.4.3 Condições Periódicas de Contorno

Os sistemas simulados ficam restritos a uma caixa de simulação que além das moléculas de interesse contém o solvente. No caso da MD utiliza-se solvente explícito, uma das vantagens da técnica, pois confere ao sistema simulado uma maior similaridade ao nível macroscópico. Dessa forma, ocasiona dois problemas a serem contornados visto que afetam significativamente os resultados finais:

- Efeito de superfície: as moléculas da margem da caixa de simulação estão sujeitos a forças diferentes daquelas do centro (HINCHLIFFE, 2003);
- Número de átomos limitado: o quantitativo de partículas dentro da caixa é da ordem de  $10^5$ - $10^6$ , valor pequeno quando comparado aos sistemas macroscópicos que apresentam número de átomos da ordem de Avogadro (VAN GUNSTEREN et al., 2006).

Para minimizar esses efeitos aplicam-se as *condições periódicas de contorno* que consistem na realização de cópias da caixa de simulação em todas as direções, conforme representação tridimensional apresentada na Figura 18. Trata-se de uma abstração em que uma molécula ao sair de um lado da caixa original tem sua imagem entrando na face oposta com mesma velocidade ao longo de toda a simulação.

Figura 18 – Representação das condições periódicas de contorno em três dimensões.

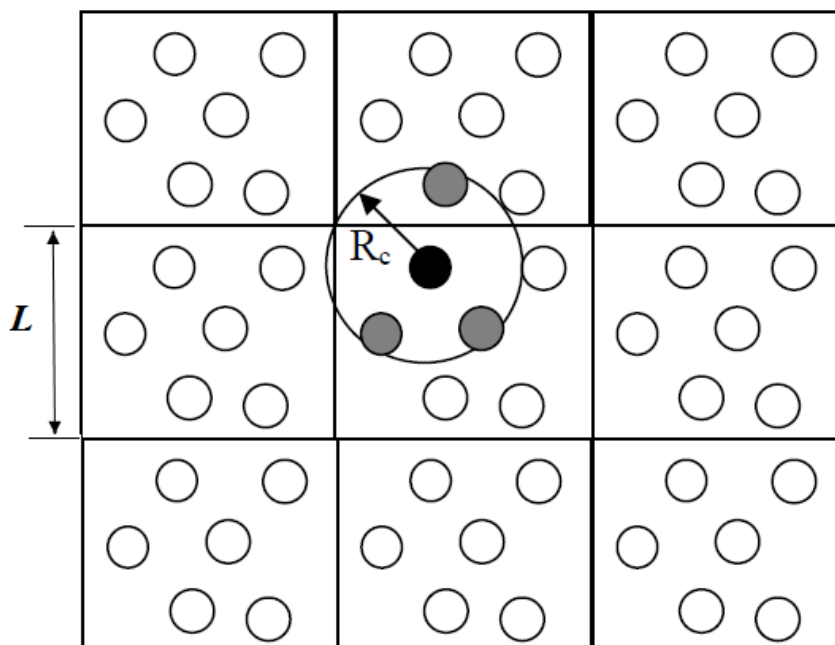


Fonte: (VERLI et al., 2014)

#### 3.4.4 Raio de Corte

Em metodologias de DM, o cálculo das interações não-ligadas (Coulomb e Lennard-Jones) é a parte mais dispendiosa computacionalmente. Dessa forma, uma alternativa para poupar memória computacional é restringir a interação desses átomos com suas imagens através de um *cut-off*, ou seja, estabelecer um raio de corte ( $R_c$ ). O  $R_c$  das interações não ligantes é escolhido de modo a garantir que cada partícula não interaja com suas imagens criadas pelas condições periódicas de fronteira e deve ser da ordem de  $L/2$  ( $R_c \leq L/2$ ), procedimento conhecido como convenção da imagem mínima (BALTAZAR, 2009), conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Representação do Raio de Corte esférico para um sistema periódico em duas dimensões.



Fonte: Adaptado de (FRANCA, 2009).

Enquanto o potencial de Lennard-Jones decai rapidamente com o aumento da distância entre as partículas na proporção de  $r^{-6}$  (Equação 8) as interações de longo alcance (interação coulômbicas) não podem ser tratadas da mesma forma já que o potencial  $V_C$  decai com o inverso da distância entre as partículas. Dessa forma, a eliminação da avaliação dessas interações de longa distância pelo estabelecimento de um corte pode ocasionar instabilidade e, por conseguinte, erros significativos na amostragem de simulações, em especial, aquelas que envolvam espécies carregadas (SCHLICK, 2010). Sendo assim, para descrever adequadamente essas forças de longo alcance, os métodos mais utilizados são: a soma de Ewald, sua variação PME (do inglês, *Particle Mesh Ewald*) e a aproximação do campo de reação (*reaction-field*).

O método soma de Ewald é mais utilizado na descrição de sistemas altamente carregados ou polares e, neste método, uma dada partícula interage com todas as demais partículas da caixa de simulação e, também, com todas as suas imagens num arranjo infinito de células periódicas, de modo que, no limite, esse adquire formato esférico (EWALD, 1921). Já a aproximação do campo de reação (*reaction field*) é utilizada para tratar as interações Coulômbicas em sistemas em fase condensada como, por exemplo, macromoléculas em solução visto que considera o ambiente fora do raio de corte como um contínuo dielétrico com

constante dielétrica  $\epsilon$  referente ao solvente utilizado e permite que esse ambiente apresente também átomos e moléculas de soluto (LINDAHL; HESS; VAN DER SPOEL, 2001).

#### 3.4.5 Modelos de moléculas de água para solvatação explícita

O solvente de um sistema, em particular a água, exerce influência considerável sobre a estrutura do soluto e a termodinâmica do sistema. As enzimas, por exemplo, requerem um elevado grau de hidratação para que possam exercer sua função biológica. Por essa razão, é importante, em simulações computacionais de sistemas biomoleculares solvatados recriar o ambiente aquoso da forma mais precisa possível, de modo a incluir os efeitos do solvente, seja pelos métodos implícitos ou explícitos.

O modelo de solvatação implícita não considera os graus de liberdade do solvente, mas o trata como um meio contínuo que contém as propriedades médias do solvente real. Nesse tratamento, a influência do solvente é considerada através da estimativa direta da energia livre de solvatação, que se trata de uma medida da afinidade do soluto com o solvente. Conceitualmente, essa propriedade pode ser definida com o trabalho reversível requerido para a transferência do soluto em uma configuração fixa do vácuo para a solução (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

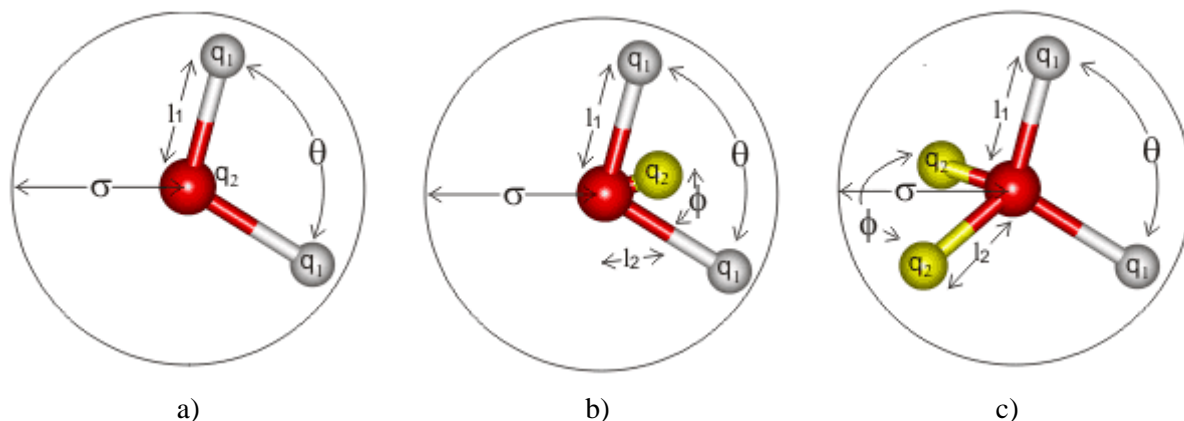
Na solvatação explícita, o solvente é tratado como parte do sistema, ou seja, como um elemento adicional. Dessa forma é necessária a parametrização do potencial para a reprodução das propriedades macroscópicas e, portanto, um modelo que descreva apropriadamente a molécula de água.

Dentre os vários modelos de água disponíveis mais utilizados na solvatação de sistemas simulados por dinâmica molecular tem-se o SPC (do inglês, *Single Point Charge*) e o conjunto dos potenciais TIP (do inglês, *Transferable Intermolecular Potentials*). No modelo SPC as moléculas de água são tratadas como cargas pontuais com três sítios de interação para as interações eletrostáticas e as cargas parciais dos átomos de hidrogênio balanceadas apropriadamente pela carga negativa do átomo de oxigênio (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987). Os modelos rígidos do tipo TIP $n$ P são simples e se baseiam na interações não ligadas já que as interações ligadas são tratadas implicitamente. As moléculas de água do tipo TIP3P apresentam três sítios de interação de modo análogo ao SPC, enquanto as do tipo TIP4P e TIP5P utilizam, respectivamente, 4 e 5 sítios de interação conforme mostrado na Figura 20. A comparação descritiva entre as características desses modelos pode



ser observada na Tabela 5.

Figura 20 – Representação dos modelos de água do tipo: SPC e TIP3P (a), TIP4P (b) e TIP5P (c);  $I_1$  e  $I_2$  representam as distâncias entre o átomo hidrogênio e oxigênio;  $q_1$  e  $q_2$  representam as cargas atômicas do hidrogênio e oxigênio, respectivamente;  $\theta$  e  $\Phi$  são os ângulos de ligação e  $\sigma$  é a distância para o potencial zero.



Fonte: (CHAPLIN, 2000)

Tabela 5 – Comparação dos parâmetros de diferentes modelos de molécula de água.

Parâmetros	SPC	TIP3P	TIP4P	TIP5P
$I_1 / \text{\AA}$	1,0000	0,9572	0,9572	0,9572
$I_2 / \text{\AA}$	---	---	0,15	0,70
$q_1 / e$	+ 0,4238	+ 0,4170	+ 0,5200	+ 0,2410
$q_2 / e$	- 0,8476	- 0,8340	- 1,0400	- 0,2410
$\sigma / \text{\AA}$	3,16600	3,15061	3,15365	3,12000
$\theta / \text{graus}$	109,47	104,52	104,52	104,52
$\Phi / \text{graus}$	---	---	52,26	109,47
$\mu / \text{D}$	2,35	2,35	2,18	2,29

Fonte: Dados compilados de (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987; JORGENSEN et al., 1983; MARK; NILSSON, 2001; NERIA; FISCHER; KARPLUS, 1996).

Metodologicamente, o modelo TIP3P tem três sítios de interação centrados nos núcleos de O e H com carga parcial para a computação das interações eletrostáticas ao passo que as interações de van der Waals são contabilizadas apenas por interações dos núcleos O-O. Além disso, sua parametrização enfatiza as propriedades da molécula de água em estado líquido em condições ambientes e, portanto, é mais adequado para simulações biomoleculares

que os demais modelos. Por essas razões, o TIP3P reproduz melhor as características da molécula de água que o SPC, é menos dispendioso computacionalmente que os modelos TIP4P e TIP5P. Dessa forma, o campo de força CHARMM teve seus parâmetros desenvolvidos, calibrados e implementados para dinâmicas moleculares utilizando o modelo TIP3P (MARK; NILSSON, 2001; NGUYEN; VIET; LI, 2014).

### 3.5 MECÂNICA QUÂNTICA

Os fundamentos da mecânica estatística são oriundos de uma série de experimentos realizados no final do século XIX, mas que se consolidaram no século XX, sendo a mecânica quântica e seus métodos considerados um dos grandes avanços da ciência nos últimos tempos. Essas teorias fornecem uma descrição matemática da estrutura molecular de um sistema em termos das interações entre os núcleos atômicos e a distribuição eletrônica ao seu redor.

Qualquer sistema complexo pode ter suas propriedades macroscópicas descritas pela mecânica quântica. Por essa razão, é tratada como a parte da ciência que se preocupa em estudar a origem microscópica das propriedades físicas da matéria. Fundamentalmente os métodos da Mecânica Quântica remetem à Equação de Schrödinger (Equação 14), e determinam que a solução para essa equação é a função de onda associada ao seu movimento:

$$H\Psi = E\Psi \quad (14)$$

onde:  $E$  é a energia eletrônica em unidades atômicas,  $\Psi$  é a função de onda ou, ainda, chamada de função de coordenadas dos elétrons e  $H$  é o operador hamiltoniano, uma expressão matemática que relaciona a energia cinética dos elétrons e a energia potencial do sistema. O operador hamiltoniano genérico para um sistema contendo vários elétrons tem suas unidades atômicas dadas por:

$$H = -\frac{1}{2} \sum_i^{\text{elétrons}} \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_A^{\text{núcleo}} \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \sum_i^{\text{elétrons}} \sum_A^{\text{núcleo}} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i<j}^{\text{elétrons}} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A<B}^{\text{núcleo}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (15)$$

Dessa forma, ao solucionar a Equação de Schrödinger obtém-se uma função que possui todas as informações referentes ao sistema podendo, portanto, serem calculadas inúmeras propriedades da molécula, inclusive as eletrônicas. Por essa razão, pode ser utilizada na análise conformacional da molécula, finalidade dos métodos quânticos no presente trabalho (LEVINE, 2000; HEHRE, 2003).

A teoria da mecânica quântica fornece dados com precisão não obtida pela aplicação da mecânica molecular, porém requer maior tempo de cálculo e memória computacional.

A Teoria de Hartree-Fock é uma aproximação utilizada para a determinação de funções de onda e energia no estado fundamental de sistemas quânticos de muitos corpos. Para tanto, considera apenas a parte da correlação eletrônica da Equação de Schrödinger, de modo que cada elétron pode ser representado por uma função de onda, associada apenas à sua posição, conhecida como orbital molecular (MO). Isto é possível por meio da aproximação de Born-Oppenheimer e da consideração de que os elétrons se movem independentemente dentro de um campo médio decorrente da presença dos demais elétrons. Essa teoria é o ponto de partida dos métodos *ab initio* que buscam resolver problemas quânticos diretamente dos postulados da mecânica quântica, sem aproximações e sem correlação a dados experimentais (LASCHUK, 2005; HOLLAUER, 2008). Neste os orbitais são representados através dos conjuntos de base que contém todas as funções necessárias para acomodar os orbitais preenchidos de cada átomo. No entanto, como a equação de Schrödinger é uma equação diferencial, sua resolução envolve a avaliação de uma grande quantidade de integrais cujo número cresce exponencialmente com o número de funções de bases chegando à ordem de milhões para pequenas moléculas, demandando tempo e memória computacional consideráveis.

Uma variação da Teoria de Hartree-Fock, que foi utilizada neste trabalho, é o Hartree-Fock Irrestrito (UHF), que consiste em um método *ab initio* de orbital molecular para sistemas abertos, onde o número de elétrons de cada spin não é igual, ou seja, que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Este método utiliza conjuntos de orbitais distintos para cada tipo de spin, e considera que não há uma relação direta dos orbitais moleculares com os spins. Desta forma, como elétrons com o mesmo spin tendem a ficar distantes um do outro, aos elétrons de um mesmo orbital molecular, por exemplo  $1s^2$ , é sensato designar dois orbitais moleculares diferentes,  $1s$  e  $1s'$ , diferentemente da abordagem restrita da teoria de Hartree-Fock (RHF), onde esses elétrons emparelhados estão no mesmo orbital (LEVINE, 1991).

Por outro lado, os métodos semi-empíricos, que são baseados no formalismo dos métodos *ab initio*, simplificam os cálculos negligenciando uma série dessas integrais. Para tanto, utiliza parâmetros ajustados pelos dados experimentais e considera apenas os elétrons de valência do sistema, já que os elétrons da ligação química a serem investigados, estão na camada de valência (LEACH, 2001). Os métodos semi-empíricos mais utilizados são *Modified Neglect of Diatomic Overlap* (MNDO), Modelo Austin 1 (AM1) (DEWAR et al.,

1985), Modelo Recife 1 (RM1) (ROCHA et al., 2006), Método Paramétrico 3 (PM3) (STEWART, 1989), 6 (PM6) (STEWART, 2007) e 7 (PM7) (STEWART, 2013). Todos esses métodos utilizam um conjunto de bases pré-definido incorporando aproximações semelhantes, porém possuem parametrizações diferentes (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Além das teorias descritas anteriormente, pode-se citar a Teoria do Funcional de Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*), que emergiu como uma nova abordagem para a obtenção da energia eletrônica no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Ao viabilizar esse procedimento, diferentemente dos demais métodos que utilizam funções de onda, Kohn e colaboradores utilizaram a densidade eletrônica (HOHENBERG; KOHN, 1964; KOHN; SHAM, 1965). Sendo assim, a energia da molécula pode ser obtida a partir da densidade eletrônica que descreve a distribuição de carga em uma molécula. Essa teoria é matemática e computacionalmente similar aos métodos da teoria de Hartree-Fock, no entanto, fornece resultados mais precisos com menor custo computacional. Essa metodologia tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica, em especial, para aplicações em física do estado sólido (CUSTODIO; MORGON, 1995). No entanto, vale considerar ainda que contribuições recentes apontam para a aplicação da DFT na compreensão de propriedades moleculares de sistemas poliatômicos como, por exemplo, o estudo do sítio ativo de enzimas. Dentro desse contexto, vale destacar o trabalho realizado por Becke, Lee, Yang e Parr, que inseriram no contexto dos cálculos de química quântica o funcional mais utilizado atualmente pelos bons resultados produzidos a partir de seu uso, o B3LYP (BECKE, 1993; LEE; YANG; PARR, 1988).

### 3.6 METODOLOGIA HÍBRIDA QM/MM

Uma das grandes desvantagens dos métodos derivados da teoria quântica é o fato de demandarem elevado tempo e memória computacional tornando-os inviáveis de serem aplicados nos casos em que informações a respeito da estrutura eletrônica são primordiais, mas o sistema é consideravelmente grande como, por exemplo, proteínas em solução. Nesses casos, uma alternativa é a aplicação de métodos híbridos de mecânica quântica e mecânica molecular QM/MM (do inglês, *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) (DAPPRICH et al., 1999).

Essa metodologia é capaz de mesclar o que há de mais vantajoso em ambas as abordagens. Para tanto, particiona o sistema em estudo em duas regiões diferentes de modo que para a região de interesse, sobre a qual se deseja informações a respeito da estrutura eletrônica, aplica-se um tratamento quântico, enquanto o restante do sistema, em geral o solvente (componente majoritário), é tratado sob a perspectiva de cálculos mais rápidos de dinâmica molecular poupando, portanto, memória computacional.

Dessa forma, como a estabilidade da enzima AHAS depende do tempo de vida das ligações intermoleculares estabelecidas entre a mesma e as moléculas de solvente, da ordem de ps, essa parte do sistema foi tratada com cálculos quânticos, realizados por abordagem semi-empírica, incluindo o efeito do solvente implícito que foi simulado sob a ótica da mecânica molecular.

## 4 METODOLOGIA

Considerando-se que a enzima AHAS será simulada na presença das coenzimas FAD e TPP e, por conseguinte, do herbicida inibidor as etapas iniciais do trabalho consistem na obtenção de parâmetros e topologias no campo de força proposto para as três moléculas e suas respectivas validações utilizando Dinâmica Molecular.

### 4.1 PARAMETRIZAÇÃO E SIMULAÇÃO MOLECULAR DOS COFATORES DA ENZIMA AHAS

#### 4.1.1 Parametrização do campo de força dos cofatores da enzima AHAS

No processo de obtenção dos parâmetros do campo de força (ligados e não ligados) dos cofatores FAD e TPP, foi utilizada a ferramenta online chamada *SwissParam*. As estruturas tridimensionais (em extensão Mol2) para ambas moléculas foram obtidas na base de dados virtual de compostos químicos para aquisição comercial, ZINC ([zinc.docking.org](http://zinc.docking.org)). O código do acervo virtual referente às estruturas utilizadas para as moléculas de FAD e TPP são, respectivamente, ZINC08215434 e ZINC08215517.

#### 4.1.2 Simulações por Dinâmica Molecular

Estes dados, após obtidos, foram implementados no campo de força CHARMM27. A sua validação, utilizando simulação de dinâmica molecular, foi conduzida pelo pacote computacional GROMACS 4.6.5 (HESS et al., 1997; VAN DER SPOEL et al., 2005). Primeiramente, a molécula de FAD/TPP foi inserida a 1,5 nm de distância das arestas da caixa de simulação retangular, que foi preenchida com moléculas de água do tipo TIP3P. Após a adição do solvente, íons sódio foram inseridos no sistema de forma que este tivesse sua carga neutralizada. Em seguida, o sistema teve sua energia minimizada com o algoritmo *steepest descent* (QIAN, 1999) utilizando-se 10000 passos. Este algoritmo utiliza a derivada primeira

para determinar a direção do mínimo de energia do *ensemble* simulado. O sistema foi termalizado por 10 ps, com aumento gradual e sucessivo da temperatura, a 50 K, 150 K, e finalmente a 298 K, sendo mantida constante a esta temperatura, com o acoplamento soluto-solvente realizado a cada 0,1 ps. Nesta etapa, as coordenadas dos átomos mais pesados, excluindo-se os de hidrogênio, foram fixadas com uma força constante de  $1,0 \cdot 10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ .

Finalmente, foi realizada uma simulação por dinâmica molecular por 10 ns em um ensemble isotérmico-isobárico (NPT), utilizando o algoritmo *leap-frog*, cujo passo de integração foi de 2 fs (HOCKNEY, 1970). Para realização das análises, o intervalo de escrita das configurações do sistema foi de 1 ps.

A pressão foi mantida a 1,0 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen via tratamento isotrópico com tempo de relaxação de 10 ps e compressibilidade de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  e a temperatura a 298K através do termostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984). O movimento de estiramento linear e angular dos átomos de hidrogênio e o comprimento das ligações foram restringidos usando-se o algoritmo LINCS (do inglês, *Linear Constraint Solver*) (HESS et al., 1997). Visando a caracterização das interações eletrostáticas e de van der Waals de curto alcance foi utilizado um raio de corte de 1,4 nm e as contribuições eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo método PME.

Tabela 6 – Descrição dos sistemas dos cofatores simulados.

Sistema/Modelo de Água	Nº moléculas de água	Carga Total	Nº total de átomos
FAD/TIP3P	2663	- 2	8075
TPP/TIP3P	1948	- 2	5888

Fonte: Autor

## 4.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MOLECULAR E PARAMETRIZAÇÃO DOS CAMPOS DE FORÇA PARA O HERBICIDA IMAZAQUIN (IQ)

### 4.2.1 Otimização conformacional

Inicialmente, a otimização geométrica da estrutura do herbicida imazaquin, obtida com o software *SwissParam*, foi realizada no vácuo, visando obter a conformação geométrica mais estável, utilizando a abordagem Hartree-Fock irrestrita (UHF), multiplicidade 1 e função de base 6-311++g(d,p) através do programa ORCA 3.0 (NEESE, 2012).

### 4.2.2 Parametrização do campo de força do herbicida imazaquin

No processo de obtenção dos parâmetros do campo de força (ligados e não ligados) do imazaquin (IQ), foi utilizada a ferramenta online chamada *SwissParam*. A estrutura utilizada para a parametrização do herbicida imazaquin foi sua forma aniônica, pelas razões expostas na seção 3.1.3, com estrutura tridimensional (em extensão Mol2) obtida a partir da base de dados ZINC. O código do acervo virtual referente à estrutura utilizada foi ZINC19702298.

### 4.2.3 Cálculo das cargas RESP (*Restrained Electrostatic Potential*)

Em seguida, o conjunto de cargas calculado para a estrutura mais estável obtida na otimização, foi submetido ao ajuste do potencial eletrostático clássico da molécula pelo potencial mecânico, utilizando a metodologia RESP, compatível com o campo de força utilizado neste trabalho (BAYLY et al., 1993), através do programa NWChem 5.1 (VALIEV et al., 2010). O modelo RESP é baseado no cálculo de um conjunto de cargas atômicas pontuais, que descreva da melhor forma o potencial eletrostático da molécula em um conjunto de pontos pré-definidos ao redor dela (GUADAGNINI; BRUNS; SOUZA, 1996). Descrições mais detalhadas sobre este método podem ser encontradas nas referências bibliográficas que se seguem (BAYLY et al., 1993; CORNELL et al., 1995; DUPRADEAU et al., 2008).



#### 4.2.4 Simulações por Dinâmica Molecular

Após os dados estruturais e cargas serem obtidos, os mesmos foram implementados no campo de força CHARMM27 e validados utilizando simulação de dinâmica molecular, conduzida pelo pacote computacional GROMACS 4.6.5. Neste caso, a dinâmica foi realizada em solvente explícito do tipo TIP3P em caixa de simulação retangular com arestas criadas a 1,5 nm da molécula de imazaquin. A minimização de energia assim como a dinâmica molecular foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros avaliados para as simulações sucedidas para os cofatores da enzima AHAS em água.

#### 4.3 SIMULAÇÃO DA ENZIMA AHAS E DO SISTEMA AHAS-IQ

A estrutura inicial da enzima AHAS, simulada neste trabalho, apenas com os cofatores, foi obtida do banco de dados de proteínas RCSC-PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank*), registrada sob o código 1Z8N. Para tanto, retirou-se as coordenadas do herbicida do arquivo *input* (extensão .pdb). Para a simulação da interação da enzima com o herbicida na presença dos cofatores FAD, TPP e  $Mg^{2+}$ , o arquivo não foi alterado. Simulações de dinâmica molecular através do pacote computacional GROMACS 4.5.6, em conjunto como campo de força CHARMM27 atualizado, foram realizadas a fim de obter a dinâmica estrutural da enzima AHAS em solução aquosa na ausência e na presença do herbicida imazaquin. A minimização de energia assim como a dinâmica molecular foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros avaliados para a simulação sucedida para os sistemas acima descritos, excetuando-se, o formato da caixa de simulação (cúbica com arestas de comprimento 11,09 nm nas três direções) e tempo de simulação (20 ns). Os sistemas simulados nessas etapas do trabalho estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Descrição dos sistemas enzimáticos simulados.

Sistema	Nº moléculas de água	Carga Total	Nº total de átomos
AHAS-FAD-TPP-Mg <sup>2+</sup>	42193	- 4	135642
AHAS-FAD-TPP- Mg <sup>2+</sup> -IQ	42169	- 5	135610

Fonte: Autor

Para a análise das trajetórias obtidas em todas as dinâmicas foi utilizado o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996); e para plotagem de gráficos e análises estatísticas, os programas *Graphing Advanced Computation and Exploration of Data* (XMGRACE) (GRACE DEVELOPMENT TEAM, 2008) e o Origin 6.0. Os valores médios e seus respectivos desvios para as propriedades calculadas apresentaram nível de confiança de 95 %.

#### 4.4 CÁLCULO DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA ENZIMA AHAS

O potencial eletrostático da enzima na presença dos cofatores e do herbicida inibidor foram calculados resolvendo numericamente a equação não-linear de Poisson-Boltzmann (DAVIS; MCCAMMON, 1990; NICHOLLS; HONIG, 1991), cuja metodologia foi implementada no programa APBS (do inglês, *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (HOLST; BAKER; WANG, 2000) em conjunto com os parâmetros ajustados do campo de força CHARMM27. As estruturas tiveram o potencial eletrostático calculado considerando a solvatação implícita em água, com força iônica constante. Para isso, foi utilizada uma constante dielétrica de 78,54, raio do solvente de 1,4 nm, tensão superficial de 0,105 N m<sup>-1</sup> e força iônica de 150 mM.

## 4.5 DESCRIÇÃO ATOMÍSTICA E PREVISÕES MOLECULARES NO PROCESSO DE DETECÇÃO DO HERBICIDA PELO NANOBIOSSENSOR

### 4.5.1 Dinâmica Molecular Direcional e cálculos QM/MM

Para obtenção da energia livre de interação entre o sítio ativo da enzima e o herbicida, simulando experimentos de AFM, a simulação computacional foi realizada através da Dinâmica Molecular Direcional (do inglês, *Steered Molecular Dynamics*) de acordo com protocolo introduzido por Izrailev et al. (1997). A simulação foi realizada utilizando o eixo z em seu sentido positivo como caminho de retirada do herbicida do sítio ativo da enzima com velocidade de afastamento foi de  $0,01 \text{ nm ps}^{-1}$  e aplicando-se uma constante de força de  $367 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  de acordo com a metodologia *constraint pulling*. A dinâmica do sistema foi realizada em *ensemble* NVT utilizando-se o algoritmo *leap-frog* (HOCKNEY, 1970). Foi utilizado tempo de integração 1 fs totalizando 3,5 ns, com temperatura e pressão de referência de 298 K e 1 bar, respectivamente, utilizando termostato v-rescale e barostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984).

Em seguida, para cada ps de simulação a estrutura eletrônica do sistema foi obtida utilizando-se cálculos semi-empíricos *single point*, com hamiltoniano PM7 e o programa MOPAC 2012. O método em questão contém basicamente 3 passos: 1) primeiramente uma análise conformacional do sistema é feita e suas configurações são geradas por MM; 2) as informações estruturais obtidas pela dinâmica molecular são convertidas em um formato compatível com os programas quânticos; 3) cálculos de QM são realizados utilizando-se de métodos semi-empíricos (STEWART, 2012), obtendo-se assim as médias das propriedades eletrônicas (FRANCA, 2009). Os resultados foram analisados utilizando o programa JMol (HANSON et al., 2013).

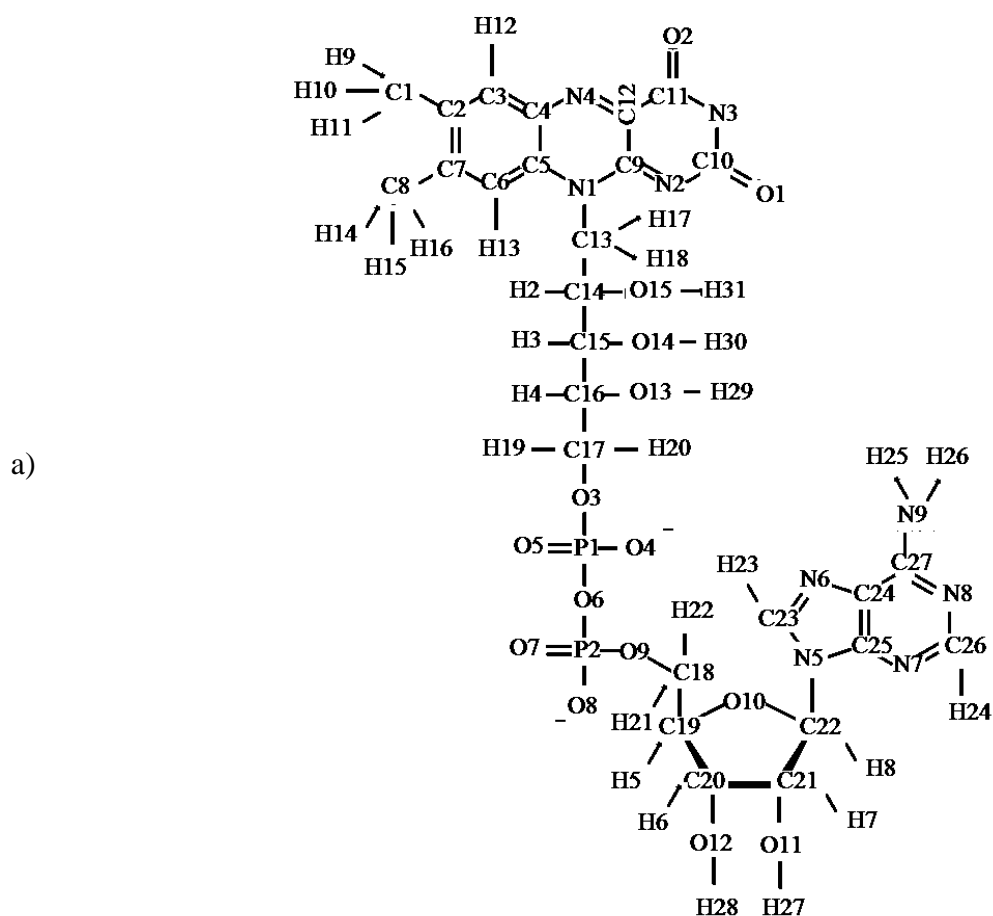
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

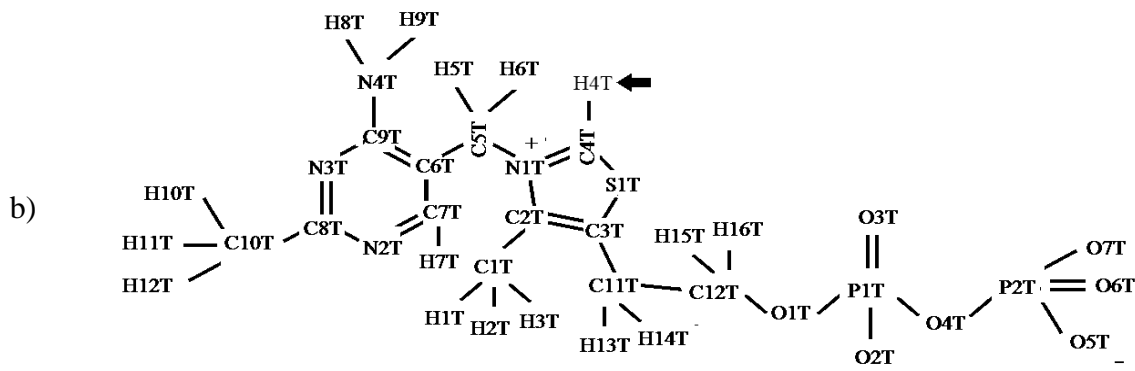
### 5.1 PARAMETRIZAÇÃO E SIMULAÇÃO MOLECULAR DOS COFATORES DA ENZIMA AHAS

#### 5.1.1 Parametrização do campo de força dos cofatores da enzima AHAS

Na Figura 21, estão apresentadas as estruturas dos cofatores da enzima AHAS, de acordo com a nomenclatura dos átomos utilizada no campo de força em questão.

Figura 21 – Nomenclatura utilizada na identificação dos átomos dos cofatores da enzima AHAS: FAD (a) e TPP (b).





Fonte: Autor

Para a validação dos parâmetros de campo de força, os dados obtidos utilizando o software *SwissParam* foram adicionados ao campo de força CHARMM27. Para a estrutura do FAD o programa *SwissParam* gerou adequadamente todos os parâmetros de campo de força (ligados e não-ligados) necessários para a descrição da molécula utilizando simulação por dinâmica molecular. Para a molécula do TPP, nem todos os diedros próprios foram identificados pela ferramenta online e, portanto, não tiveram seus parâmetros gerados. Ao todo foram contabilizadas 18 “penalidades” da ferramenta, para essa molécula. Quimicamente, a molécula de TPP consiste em um anel pirimidínico (anel heterocíclico análogo ao benzeno em que dois átomos de nitrogênio substituem os átomos de carbono nas posições 1 e 3) ligado a um anel tiazol que por sua vez se conecta ao grupamento funcional pirofosfato (difosfato). Todos os diedros não caracterizados apresentam em comum o fato de que dois dos quatro átomos formadores do ângulo diedro compõem o anel tiazol indicando que para essa estrutura, em particular, os diedros não foram identificados e, portanto, não caracterizados. Na Tabela 8 estão listados esses diedros próprios.

Tabela 8 – Diedros não identificados pelo programa *SwissParam* para a molécula TPP e parametrizados separadamente.

C3T C2T C1T H1T	N1T C2T C1T H1T
C3T C2T C1T H2T	N1T C2T C1T H2T
C3T C2T C1T H3T	N1T C2T C1T H3T
C2T C3T C11T C12T	S1T C3T C11T C12T
C2T C3T C11T H13T	S1T C3T C11T H13T
C2T C3T C11T H14T	S1T C3T C11T H14T
C2T N1T C5T C6T	C4T N1T C5T C6T
C2T N1T C5T H5T	C4T N1T C5T H5T
C2T N1T C5T H6T	C4T N1T C5T H6T

Fonte: Autor

A alternativa encontrada foi obter tais parâmetros a partir de uma molécula com estrutura análoga à do TPP. Gutowski e Lienhard (1976) propuseram a Tiamina Tiotiazilone Pirofosfato (TTTPP) como estrutura análoga à Tiamina Pirofosfato. A única diferença entre as estruturas é que para o análogo na posição ocupada pelo átomo H4T (em destaque na Figura 19b) no anel tiazol há um átomo de enxofre. Para a molécula do TTTPP os diedros foram adequadamente descritos e os parâmetros diedrais, descritos na Tabela 9, utilizados na descrição do TPP no campo de força. Vale salientar que as configurações anti ( $180,00^\circ$ ) e eclipsada ( $0,00^\circ$ ) possíveis para ângulos diedrais ao envolverem átomos de um anel de 5 átomos reforça a planaridade deste.

Tabela 9 – Parâmetros diedrais não identificados para o cofator TPP obtidos a partir da estrutura análoga TTTPP empregados no campo de força CHARMM27.

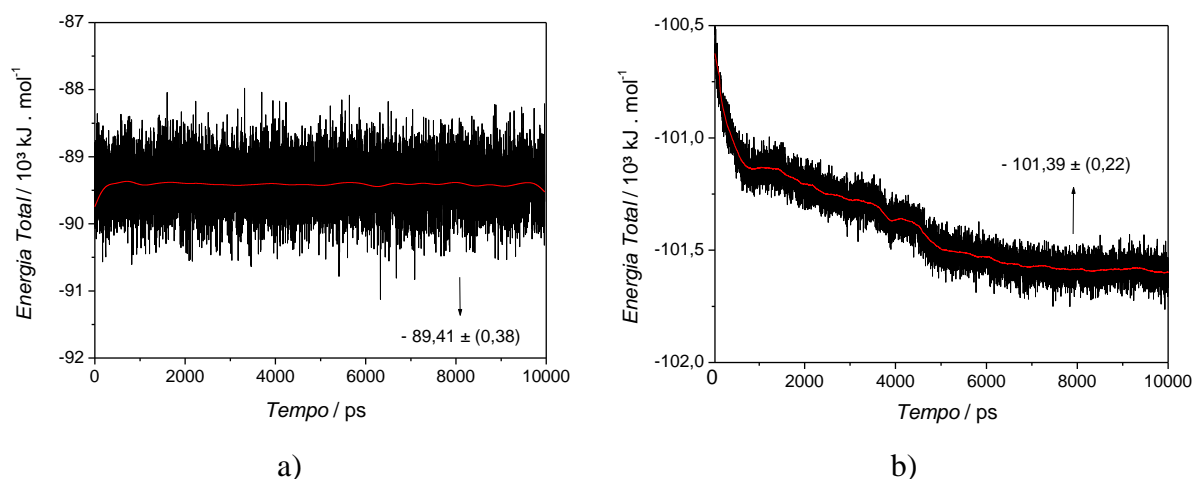
Diedros Próprios	Ângulo de diedro ( $\chi$ ) / graus	Constante de Força ( $k_\chi$ ) / kcal mol <sup>-1</sup>	Multiplicidade
C3T C2T C1T H1T			
C3T C2T C1T H2T	0,00	1,0502	1
C3T C2T C1T H3T	180,00	- 0,8577	2
N1T C2T C1T H1T	0,00	-1,1213	3
N1T C2T C1T H2T			
N1T C2T C1T H3T			
C2T C3T C11T C12T			
C2T C3T C11T H13T	0,00	- 1,0334	1
C2T C3T C11T H14T	180,00	0,5732	2
S1T C3T C11T C12T	0,00	-1,3180	3
S1T C3T C11T H13T			
S1T C3T C11T H14T			
C2T N1T C5T C6T			
C2T N1T C5T H5T	0,00	0,6276	3
C2T N1T C5T H6T			
C4T N1T C5T C6T	0,00	2,0920	3
	0,00	- 4,3932	1
C4T N1T C5T H5T	180,00	2,8493	2
C4T N1T C5T H6T	0,00	0,0460	3

Fonte: Autor

### 5.1.2 Simulações por Dinâmica Molecular

Inicialmente, os sistemas contendo as moléculas dos cofatores em solvente explícito foram submetidos individualmente a 10 ns de simulação, atingindo o equilíbrio termodinâmico (estrutura e energia não variam significativamente). Os gráficos da Figura 22 mostram a evolução temporal da energia total dos sistemas ao longo de toda simulação indicando que os sistemas se organizaram no intuito de minimizar sua energia total.

Figura 22 – Energia total envolvida durante os 10 ns de simulação para os cofatores da enzima AHAS: a) FAD e b) TPP.



Fonte: Autor

Na Figura 22 as setas apontam para os valores médios e entre parênteses estão os respectivos desvios padrão. Para o sistema do cofator FAD observa-se que este permaneceu em equilíbrio energético durante toda a simulação, enquanto que o sistema referente ao cofator TPP teve sua energia estabilizada após 7 ns de simulação. Os pequenos desvios referentes à variação energética apresentada e os valores negativos de energia total demonstram que os sistemas simulados são energeticamente favorecidos.

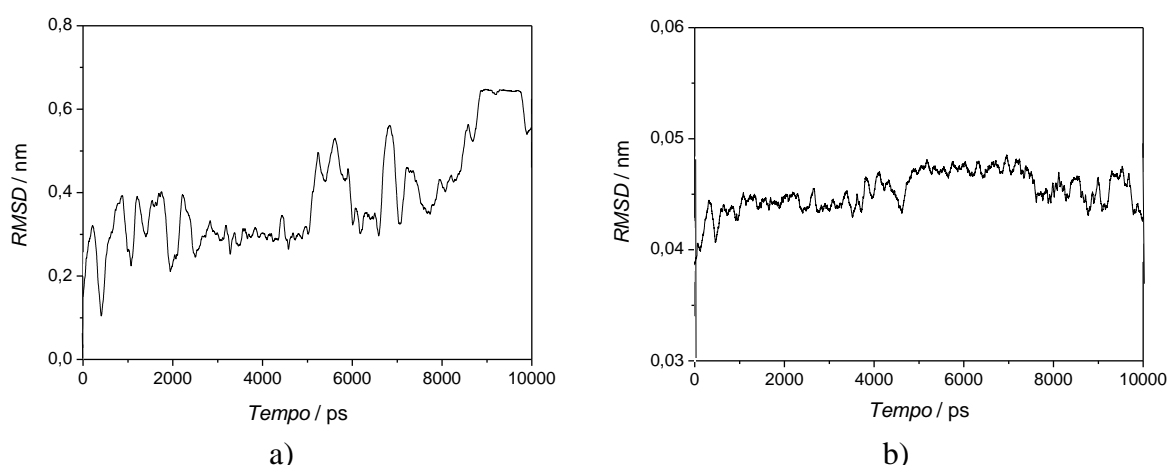
A análise da estabilidade conformacional das estruturas em solução aquosa pode ser avaliada através da medida da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD, do inglês, *Root Mean Square Deviation*). O RMSD pode ser calculado pela fórmula abaixo:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t_1) - r_i(t_2)|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

onde,  $M = \sum_{i=1}^N m_i$ , corresponde à somatória da massa de todos os N átomos da molécula e  $r_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no tempo  $t$ .

Desta forma, após análise por dinâmica molecular o comportamento desta propriedade foi obtido para ambas as estruturas dos cofatores e está apresentado nos gráficos da Figura 23.

Figura 23 – Evolução temporal do RMSD para as estruturas dos cofatores da enzima AHAS:  
a) FAD e b) TPP.



Fonte: Autor

Os valores médios do RMSD para as moléculas de FAD e TPP são, respectivamente, 0,387 ( $\pm$  0,126) nm e 0,045 ( $\pm$  0,003) nm. A diferença entre médias pode ser explicada pelo maior número de graus de liberdade da molécula de FAD quando comparada com a molécula do TPP. Além disso, pelo desvio padrão é notável que ao longo da simulação a estrutura conformacional da molécula de FAD flutuou consideravelmente mais que a de TPP. No entanto, ambos os valores obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza ou inferior aos comprimentos de ligações covalentes típicas predominantes (Å) nas estruturas simuladas, sendo possível apontar para a estabilidade conformacional de ambas em solução aquosa e, por consequência, concluir que os parâmetros de campo de força obtidos para essas moléculas são válidos para a simulação da enzima AHAS, em solução aquosa, na presença desses substratos.



## 5.2 DESENVOLVIMENTO DE MODELO MOLECULAR E PARAMETRIZAÇÃO DOS CAMPOS DE FORÇA PARA O HERBICIDA IMAZAQUIN (IQ)

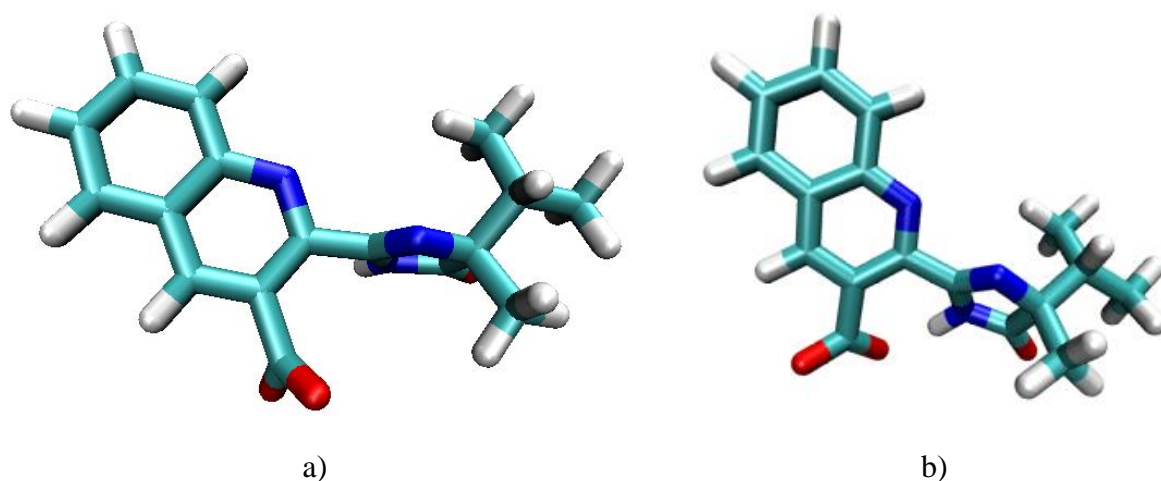
### 5.2.1 Otimização conformacional

A otimização estrutural objetiva a obtenção do conjunto de coordenadas referente à estrutura correspondente a menor energia potencial possível. Para tal, caminha-se sobre a superfície de potencial na direção em que a energia é menor, levando a um mínimo global (PASCUTTI, 2002). Desta forma, a otimização prévia da estrutura do imazaquin, no vácuo, faz-se necessária para que os resultados sejam mais concisos, uma vez que na estrutura minimizada forças menores agem sobre cada um dos átomos da molécula aprimorando o arquivo *input* da dinâmica.

A seleção da função de base adequada para a otimização estrutural de uma molécula é fundamental para a correta execução do cálculo quântico. Para tanto utilizou-se a função de base difusa 6-311++G(d,p), indicada para descrever espécies aniônicas e moléculas que contêm pares de elétrons livres com elevada densidade eletrônica distante do centro nuclear da molécula, a exemplo, o imazaquin. Esta habilidade da função de base escolhida é resultado da adição de funções altamente difusas ao conjunto de bases e da sua aplicação em todos os átomos. Além disso, um conjunto de funções Gaussianas de polarização do tipo ‘d’ é adicionado a cada átomo não-hidrogenoide e um conjunto de funções do tipo ‘p’ aos hidrogênios (LEACH, 2001).

O desvio posicional dos átomos da estrutura do imazaquin na conformação inicial, obtida através da base de dados ZINC, e a estrutura após a minimização da energia é de 0,207 nm ocasionado basicamente pela distinção entre as posições dos radicais e átomos ligados diretamente aos átomos de carbono componentes dos anéis aromáticos. A comparação entre as estruturas pode ser realizada observando-se a Figura 24.

Figura 24 – Estruturas inicial (a) e otimizada (b) da molécula do imazaquin.

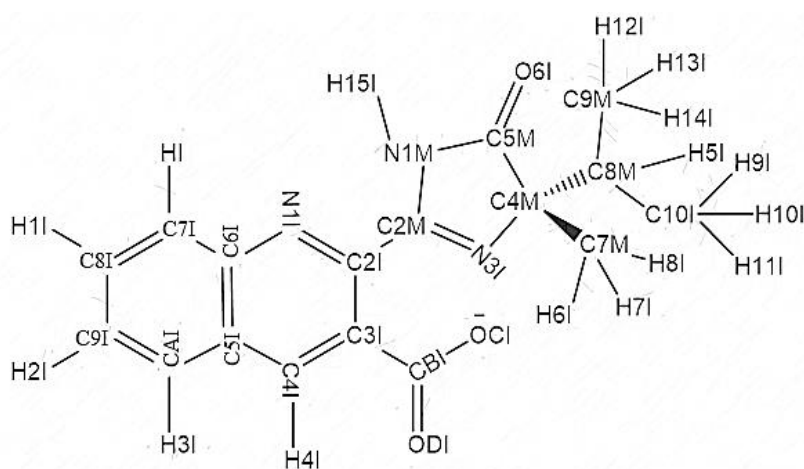


Fonte: Autor

### 5.2.2 Parametrização do campo de força do herbicida imazaquin

No intuito de facilitar a visualização das interações a serem mencionadas encontra-se, na Figura 25, a estrutura do herbicida imazaquin com a devida nomenclatura dos referidos átomos conforme descritos no campo de força.

Figura 25 – Nomenclatura utilizada na identificação dos átomos do imazaquin.



Fonte: Autor

Para a validação do modelo estrutural do herbicida imazaquin, utilizando simulação por dinâmica molecular, os dados obtidos utilizando o software *SwissParam* foram adicionados ao campo de força CHARMM27. No entanto, nem todos os diedros identificados pelos GROMACS foram caracterizados. Foram contabilizadas apenas 7 “penalidades” da ferramenta para essa molécula entre diedros próprios e impróprios. Todos os diedros próprios não-descritos apresentam em comum a ligação planar, em anéis aromáticos, entre átomos de carbono com hibridização  $sp^2$  e heteroátomo (N) ou carbono de radicais metila. Já a não obtenção dos parâmetros do diedro impróprio é recorrente nesse tipo de ferramenta porque, em geral, movimentos fora do plano são frequentemente reproduzidos corretamente apenas pelo ângulo de valência e pelos termos referentes ao diedro próprio de modo que a maioria dos centros não precisa da descrição desses diedros impróprios.

A fim de que os parâmetros mais apropriados para a descrição desses diedros fossem obtidos sem a realização de cálculos quânticos, que demandariam esforço e tempo demasiados, a alternativa encontrada foi a identificação de diedros análogos na mesma molécula, considerando-se a similaridade entre os mesmos, ou seja, a transferabilidade dos parâmetros desse campo de força. Para tanto, foram identificados os diedros compatíveis com os diedros não gerados, e que tiveram seus parâmetros adequadamente descritos pelo software. Na Tabela 10 estão listados os diedros não identificados pela ferramenta *online* e a associação com os diedros genéricos utilizados.

Tabela 10 – Diedros próprios e impróprios não gerados pelo *SwissParam* e seus diedros análogos na molécula do imazaquin.

<b>Diedros Próprios</b>	<b>Diedros análogos</b>
H1I C8I C9I CAI	C7I C8I C9I H2I
N1I C2I C2M N1M	C3I C2I C2M N3I
C3I C2I C2M N1M	N1I C2I C2M N3I
C2M N3I C4M C5M	C2M N1M C5M C4M
C2M N3I C4M C7M	C4M N3I C2M C2I
C2M N3I C4M C8M	C4M N3I C2M C2I
<b>Diedros Impróprios</b>	<b>Diedros análogos</b>
C6I C7I C8I H1I	C5I CAI C9I H2I

Fonte: Autor

Desta forma, todos os parâmetros do campo de força para o herbicida puderam ser descritos adequadamente utilizando os parâmetros: ângulos, constantes de força de diedro próprio e impróprio, e multiplicidade. A Tabela 11 mostra esses parâmetros, de acordo com a definição de cada átomo.

Tabela 11 – Parâmetros diedrais não identificados para a molécula do imazaquin obtidos a partir dos diedros análogos da própria molécula empregados no campo de força CHARMM27.

Diedros Próprios	Ângulo de diedro ( $\chi$ ) / graus	Constantes de Força ( $k_\chi$ ) / kcal.mol <sup>-1</sup>	Multiplicidade
H1I C8I C9I CAI	180,00	14,6440	2
N1I C2I C2M N1M	180,00	5,2300	2
C3I C2I C2M N1M	180,00	5,2300	2
C2M N3I C4M C5M	180,00	12,5520	2
C2M N3I C4M C7M	180,00	3,7656	2
C2M N3I C4M C8M	180,00	3,7656	2
Diedros Impróprios	Ângulo de diedro ( $\varphi_0$ ) / graus	Constantes de Força ( $k_\varphi$ ) / kcal.mol <sup>-1</sup>	
C7I C8I C6I H1I	0,00	9,0291	

Fonte: Autor

Os valores apresentados na Tabela 11 estão de acordo com o esperado para os ângulos diedrais da molécula do herbicida imazaquin. Em geral, uma molécula tem maior estabilidade com os ângulos diedros na posição trans. Dessa forma, todos os ângulos diedrais próprios assumindo o valor de 180° descreve-se mais adequadamente a estrutura da molécula otimizada geometricamente. As constantes de força seguem uma tendência crescente referente à força aplicada para restringir o posicionamento: menor valor para diedros envolvendo a extremidade do diedro carbono de radical metila (C2M N3I C4M C7M e C2M N3I C4M C8M). Isto favorece maior mobilidade, pois é um valor intermediário para diedros envolvendo uma ligação entre dois anéis aromáticos distintos. Além disso, dois dos átomos são componentes de um anel benzênico ligando a outros dois de um anel pirimidínico (N1I C2I C2M N1M e C3I C2I C2M N1M), o que limita mais a mobilidade dos diedros, e valores maiores para aqueles diedros em que três ou todos os átomos são componentes de anel

aromático (H1I C8I C9I CAI e C2M N3I C4M C5M) resultando numa maior restrição posicional pela inabilidade intrínseca desses anéis de rotacionar.

### 5.2.3 Cálculo das cargas RESP (*Restrained Electrostatic Potential*)

Como nos sistemas em estudo as interações eletrostáticas são de grande relevância para estimar as energias eletrostáticas, e úteis no entendimento da reatividade química da molécula do herbicida, a descrição das cargas atômicas parciais foi obtida utilizando-se a metodologia RESP, cujos valores reproduzem adequadamente os momentos multipolares quânticos e também as interações intermoleculares (BAYLY et al., 1993). A vantagem de se usar métodos *ab initio*, neste caso Hartree-Fock, na geração das cargas RESP é a representação mais precisa da distribuição das cargas, embora exija maior tempo computacional. Além disso, a função de base é fundamental no cálculo, e a qualidade da representação das cargas atômicas aumenta de acordo com o conjunto de base usado.

Em geral, adota-se o procedimento de restrição das cargas que serve para reduzir as cargas em átomos sem impactar o ajuste, além de minimizar uma variância rotacional das cargas atômicas, prejudicial na análise das conformações da molécula (BAYLY et al., 1993). No procedimento de ajuste das cargas pontuais do modelo RESP, foi assumido que cada conjunto de átomos, descritos abaixo, possui a mesma quantidade de carga:

- H1 / H1I / H2I / H3I
- CAI / C7I / C8I / C9I
- OCI / ODI
- H6I / H7I / H8I
- C9M / C10I
- H9I / H10I / H11I / H12I / H13 / H14I

Nota-se que os hidrogênios dos grupos metílicos receberam cargas equivalentes, assim como aqueles presentes no anel aromático (H1 / H1I / H2I / H3I). Esta restrição nos átomos de hidrogênio é tida como uma restrição fraca, visto que se trata de átomos mais leves e de menor carga, ao contrário dos átomos de oxigênio (ODI / OCI), onde a restrição é mais forte.

As cargas atômicas parciais obtidas do cálculo, segundo metodologia RESP, podem ser visualizadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Cargas atômicas parciais para a molécula do herbicida Imazaquin, seguindo o modelo RESP.

Átomo	Carga	Átomo	Carga
C5I	-0,001	C7M	-0,419
C6I	0,432	H4I	0,160
C7I	-0,173	C8I	-0,173
C9I	-0,173	CAI	-0,173
N1I	-0,638	C4I	-0,058
C3I	-0,357	C2I	0,413
CBI	0,990	N3I	-0,845
OCI	-0,828	ODI	-0,828
C2M	0,698	N1M	-0,881
C5M	0,836	C4M	0,687
O6I	-0,698	C8M	-0,133
C10I	-0,064	C9M	-0,064
H1	0,122	H1I	0,122
H2I	0,122	H3I	0,122
H6I	0,076	H7I	0,076
H8I	0,076	H5I	0,071
H9I	0,007	H10I	0,007
H11I	0,007	H12I	0,007
H13I	0,007	H14I	0,007
H15I	0,464		
Carga Total			-1,000

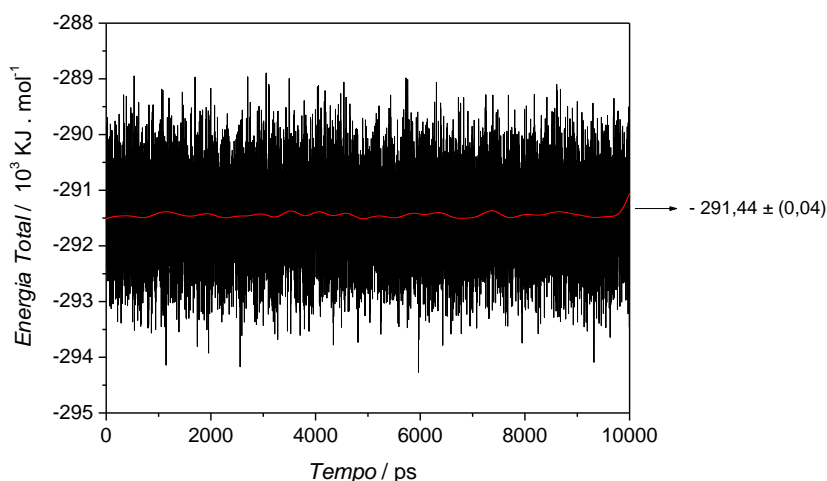
Fonte: Autor

Os dados apresentados na Tabela 12 mostram que no conjunto de cargas obtido, todas as restrições impostas foram adequadas. Os átomos de hidrogênio assumiram carga positiva e os de oxigênio e nitrogênio, por sua maior eletronegatividade, carga negativa. Vale destacar que os átomos de oxigênio OCI e ODI, onde se localiza a carga negativa da molécula, são os átomos que apresentam carga elementar mais negativa. Consequentemente, os átomos de carbono assumiram cargas parciais variáveis conforme efeito indutivo resultante das conectividades com os demais átomos. Dessa forma, o conjunto de cargas obtido para a molécula do herbicida imazaquin exprime com precisão, em termos de cargas parciais, o comportamento esperado para cada átomo.

### 5.2.4 Simulações por Dinâmica Molecular

Inicialmente, o sistema contendo a molécula de imazaquin em solvente explícito, foi submetido a 10 ns de simulação, atingindo o equilíbrio termodinâmico. O gráfico da Figura 26 mostra a evolução temporal da energia total do sistema ao longo de toda simulação indicando que já nos picossegundos iniciais o sistema se organizou no intuito de minimizar sua energia total.

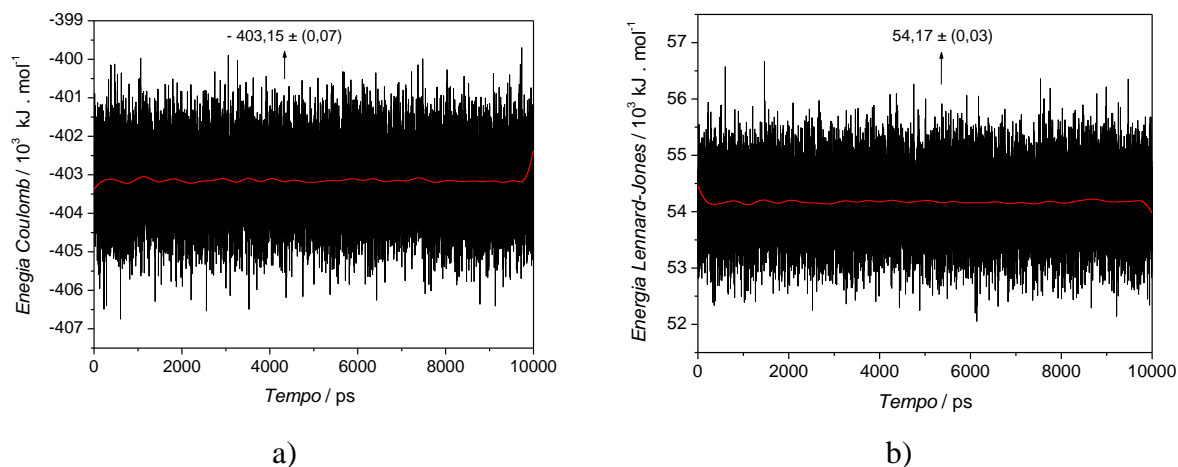
Figura 26 – Energia total do sistema ao longo da dinâmica molecular.



Fonte: Autor

Na Figura 26 a seta aponta para o valor médio e entre parênteses está o desvio padrão. Nota-se que o sistema permaneceu em equilíbrio energético desde o início da simulação até seu final. Isso ocorreu porque o sistema em estudo é relativamente pequeno, contendo uma única molécula de imazaquin e 8935 moléculas de água, previamente termalizada, cuja estrutura havia sido otimizada, para se alcançar uma configuração estrutural estável energeticamente. Desta forma, a pequena variação energética apresentada, reforça a eficácia da otimização realizada e os valores negativos de energia total demonstram a correspondência a um sistema real energeticamente favorável. Do mesmo modo, as contribuições energéticas de Lennard-Jones (LJ) e de Coulomb para a energia total podem ser calculadas a fim de se compreender qual tipo de interação intermolecular é mais relevante para a estabilização do herbicida imazaquin em meio aquoso. O cálculo destas energias pode ser visualizado nos gráficos da Figura 27.

Figura 27 – Variação temporal da energia associada às interações do tipo: a) Coulômbicas; b) van der Waals ou de Lennard-Jones.



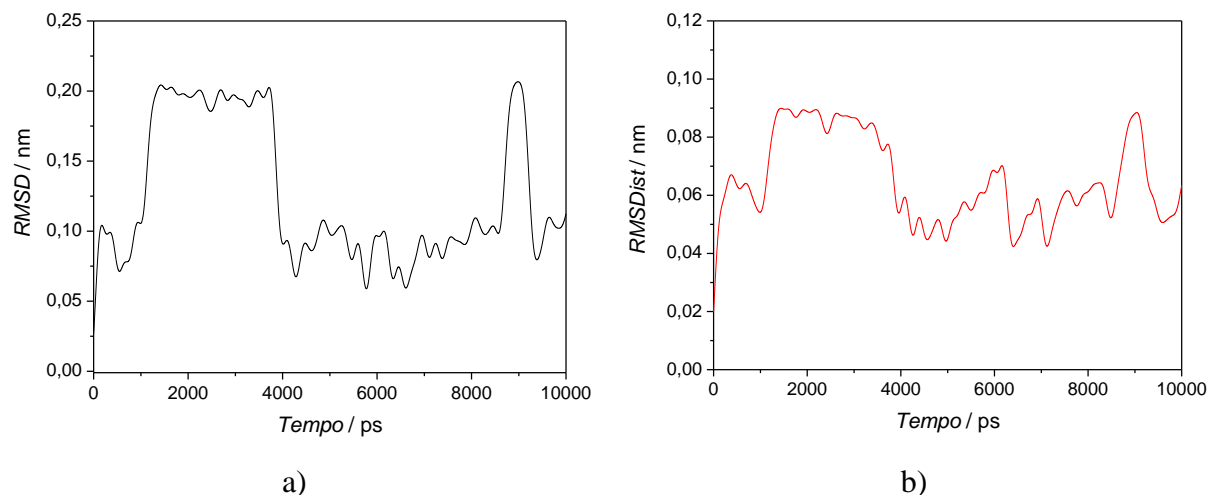
Fonte: Autor

Os gráficos apresentados na Figura 27 demonstram que o comportamento do imazaquin em solução se dá prioritariamente através de interações coulômbicas em detrimento das interações de van der Waals (Lennard-Jones). Isso é evidenciado pela grande contribuição da energia coulômbica à energia total, visto que esta atinge valores bastante negativos durante a simulação, enquanto que a energia de LJ atinge valores positivos, mas que são pouco significativos como contribuintes da energia total. O fato da molécula do imazaquin ser carregada negativamente (forma aniônica) explica a maior relevância das interações eletrostáticas do sistema em solução em comparação às interações não-ligadas.

A variação conformacional do imazaquin ao longo do tempo de simulação pode ser visualizada através do cálculo da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) e do RMSDist, um método de ajuste ao cálculo do RMSD que calcula a variação das distâncias atômicas em relação às suas posições iniciais.



Figura 28 – Evolução temporal da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) (a) e do RMSDist (b).



Fonte: Autor

O cálculo do RMSD da estrutura final da molécula de imazaquin mostrou, em relação ao valor médio (0,12 nm), um desvio de 0,05 nm, valor consideravelmente influenciado por variações estruturais na molécula, em especial, no intervalo de 8,8 a 9 ns de simulação. O valor médio para o RMSD das estruturas, em relação à estrutura inicial, encontra-se na mesma ordem de grandeza do comprimento de ligações covalentes típicas predominantes (Å) na estrutura do herbicida em questão. Portanto, tal variação está associada à mobilidade das posições atômicas da molécula. Vale destacar aqui que o sistema simulado não representa, em termos de concentração, condições reais de operação, mas permite mostrar estatisticamente a estabilidade conformacional da estrutura do imazaquin em solução aquosa indicando que o mesmo não perde sua estrutura ao longo da simulação. Isto permite afirmar que a simulação mostra estruturas mais estáveis em solução aquosa, conforme apontado pelos termos energéticos previamente apresentados. O cálculo do RMSDist apresentou comportamento similar ao do RMSD da estrutura final do imazaquin, porém com um desvio menor em relação ao valor médio (0,06), de 0,02 nm. Isto demonstra a pequena mobilidade dos átomos da molécula, em relação às suas coordenadas iniciais e ratifica a estabilidade conformacional da molécula em solução aquosa.

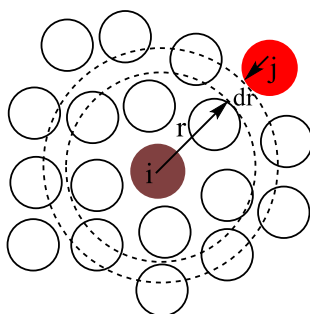
Todos os parâmetros até então apresentados para o sistema em questão validam o modelo molecular proposto e os parâmetros ligados e não ligados obtidos e inseridos no campo de força para a descrição adequada da molécula do herbicida imazaquin.

Para uma melhor compreensão do comportamento do imazaquin em solução aquosa, realizou-se a análise da distribuição radial de pares para indicar os sítios moleculares mais

favoráveis à formação de ligações de hidrogênio ao longo da trajetória da simulação por dinâmica molecular, com as moléculas de solvente, no caso a água.

As funções radiais de distribuição, RDF (do inglês, *Radial Distribution Function*) são funções úteis na descrição da estrutura de um sistema, pois expressam a probabilidade de se achar um átomo  $i$  ou uma molécula, a uma distância  $r$  de um outro átomo  $j$  (ou molécula).

Figura 29 – Representação da distribuição radial de um átomo  $i$  a uma distância  $r + dr$  de um átomo  $j$ .



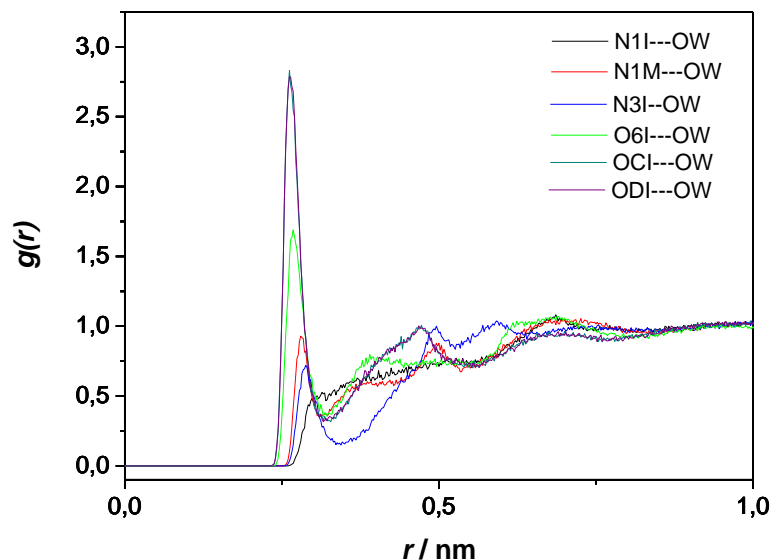
Fonte: Autor

Esta função pode ser expressa por:

$$g(r) = \frac{1}{N\rho} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{\delta(r_{ij}-r)}{4\pi r^2} \quad (17)$$

sendo,  $\rho$  a densidade das espécies, ou o número de partículas por unidade de volume. Numa análise de RDF é estimado, para cada distância  $r$ , o número de partículas contidas em uma calota esférica de espessura  $dr$ , e feito a média durante todo o período de simulação. A partir desse resultado, as RDF indicam as distâncias de maior e menor probabilidade de se encontrar outros átomos. A análise de RDF é de grande importância no estudo de sistemas compostos por moléculas de solvente e sua interação com o soluto. Deste modo, esta foi realizada para os átomos mais eletronegativos da molécula do herbicida (N1I, N1M, N3I, O6I, OCI, ODI), a fim de identificar as interações mais relevantes do sistema. Os dados observados podem ser visualizados na Figura 30.

Figura 30 – Distribuição Radial de Pares para os átomos mais eletronegativos da molécula do imazaquin com a água em função da distância das ligações ( $r$ ).



Fonte: Autor

Pela análise do gráfico da Figura 30, é notável que as funções de distribuição radial de pares mais significativas referem-se às interações dos átomos de oxigênio, ODI, OCI e O6I, com as moléculas de solvente, visto que apresentaram picos de maior magnitude e mais definidos (mais estreitos). Isto pode ser explicado pela forte interação entre os átomos de oxigênio, que são mais eletronegativos, e os átomos de hidrogênio das moléculas de água, resultando em maior contribuição para a formação de ligações de hidrogênio (LH) no sistema.

A análise do número de ligações de hidrogênio intermoleculares é de grande importância para a elucidação do sistema. Neste trabalho, os critérios utilizados para ligações de hidrogênio são de 3,5 Å para a distância em relação ao raio de corte entre os átomos doador e aceptor e 30° para o ângulo entre centros de referência escolhido nos átomos doador e aceptor (TORSHIN; WEBER; HARRISON, 2002).

Deste modo, foram realizados cálculos do número médio de ligações de hidrogênio e tempo de vida destas ligações envolvendo o imazaquin e o solvente, indicadas pelo gráfico da Figura 30, ao longo dos 10 ns de simulação.

Tabela 13 – Número médio das ligações de hidrogênio possíveis e seus respectivos tempos de vida para a interação do imazaquin com o solvente ao longo de toda a trajetória.

Tipo de ligação de hidrogênio	Número médio de LH	Tempo de vida / ps
O6I --- H <sub>2</sub> O	$1,83 \pm 0,58$	2,15
OCI --- H <sub>2</sub> O	$2,71 \pm 0,61$	3,76
ODI --- H <sub>2</sub> O	$2,74 \pm 0,72$	3,75
IQ --- H <sub>2</sub> O	$9,75 \pm 1,23$	2,75

Fonte: Autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 13, nota-se que os átomos OCI e ODI apresentaram número médio de ligações de hidrogênio similares e maiores quando comparados ao átomo O6I, assim como o tempo de vida destas ligações. A presença da carga negativa do imazaquin nos átomos de OCI e ODI justifica a maior contribuição destes ao valor total das ligações em estudo, individualmente cerca de 38 %. A presença de densidade eletrônica altamente negativa nestes átomos afeta o número de ligações de hidrogênio influenciando diretamente na estrutura obtida ao final da dinâmica e na orientação das moléculas de água ao seu redor, resultando em um número maior de ligações de hidrogênio. Ademais, a similaridade no número de ligações de hidrogênio estabelecidas por estes átomos e o solvente e do tempo de vida das mesmas, deve-se ao efeito de ressonância referente ao deslocamento de elétrons sob o grupo ODI-CBI-OCI.

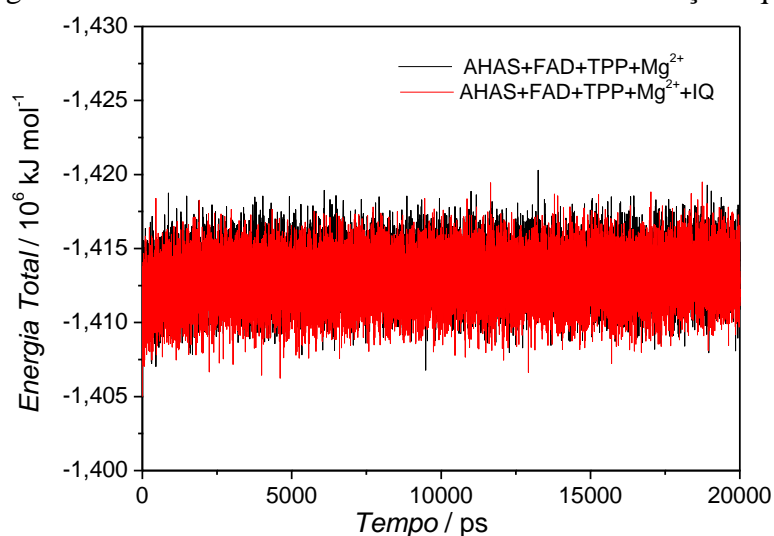
### 5.3 SIMULAÇÃO DA ENZIMA AHAS E DO SISTEMA AHAS-IQ

Estudos anteriores, feitos por Ierich e colaboradores demonstraram que a presença de todos cofatores conferem estabilidade estrutural à forma dimérica da enzima AHAS (IERICH et al., 2015). Por essa razão e considerando que a estabilidade estrutural da enzima é de fundamental importância para o desenvolvimento de um nanobiossensor preciso (DA SILVA et al., 2013, 2014; OLIVEIRA et al., 2013), o sistema de partida foi a enzima AHAS na presença dos seus cofatores: FAD, TPP e  $Mg^{2+}$ . Inicialmente, foram avaliados o comportamento e estabilidade da enzima em solução aquosa. Em seguida, na presença do

herbicida imazaquin, foi avaliada a interação substrato-enzima enfatizando as interações não-específicas que podem ser utilizadas como linha base na medição experimental do biossensor.

A Figura 31 ilustra a evolução temporal da energia total tanto para o sistema contendo apenas a enzima AHAS e seus cofatores (em preto) quanto para a enzima na presença dos cofatores e do herbicida imazaquin no sítio ativo (em vermelho). Os gráficos indicam que ambos atingiram o equilíbrio termodinâmico por meio da estabilização dos níveis energéticos em cerca de  $-1,413 \times 10^6 (\pm 0,002) \text{ kJ mol}^{-1}$  – tamanha similaridade no parâmetro energético resultou na quase sobreposição total dos gráficos.

Figura 31 – Energia total dos sistemas enzimáticos simulados em solução aquosa.



Fonte: Autor

Uma importante observação acerca do sistema AHAS-FAD-TPP-Mg<sup>2+</sup> é com relação ao número de ligações de hidrogênio estabelecida pelo cofator FAD e a enzima AHAS. Enquanto a função desse cofator não é cientificamente definida, as suas posições atômicas e interações com os resíduos da enzima já foram adequadamente descritas. Ao longo de toda a simulação foram quantificadas aproximadamente 12 ( $\pm 1$ ) ligações de hidrogênio entre o cofator e a enzima. Pang e colaboradores (2003) determinaram a estrutura cristalográfica da enzima de origem da *Saccharomyces cerevisiae* (estrutura consideravelmente similar à estudada nesse trabalho), e observaram que a posição do cofator FAD permite realizar 12 ligações de hidrogênio entre o cofator e os resíduos do seu sítio específico de ligação (PANG; GUDDAT; DUGGLEBY, 2003). A similaridade entre o número de ligações de hidrogênio indica que o sistema simulado é representativo da estrutura catalítica da enzima.

Sabendo que as propriedades intrínsecas da enzima em solução aquosa são de fundamental importância para compreender adequadamente a interação da enzima AHAS, com o herbicida, a dinâmica molecular do sistema AHAS-FAD-TPP-Mg<sup>2+</sup> permitiu a análise da estabilidade conformacional da enzima foi obtida através dos cálculos do RMSD e do Raio de Giro ( $R_g$ ) que avaliam, respectivamente, o distanciamento das posições atômicas da enzima em relação à estrutura nativa e a compactação da sua estrutura. O raio de giro da enzima é dado pela equação que se segue:

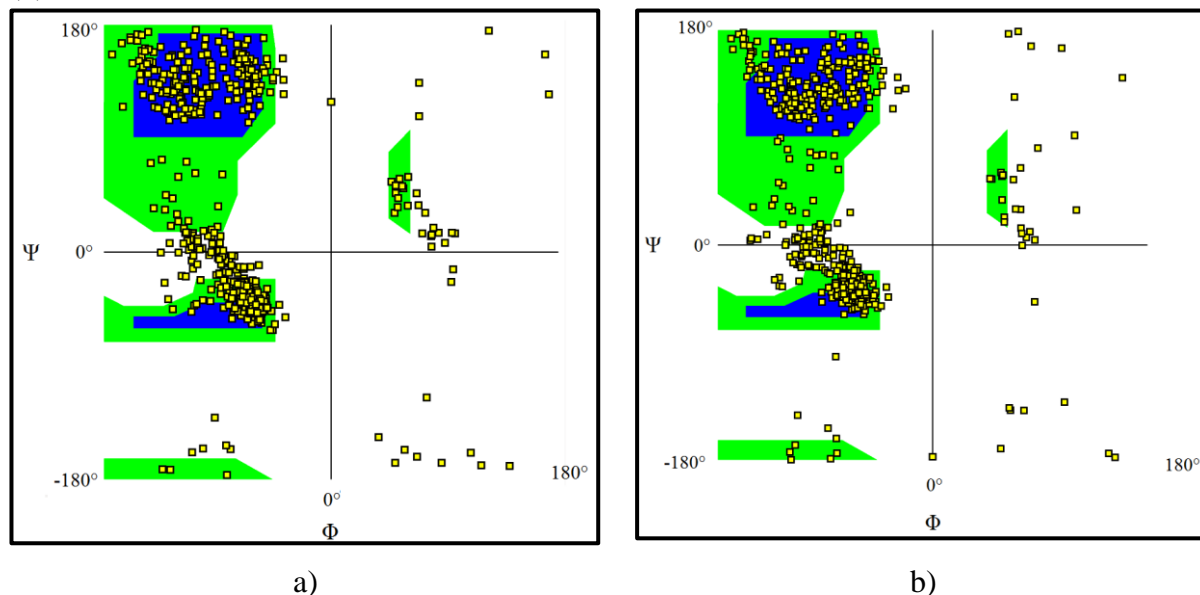
$$R_g = \left[ \frac{\sum_{i=1}^N |r_i|^2 m_i^{1/2}}{\sum_{i=1}^N m_i} \right] \quad (18)$$

onde,  $m_i$  é a massa do átomo  $i$  e  $r_i$  é sua posição em relação ao centro de massa.

A enzima AHAS apresentou RMSD de 0,235 ( $\pm$  0,029) nm e raio de giro 2,595 ( $\pm$ 0,006) nm apontando para uma pequena mobilidade estrutural da enzima em solução aquosa, à temperatura ambiente, apresentando uma leve e sistemática flutuação. Esses valores indicam que não há alteração significativa na conformação da enzima nativa e sugere que essa não perderá sua atividade se a mesma for imobilizada no cantiléver do AFM ou, ainda, no momento da detecção do herbicida.

Outro importante parâmetro monitorado para verificar a possibilidade de desnaturação da enzima é sua estrutura secundária. Tal análise foi realizada verificando-se a distribuição dos ângulos diedrais  $\Phi$  (fi) e  $\Psi$  (psi) da cadeia principal que é apresentada em um gráfico de duas dimensões conhecido como diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Esses ângulos são resultantes das rotações das ligações em torno do C $\alpha$  de cada aminoácido, sendo  $\Phi$  para a ligação N---C $\alpha$  e  $\Psi$  para a ligação C $\alpha$ ---C. Inicialmente,  $\Phi$  e  $\Psi$  podem assumir qualquer valor entre -180° até +180°, mas muitos desses valores não são atingíveis por questões de impedimento estérico entre os átomos da cadeia polipeptídica e os átomos das cadeias laterais dos aminoácidos (NELSON; COX, 2011). Os diagramas para a estrutura inicial e final (Figura 32), obtidos utilizando-se a ferramenta Visual Molecular Dynamics (VMD), indicam que nenhuma mudança significativa entre os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  depois de 20 ns de simulação foi detectada. Esse resultado sugere uma estereoquímica de qualidade, pois a grande maioria de resíduos encontra-se em regiões permitidas (em azul) ou parcialmente permitidas (em verde).

Figura 32 – Diagrama Ramachandran para a estrutura inicial (a) e após 20 ns de simulação (b) da enzima AHAS.



Fonte: Autor

Vale ressaltar aqui que os resíduos que se encontram em regiões desfavoráveis (em branco) são predominantemente os de glicina, porque a cadeia lateral desse aminoácido se restringe a apenas um átomo de hidrogênio o que possibilita maior liberdade para os ângulos diedrais verificados. Essa análise não valida por si só uma estrutura proteica, mas trata-se de uma ferramenta importante no estudo da estrutura tridimensional da enzima e a partir desse é possível analisar com mais propriedade, em nível molecular, a interação da enzima com o herbicida inibidor. Além disso, conforme apontado por Van Gunsteren e colaboradores (1995) podem ser necessários tempos maiores de simulação para a avaliação da estabilidade estrutural de enzimas. Para isso, planeja-se que essa trajetória seja estendida e que novos dados sejam analisados futuramente (VAN GUNSTEREN et al., 1995).

As informações fornecidas pelo visualizador de sequência da cadeia da enzima (*Sequence Chain View*) do banco de dados PDB os aminoácidos componentes do sítio ativo e que são responsáveis pela ligação do herbicida imazaquin ao mesmo são: Met351, Asp376, Arg377, Lys381, Trp574, Ser653, Gly654. Portanto, será dessa forma considerado o sítio ativo para as análises da interação do complexo enzima-herbicida.

O herbicida imazaquin está posicionado no sítio ativo da enzima com o agrupamento imidazolona voltado para a superfície da enzima e o agrupamento quinolina, que tem como ligante o agrupamento carboxil, encontra-se direcionado para o centro C2 (C4T na nomenclatura adotada nesse trabalho) do cofator TPP que também se encontra no sítio ativo.

Com o herbicida no sítio ativo da enzima a estrutura se encontra numa conformação “fechada” e acredita-se que essa representa a forma cataliticamente ativa da enzima AHAS (PANG; GUDDAT; DUGGLEBY, 2003). Dessa forma, pelo fato de o sítio ativo não se encontrar acessível ao solvente a estrutura cristalográfica 1Z8N, aqui utilizada, é tida como a mais representativa da enzima AHAS (MCCOURT; DUGGLEBY, 2006). Para verificar tal efeito de solvatação calculou-se o número de ligações de hidrogênio ao longo de toda a simulação conforme dados apresentados na Tabela 14. Inicialmente, verifica-se que o número de ligações de hidrogênio ao início da simulação é pequeno quando comparado com o valor após 20 ns de simulação, isso porque o sistema não interage efetivamente com as moléculas de solvente no início da simulação de forma que à medida que a simulação se processa esse número cresce como consequência da solvatação do sistema. Ao se observar o número de ligações de hidrogênio formadas entre o sítio ativo e o solvente verifica-se que esse não contribui significativamente para o quantitativo total de ligações de hidrogênio ao longo da simulação, indicando que de fato o sítio ativo não se encontra acessível ao solvente conforme esperado. Com relação ao herbicida observa-se que o mesmo estabelece uma quantidade razoável de ligações de hidrogênio, em especial, pelo agrupamento O6I ligado ao anel imizadol posicionado na direção da superfície da enzima; portanto, na região do sítio ativo mais disponível para interação com as moléculas de água. Além disso, de acordo com McCourt e colaboradores (2006) na estrutura cristalográfica o herbicida imazaquin estabelece com os resíduos do sítio ativo apenas uma ligação de hidrogênio tendo sido esse mesmo valor médio encontrado para essa interação ao longo de toda a simulação indicando que de fato após a solvatação as moléculas de água não alteram significativamente as interações que ocorrem no sítio ativo da enzima corroborando com as informações acima apresentadas (MCCOURT et al., 2006).

Tabela 14– Número de ligações de hidrogênio formadas ao longo da simulação do sistema enzimático na presença do herbicida imazaquin.

AHAS --- H <sub>2</sub> O	1098 ± 20
Sítio Ativo --- H <sub>2</sub> O	973 (0 ns) e 1116 (20 ns)
Sítio Ativo --- IQ	19 ± 2
IQ --- H <sub>2</sub> O	1 ± 0,6
Sítio Ativo - Intermoleculares	8 ± 1
	1 ± 0,5

Fonte: Autor

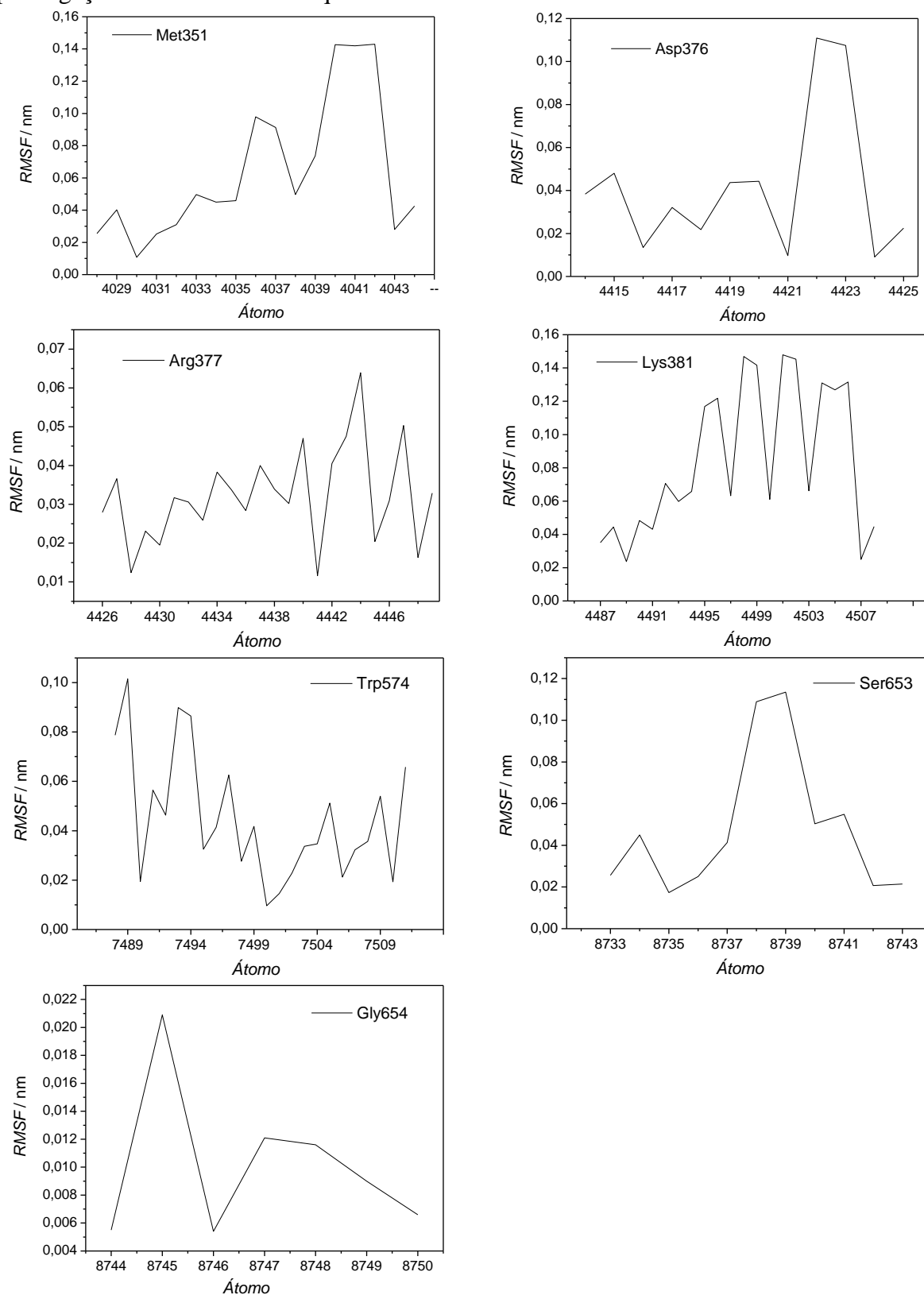


A raiz quadrada da flutuação quadrática média (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation*) dos resíduos de aminoácidos componentes do sítio ativo da enzima foi avaliada com objetivo de verificar a variação da posição dos átomos de cada resíduo durante a dinâmica (Figura 33). O RMSF é dado pela equação que se segue:

$$RMSF_i = \left[ \frac{1}{\tau} \sum_{j=1}^{\tau} |r_i(j) - r_i|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (19)$$

onde,  $r_i(j)$  são as coordenadas do *i-ésimo* átomo no passo de tempo  $j$ ,  $r_i$  são suas posições médias e  $\tau$  é o tempo expresso como o número de passos da simulação (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Figura 33 – Flutuação quadrática média (RMSF) dos 7 resíduos do sítio ativo responsáveis pela ligação do herbicida imazaquin.



Fonte: Autor

Os gráficos apresentados na Figura 33 indicam que os resíduos apresentaram apenas uma flutuação sistemática resultante da solvatação do sistema. O resíduo de lisina (Lys381) apresentou maior flutuação nas posições atômicas em função do seu posicionamento mais externo do canal do sítio ativo o que resulta numa maior interação com as moléculas de solvente. Já o resíduo de glicina, apesar de ser o menor dentre os aminoácidos e possibilitando maior mobilidade, este se encontra entre os resíduos de Lys381 e Ser653 o que acaba restringindo sua flutuação posicional. Os resíduos de Ser653 e Trp574 são anotados como resíduos importantes no mecanismo de resistência da enzima AHAS ao herbicida imazaquin, isso porque, o triptofano (Trp574) que tem interação direta com a molécula do herbicida é um dos responsáveis por determinar a forma do canal do sítio ativo e, portanto, terá influência significativa no mecanismo de detecção do nanobiossensor (DUGGLEBY; PANG, 2000; TRANEL; WRIGHT, 2002). Semelhantemente, o resíduo Ser653 confere forte resistência aos herbicidas da classe imidazolinonas por sua posição de proximidade ao espaço ocupado pelo anel aromático da molécula do herbicida e, conseqüente contato entre eles, o que acaba restringindo sua movimentação, resultando num baixo RMSF (HATTORI et al., 1992; HAUGHN; SOMERVILLE, 1990). Torna-se importante ressaltar que após os 20 ns de simulação o resíduo de Asp376 não se encontrava mais dentro da região de 5 Å de distância do herbicida. Isto ocorre porque esse resíduo apresenta forças repulsivas com o agrupamento carboxilato da molécula do imazaquin forçando-o a uma conformação diferente resultando no seu distanciamento e na aproximação do resíduo Arg377 com o herbicida afim de que seja estabelecida uma interação iônica entre eles por meio dos agrupamentos amino na extremidade do resíduo (MCCOURT et al., 2006).

#### 5.4 CÁLCULO DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO DA SUPERFÍCIE MOLECULAR DA ENZIMA AHAS

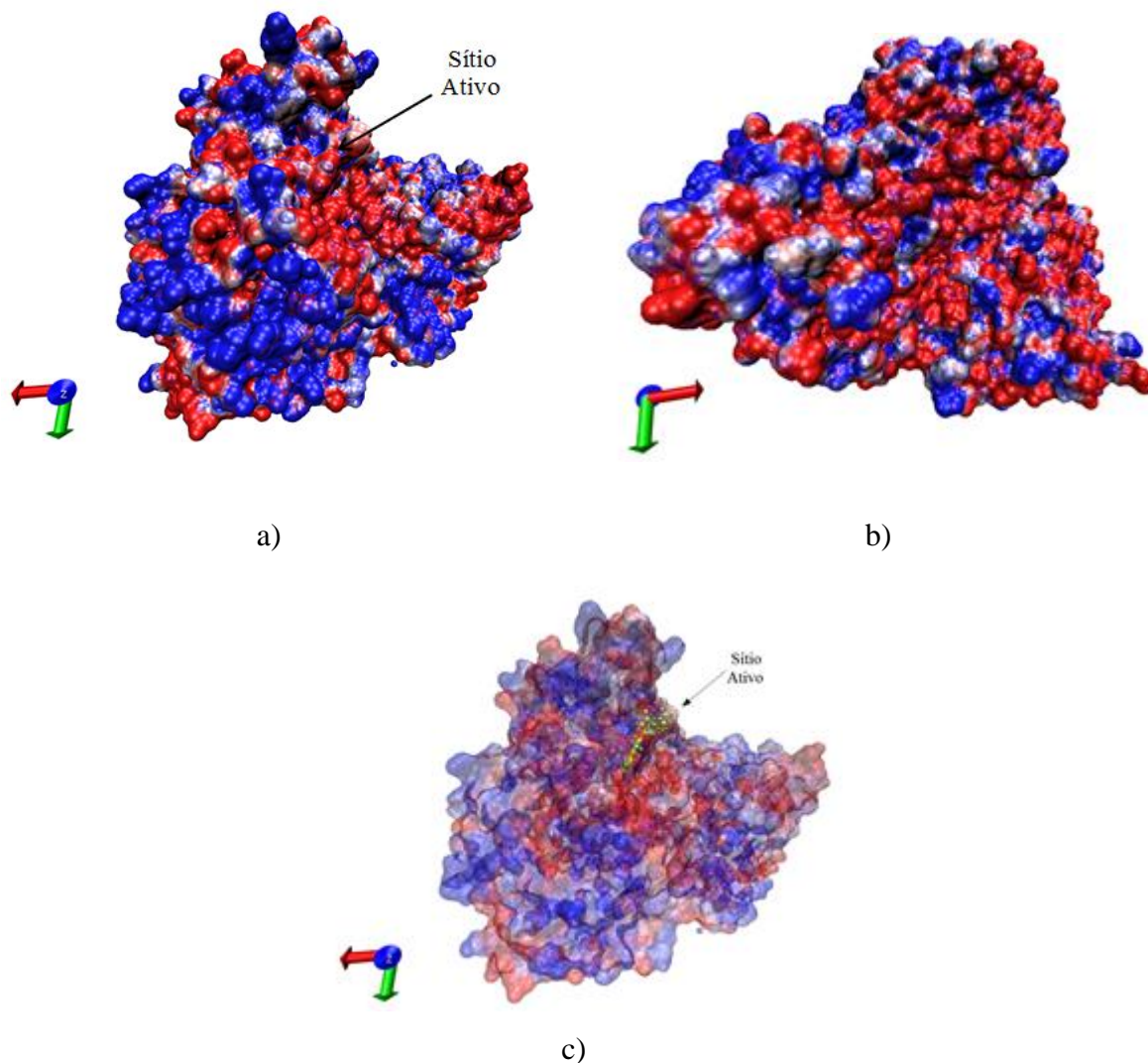
Após a caracterização estrutural e molecular do sistema de estudo, vislumbrando a descrição da detecção do herbicida pelo biossensor a primeira etapa é estabelecer a orientação da enzima a ser imobilizada na ponteira funcionalizada do AFM. As últimas pesquisas envolvendo a funcionalização dessas ponteiras utilizam ponteira de Silício (Si) ou Nitreto de Silício (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) que são facilmente oxidados quando expostos ao ar ou a água formando uma camada de óxido composta por grupos reativos (Si-OH). Em seguida, para a funcionalização

efetiva adiciona-se o reagente 3-aminopropiltietoxisilano (APTES) responsável por deixar grupos amino livres que reagem com o agrupamento aldeído do agente espaçante de superfície (AES), na maioria das vezes o glutaraldeído (BHUSHAN et al., 2005; SCHRÖDER et al., 2010). Em seguida, a enzima é imobilizada nessa superfície através de forças de interação eletrostáticas. A adsorção proteína-superfície é favorecida por essas interações eletrostáticas visto que ambas são carregadas.

Na compreensão das interações moleculares é de extrema relevância a obtenção do mapa do potencial eletrostático da enzima já que o mesmo possibilita a análise qualitativa da afinidade relativa entre a enzima e a superfície de imobilização. A partir dessa análise é possível sugerir as melhores regiões de interação do sítio ativo com o substrato e de ligação à superfície da ponteira funcionalizada.

Na Figura 34 está apresentada a representação de superfície da enzima AHAS, incluindo o potencial eletrostático da enzima em pH neutro. Das análises feitas visualmente com o VMD é possível identificar os três eixos de coordenada ( $x$ ,  $y$  e  $z$ ) como referências para a imobilização da enzima. No entanto, nos eixos  $x$  e  $y$  o sítio ativo estaria numa posição lateral à região de imobilização, deixando-o pouco disponível para interagir com o analito no momento da interação proteína-substrato.

Figura 34 – Mapa do potencial eletrostático plotado na superfície molecular da enzima AHAS apresentada de acordo com a visão frontal (a) e traseira (b) ao longo do eixo z, indicando o sítio ativo de interação do herbicida com a enzima (c). Os potenciais positivos (azul), negativos (vermelho) e neutros (branco) correspondem à faixa de  $-3,0K_B T/e$  e  $+3,0K_B T/e$ .



Fonte: Autor

Conforme mostrado na Figura 34, a posição da enzima ao longo do eixo z favorece a exposição da região em que a enzima deve interagir com o herbicida (sítio ativo desbloqueado) (a) e também apresenta uma região posterior (sentido negativo do eixo z) com uma área superficial mais predominantemente negativa (b) favorecendo a adsorção da enzima. Sendo assim, ao identificar o possível caminho para a retirada do herbicida imazaquin do sítio ativo da enzima AHAS é possível sugerir o modo mais adequado para a funcionalização da enzima de modo que os agrupamentos carregados positiva ou negativamente sejam inseridos na ponteira do cantiléver do nanobiossensor. Considera-se essa

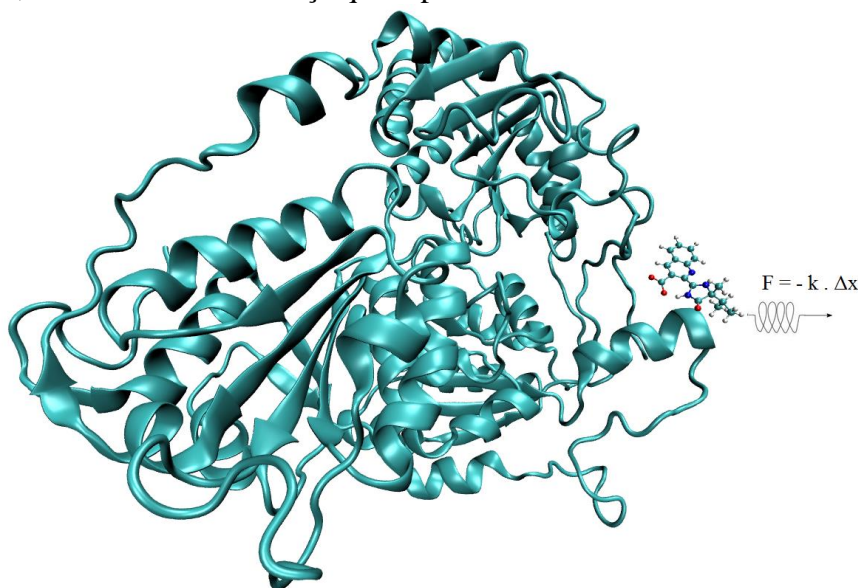
posição escolhida como coordenada inicial para as análises de dinâmica molecular direcional, para calcular a força elástica necessária para se retirar o herbicida inibidor de seu sítio ativo, de forma que se obtenha o tempo de resposta na formação do complexo AHAS-IQ e, consequentemente, calibrar os detectores para uma análise experimental mais precisa durante a utilização de um AFM.

## 5.5 DESCRIÇÃO ATOMÍSTICA E PREVISÕES MOLECULARES NO PROCESSO DE DETECÇÃO DO HERBICIDA PELO NANOBIOSENSOR

### 5.5.1 Dinâmica Molecular Direcional e cálculos QM/MM

Ao utilizar a metodologia de Dinâmica Molecular Direcional (SMD) obtêm-se modelos para explicar as forças medidas em termos das estruturas moleculares. Isso porque fornece detalhes do processo de desvinculação induzido por forças externas em sistemas biomoleculares que os ajuda a superar barreiras energéticas entre estados. Essas forças são aplicadas sob o complexo enzima-herbicida restringindo o ligante em um ponto do espaço por um potencial harmônico externo. Esse ponto é então deslocado na direção escolhida, sendo forçado a sair da sua posição inicial no sítio ativo da enzima possibilitando que explore novas interações ao longo do caminho de desvinculação. Neste trabalho, por razões expostas na seção 5.4, a direção em que essas forças foram aplicadas é o eixo z em seu sentido positivo conforme mostrado na Figura 35.

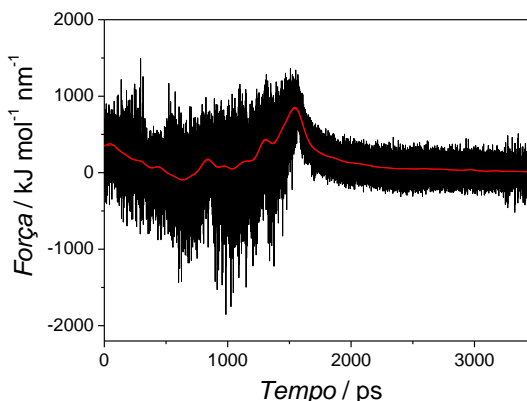
Figura 35 – Dinâmica Molecular Direcional no caminho sugerido para retirada do herbicida. Sendo  $\Delta x$  a distância entre o centro de massa da enzima e o do grupo carbonila do imazaquin, e  $k$  a constante de força que representa a mesma do cantilever.



Fonte: Autor

A análise criteriosa da trajetória da simulação, aliada à curva de força permitiu calcular a força média para a extração do imazaquin da enzima AHAS. A partir da análise do gráfico de força em função do tempo (Figura 36) observou-se, para o caminho ao longo do eixo  $z$ , dois momentos de força máxima, em 50 e 1600 ps. O primeiro, já nos nanossegundos iniciais de simulação, corresponde a uma força de aproximadamente  $380 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  (1391 pN), requerida para a ruptura das principais interações específicas estabelecidas entre o herbicida com os resíduos do sítio ativo da enzima. Já o segundo de  $855 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  (3130 pN) é responsável pelo rompimento definitivo de interações entre o herbicida e a região do sítio ativo.

Figura 36 – Perfil de força aplicado ao longo do eixo z durante a Dinâmica Molecular Direcional.



Fonte: Autor

Ensaio experimentais de detecção do herbicida imazaquim utilizando AFM com ponteira funcionalizada com a enzima ALS mostram que para análises realizadas com um cantiléver de constante  $K = 0,2 \text{ N m}^{-1}$  em três substratos diferentes a força média de detecção é de  $40 (\pm 4) \text{ nN}$  (DEDA et al., 2013). A força média calculada no intervalo de tempo de  $t_i = 0$  até  $t_f = 65 \text{ ps}$ , momento a partir do qual a molécula do herbicida imazaquin está fora do canal do sítio ativo é de  $0,39 (\pm 0,2) \text{ nN}$ . Considerando-se o desvio-padrão das análises pode-se afirmar que a força média calculada é um múltiplo da força experimental obtida e, portanto, os cálculos realizados validam o modelo proposto para o sistema AHAS-IQ a ser utilizado na construção otimizada do nanobiossensor.

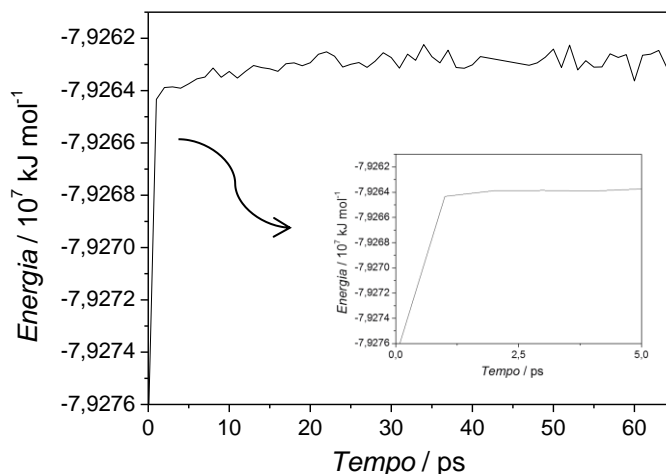
A determinação dos estados (ligado e não ligado) foi feita tomando como critério a distância herbicida-enzima, sendo que o estado não ligado compreende todas as distâncias maiores que  $1,4 \text{ nm}$ , ou seja, fora do raio das interações intermoleculares de longo alcance. Dessa forma, ao monitorar o distanciamento entre a molécula do herbicida e dos resíduos do sítio ativo ao longo da simulação observa-se que, anterior ao tempo correspondente à força máxima, ocorreram três variações mais significativas (0-65, 310-330, 455-465 e 495-505 ps). Para obter dados energéticos mais precisos foram realizados cálculos quânticos, por metodologia semi-empírica, para esses *frames* referentes às interações mais significativas no sistema.

A curva de energia total do sistema para os frames iniciais da simulação (Figura 37) sugere que sua estabilidade é fortemente dependente da interação enzima-herbicida, visto que a energia total do sistema aumenta exponencialmente com a retirada do herbicida do sítio



ativo da enzima. Dessa forma, é possível apontar para a especificidade da interação entre a AHAS e o herbicida inibidor, o que deve favorecer a sua detecção pelo nanobiossensor.

Figura 37 – Curva da energia total do sistema para os 65 ps iniciais de simulação.



Fonte: Autor

As médias das energias calculadas, em relação à energia inicial do sistema ( $\Delta E$ ), estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores médios de energia de interação imazaquin-AHAS obtidos por cálculos de QM/MM Sequencial.

Intervalo de Simulação / ps	Varição Média de Energia ( $\Delta E$ ) / $\text{kJ mol}^{-1}$
1-65	$14048,52 \pm 423,52$
310-330	$14115,82 \pm 337,09$
455-465	$14254,65 \pm 382,77$
495-505	$14040,60 \pm 369,63$
1550-1750	$14096,58 \pm 294,73$
3000-3250	$15329,36 \pm 1765,90$

Fonte: Autor.

Dessa forma, a energia associada à extração do imazaquin é a média da variação da energia no estado ligado que, pelo valor médio quase estável, compreende de zero a aproximadamente 1700 ps. Após este tempo, em particular nos ps finais da simulação, as flutuações nas medidas energéticas são maiores visto que ocorrem devido a interação do

herbicida com as moléculas de solvente. No entanto, para o cálculo da energia específica de ligação nota-se a definição dos estados anterior a 1700 ps, mostrando que, ainda que haja interações com a enzima depois desse tempo estas não tem influência significativa na energia total do sistema. Em outras palavras os eventos moleculares que ocorrem após 1700 ps, são suficientes para gerar alterações na força necessária para se retirar o herbicida, entretanto, não geram alterações entrópicas e entálpicas significativas nos sistemas. Dessa forma, considerando os valores absolutos de energia, as configurações com o herbicida fora do sítio ativo possui um valor de cerca de  $-7,926 \times 10^7 \text{ kJ mol}^{-1}$ , o que resulta em uma energia de interação de aproximadamente  $14000 \text{ kJ mol}^{-1}$  maior que a energia inicial do complexo enzima-herbicida. Estes resultados apresentados na Figura 37 e Tabela 15 sugerem que a energia de retirada do herbicida corresponde aos ps iniciais, que é de  $14048,52 \text{ kJ mol}^{-1}$  e consequentemente uma energia de ligação herbicida-enzima de  $-14048,52 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Após o estudo do sistema AHAS-IQ e da proposição teórica do nanobiossensor, os experimentos de Microscopia de Força Atômica com a ponta do cantiléver funcionalizada com a enzima serão realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurobiofísica da Universidade Federal de São Carlos coordenado pelo pesquisador e professor Dr. Fábio Lima Leite. O intuito é fornecer validação para o modelo computacional proposto nesse trabalho, vislumbrando uma possível aplicação dessa metodologia, na indústria e em laboratórios de controle de qualidade, para controle dos limites de herbicidas aplicados nas culturas.

## 6 CONCLUSÃO

Os parâmetros de campo de força para os cofatores da enzima AHAS: FAD e TPP foram obtidos, de forma sucedida, a partir da ferramenta online *SwissParam*. Esta metodologia foi adotada neste trabalho por ser rápida na obtenção de parâmetros de campo de força para moléculas orgânicas pequenas e mostrou-se eficiente na geração das topologias adequadas. Esses parâmetros foram adicionados ao campo de força CHARMM27 e validados por simulação de Dinâmica Molecular.

Um modelo molecular satisfatório foi obtido para o herbicida imazaquin, característico da classe das imidazolinonas, permitindo analisar informações estruturais (RMSD e RMSDist) e identificar os sítios de reatividade da molécula em solução aquosa indicando a eficácia da otimização geométrica realizada utilizando cálculos quânticos *ab initio* (UHF) e do ajuste de cargas pontuais realizado pela metodologia RESP.

As simulações por dinâmica molecular evidenciaram que a enzima AHAS, na presença dos seus cofatores, possui uma estrutura fechada - sítio ativo pouco acessível às moléculas de solvente - representativa da sua forma cataliticamente ativa, conforme sugeriam trabalhos prévios de cristalografia realizados com a enzima. Dados de RMSD, raio de giro e monitoramento dos ângulos diedrais dos resíduos de aminoácidos apontam para a estabilidade estrutural da mesma e, portanto, a manutenção da sua atividade catalítica após imobilização da mesma na ponteira do cantiléver do AFM ou mesmo durante a detecção do herbicida.

Os estudos da superfície de energia potencial da enzima AHAS apontaram para uma distribuição uniforme de cargas positivas na região próxima ao sítio ativo, onde se encontra o herbicida, e negativa na região oposta possibilitando a indicação de um possível caminho para a retirada do herbicida com menor impedimento estérico e energético: o eixo z em seu sentido positivo. A emulação dos experimentos do AFM através de simulação de dinâmica direcional ao longo desse eixo foi realizada no caminho de retirada sugerido, obtendo-se forças de interação da ordem de 1391 pN. Cálculos quânticos para os frames mais representativos do processo de extração do herbicida do sítio ativo foram realizados permitindo calcular parâmetros energéticos do sistema e apontaram para uma interação consideravelmente específica entre a enzima AHAS e o herbicida inibidor, imazaquin, e consequentemente uma energia de interação de  $-14048,52 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dessa forma, a validação do modelo computado através dos experimentos de AFM deverão levar em conta os cálculos realizados para o caminho de retirada simulado.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o papel do cofator FAD na atividade catalítica da enzima;
- Realização de cálculos quânticos para todos os frames da Dinâmica Molecular Direcional;
- Estudo de outros possíveis caminhos de retirada do herbicida para se calcular o Potencial de Força Média (PMF), que utiliza a igualdade de Jarzynski para estabelecer uma conexão entre o cálculo do trabalho e energia realizado no processo fora do equilíbrio (simulação SMD) com um processo em quase equilíbrio, como o experimento de detecção pelo biossensor de ponteira de AFM;
- Estudo mais aprimorado da estrutura da enzima AHAS para sua imobilização da ponteira do AFM utilizando o Modelo Rígido proposto por Amarante et al. (2014) e sugestão das condições ótimas de funcionamento do nanobiossensor;
- Parametrização de outros herbicidas inibidores da enzima AHAS e avaliação dos sistemas enzima-herbicida;
- Construção e utilização do modelo experimental do nanobiossensor proposto.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. Independence: Garland Science, 2002.
- ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: A quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science**, v. 58, n. 3 PART 1, p. 380–388, 2002.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Computer Simulation of Liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 38, p. 267, 1988.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation in Chemical Physics**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993.
- AMARANTE, A. M. et al. Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 53, p. 100–104, 2014.
- AMINE, A. et al. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors & bioelectronics**, v. 76, p. 180–194, 2015.
- ARORA, N. Recent Advances in Biosensors Technology: A Review. **Octa Journal of Biosciences**, v. 1, p. 147 – 150, 2013.
- ATKINS, P.; PAULA, J. DE. **Físico-Química - Volume 2**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.
- BAEUMNER, A. J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 434–445, 2003.
- BALTAZAR, C. S. A. **Estudo da difusão do hidrogênio molecular numa hidrogenase [NIFESE] por métodos de dinâmica molecular**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- BĂNICĂ, F.-G. **Chemical Sensors and Biosensors**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 608 p.

BAYLY, C. I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges-the RESP model. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, 1993.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648, 1993.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987.

BERNSTEIN, F. C. et al. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 185, n. 2, p. 584–591, 1978.

BEVERIDGE, T. J.; KOVAL, S. F. Binding of metals to cell envelopes of Escherichia coli K-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 325–335, 1981.

BHUSHAN, B. et al. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon based surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 3, p. 327–341, 2005.

BINNIG, G.; QUATE, C.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986.

BOWEN, W. R.; HILAL, N. Future Prospects. In: **Atomic Force Microscopy in Process Engineering**. 1. ed. Oxford: Elsevier Inc., 2009. p. 275–279.

CALIL, S.S.; SILVA, P.R.Q. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. 2011. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/15563761-Biossensores-estrutura-funcionamento-e-aplicabilidade.html>>. Acesso em: 3 dez 2014.

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. Lages: [S.n.], 2013. Disponível em: <<http://leonardobcarvalho.files.wordpress.com/2013/02/livroherbicidas.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2016.

CHAPLIN, M. **Water structure and science**, 2000. Disponível em: <[http://www1.lsbu.ac.uk/water/water\\_models.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_models.html)>. Acesso em: 17 jun. 2016.

CHANG, A. K.; DUGGLEBY, R. G. Herbicide-resistant forms of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. **Biochemical Journal**, v. 333, p. 765–777, 1998.

CHANG, Y. Y.; CRONAN, J. E. Common ancestry of Escherichia coli pyruvate oxidase and the acetohydroxy acid synthases of the branched-chain amino acid biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 3937–3945, 1988.

CHICHESTER, B. L. **Procedures in Scanning Probe Microscopies**, England: John Wiley & Sons Inc., 1998.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1., Dourados, 1997. **Palestras...** Dourados: EMBRAPA, 1997. p.75-94

COLOSIO, C.; MORETTO, A. **International Encyclopedia of Public Health**. 1. ed. Orlando: Academic Press, 2008.

CONGLETON, W. F.; VANCANFORT, A. M.; LIGNOWSKI, E. M. Imazaquin (Scepter®): a new soybean herbicide. **Weed Technology**, v.2, p.186-188, 1987.

CORNELL, W. D. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, 1995.

COULET, P. R.; BLUM, L. J. Biosensor principles and applications. **Bioprocess Technology**, v. 15, p. 1–344, 1991.

CUNHA, R. A. **Caracterização molecular do mecanismo de interação de quitosana com bicamadas lipídicas compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina**. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

CUSTODIO, R.; MORGON, N. H. The Density-Functional Theory. **Química Nova**, v. 18, p. 44–55, 1995.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41–69, 2003.

DA SILVA, A. C. N. et al. Nanobiosensors based on chemically modified AFM probes: A useful tool for metsulfuron-methyl detection. **Sensors (Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 1477–1489, 2013.

DA SILVA, A. C. N. et al. Nanobiosensors Exploiting Specific Interactions Between an Enzyme and Herbicides in Atomic Force Spectroscopy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. November 2015, p. 6678–6684, 2014.

DAPPRICH, S. et al. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 461-462, p. 1–21, 1999.

DAVIS, M. E.; MCCAMMON, J. A. Calculating Electrostatic Forces from Grid-Calculated Potentials. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 401–409, 1990.

DE OLIVEIRA, M. F. et al. Sorção do herbicida imazaquin em Latossolo sob plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 787–793, 2004.

DEDA, D. K. et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683–687, 2013.

DEWAR, M. J. S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902–3909, 1985.

DING, J. et al. Assembly of carbon nanotubes on a nanoporous gold electrode for acetylcholinesterase biosensor design. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 199, p. 284–290, 2014.

DONG, X. et al. Development of multi-residue analysis of herbicides in cereal grain by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 192, p. 432–440, 2016.



DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, n. 1-2, p. 149–156, 2008.

DUGGLEBY, R. G.; MCCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 309–324, 2008.

DUGGLEBY, R. G.; PANG, S. S. Acetohydroxyacid Synthase. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 1–36, 2000.

DUPRADEAU, F. Y. et al. R.E.DD.B.: A database for RESP and ESP atomic charges, and force field libraries. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. SUPPL. 1, 2008.

EDWARDS, D. **Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED)**. US EPA, 2005.

ESPINOZA, M. A. et al. Detection of glycoalkaloids using disposable biosensors based on genetically modified enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 457, p. 85–90, 2014.

EWALD, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. **Annals of Physics**, v. 64, p. 253–287, 1921.

FENOLL, J. et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying phenylurea herbicides and their main metabolites in amended and unamended soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1257, p. 81–88, 2012.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137–142, 2006.

FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28–39, 1992.

FLORIDO, F. G. et al. The absorption and translocation of imazaquin in green manures. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 3, p. 291, 2014.

FRANCA, E. F. **Caracterização molecular de biopolímeros em solução utilizado simulação computacional**. 2009. 181f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

FRANCA, E. F. et al. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 19, p. 8894–8899, 2011.

GHOBADI, M.; YAMINI, Y.; EBRAHIMPOUR, B. Extraction and determination of sulfonylurea herbicides in water and soil samples by using ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and analysis by high-performance liquid chromatography. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 68–73, 2015.

GOLLOP, N. et al. Physiological implications of the substrate specificities of acetohydroxy acid synthases from varied organisms. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3444–3449, 1990.

GOODLAND, R. Environmental sustainability in agriculture: Diet matters. **Ecological Economics**, v. 23, n. 3, p. 189–200, 1997.

GOSCINNY, S. et al. Determination of glyphosate and its metabolite AMP (aminomethylphosphonic Acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1177–1185, 2012.

GRACE DEVELOPMENT TEAM. Grace: developer's corner. Portland, 2008. Disponível em: <<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/devel/>>. Acesso em: 18 Abr. 2016.

GUADAGNINI, P. H.; BRUNS, R. E.; SOUZA, A. A. Cargas atômicas em moléculas. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 148–155, 1996.

GUILBAULT, G; KRAMER, D; CANNON, P. Electrochemical Determination of Organophosphorous compounds. **Analytical Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 1437–1439, 1962.

GUTOWSKI, J. A.; LIENHARD, G. E. Transition State Analogs for Thiamin Pyrophosphate-dependent Enzymes\*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 9, p. 2663–2666, 1976.

HANSON, R. M. et al. JSmol and the next-generation web-based representation of 3D molecular structure as applied to proteopedia. **Israel Journal of Chemistry**, v. 53, n. 3-4, p. 207–216, 2013.

HATTORI, J. et al. Multiple resistance to sulfonylureas and imidazolinones conferred by an acetohydroxyacid synthase gene with separate mutations for selective resistance. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 232, n. 2, p. 167–173, 1992.

HAUGHN, G. W.; SOMERVILLE, C. R. A Mutation Causing Imidazolinone Resistance Maps to the Csr1 Locus of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1081–5, 1990.

HAWKINS, C. F.; BORGES, A.; PERHAM, R. N. A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. **FEBS Letters**, v. 255, n. 1, p. 77–82, 1989.

HEHRE, W. J. **A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations**. Irvine: WaveFunction, 2003.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HESS, F. G. et al. Imidazolinones. In: **Handbook of Pesticide Toxicology**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 2001. v. 2, p. 1641–1651.

HINCHLIFFE, A. **Molecular Modeling for Beginners**. Chichester: John Wiley & Sons Ltda., 2003.

HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications - Potential calculation from given source distribution, including direct and iterative methods, error analysis. **Journal of Computational Physics**, v. 9, p. 136–211, 1970.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. The Inhomogeneous Electron Gas. **Phys. Rev.**, v. 136, n. 3B, p. B864, 1964.

HOLLAUER, E. **Química Quântica**. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HOLST, M.; BAKER, N.; WANG, F. Adaptive multilevel finite element solution of the Poisson-Boltzmann equation I. Algorithms and examples. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1319–1342, 2000.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

IERICH, J. C. M. et al. A Computational Protein Structure Refinement of the Yeast Acetohydroxyacid Synthase. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 8, p. 1702–1709, 2015.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 177–182, 2005.

IZRAILEV, S. et al. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. **Biophysical journal**, v. 72, n. 4, p. 1568–81, 1997.

JHA, Z. et al. Nanotechnology: Prospects of Agricultural Advancement. **Nano Vision**, v. 1, n. 2, p. 88–100, 2011.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926, 1983.

KAH, M.; BROWN, C. D. Adsorption of ionisable pesticides in soils. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 188, p. 149–217, 2006.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, 1965.

KRAEMER, A. F. et al. Environmental Fate of Imidazolinone Herbicides - A Review. **Planta Daninha**, v. 27, p. 629–639, 2009.

KUMAZAWA, T. et al. Capillary gas chromatography with four different detectors for dinitroaniline herbicides in human body fluids. **Journal of analytical toxicology**, v. 19, n. 2, p. 95–98, 1995.

LASCHUK, E.F. **Novo Formalismo Semi Empírico para Cálculos Quânticos**. 2005. 143f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 2001.

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, n. 2, p. 785–789, 1988.

LEE, T. M.-H. Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5535–5559, 2008.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 4. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 1991.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 5. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 2000.

LI, X. et al. Molecularly imprinted solid phase extraction in a syringe filter for determination of triazine herbicides in Radix Paeoniae Alba by ultra-fast liquid chromatography. **Talanta**, v. 148, p. 539–547, 2016.

LIMA, T. **Algoritmos Evolutivos para predição de Estruturas de proteínas**. 2006. 124 f. Dissertação (mestrado em Ciência da Computação e Matemática Computacional) – Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2006.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306–317, 2001.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia: Fundamentos**. Rio de Janeiro: Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2009. 110 p.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and Dynamics of the TIP3P , SPC , and SPC / E Water Models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001.

MARQUES, C. V. V. C. O.; MARQUES, P. R. B. D. O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 16, p. 81-92, 2006.

MAZUR, B. J.; FALCO, S. C. The Development of Herbicide Resistant Crops. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 441–470, 1989.

MCCOURT, J. A. et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 569–573, 2006.

MCCOURT, J. A.; DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. **Amino Acids**, v. 31, n. 2, p. 173–210, 2006.

MONACO, T.J.; WELLER, S.C.; ASHTON, F.M. **Weed Science: Principles and Practices**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2002, 688 p.

MORAES, A. et al. Evidências De Detecção Do Herbicida Atrazina Por Espectroscopia De Força Atômica: Uma Ferramenta Promissora Para Sensoriamento Ambiental. **Acta Microscopica**, v. 24, n. 1, p. 53–63, 2015.

MORGON, N.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.

MOUSAVI, S.; REZAEI, M. Nanotechnology in agriculture and food production. **Journal of Applied Environmental Biological Sciences**, v. 1, n. 10, p. 414–419, 2011.

MÜLLER, D. J. et al. Immuno-atomic force microscopy of purple membrane. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 4, p. 1796–802, 1996.

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

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NERIA, E.; FISCHER, S.; KARPLUS, M. Simulation of activation free energies in molecular systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 105, n. 5, p. 1902–1921, 1996.

NGUYEN, T. T.; VIET, M. H.; LI, M. S. Effects of water models on binding affinity: Evidence from all-atom simulation of binding of tamiflu to A/H5N1 neuraminidase. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

NICHOLLS, A.; HONIG, B. A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 435–445, 1991.

NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J. L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 1, p. 107–115, 2004.

OHNESORGE, F.; BINNIG, G. True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. June, p. 1451–1456, 1993.

OLIVEIRA, G. C. et al. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, v. 98, p. 130–136, 2012.

OLIVEIRA, G. S. **Análise da interação molecular proteína-herbicida através de simulação computacional: aplicação no desenvolvimento de nanobiossensores**. 2013. 127f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

OLIVEIRA, G. S. et al. Molecular modeling of enzyme attachment on AFM probes. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 45, p. 128–136, 2013.

PANG, S. S.; DUGGLEBY, R. G.; GUDDAT, L. W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 2, p. 249–262, 2002.

PANG, S. S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7639–7644, 2003.

PASCUTTI, P. G. **Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular** v. 1, p. 1-38, 2002.

PERES, FREDERICO; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro , Brasil. **Saúde, Ambiente e Agrotóxicos**, n. 23, p. 612–621, 2007.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17–31, 2012.

QIAN, N. On the momentum term in gradient descent learning algorithms. **Neural Networks**, v. 12, n. 1, p. 145–151, 1999.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.

RAPPÉ, A. K.; CASEWIT, C. J. **Molecular Mechanics Across Chemistry**. Sausalito: University Science Books, 1997.

REGITANO, J. B.; ALLEONI, L. R. F.; TORNISIELO, V. L. Atributos de solos tropicais e a sorção de imazaquin. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 4, p. 801–807, 2001.

ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101–1111, 2006.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 7, 2001.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELO, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 1025–1041, 2006.

ROSSETTI, H. L. **Utilização de métodos de modelagem molecular para caracterização do sistema (nBuCp)<sub>2</sub>Zr(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> imobilizado em sílica e ativado com MAO**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado Profissional em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SALGADO, A. M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol, e de substrato por modelo**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SCHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2010. v. 21

SCHRÖDER, T. et al. Single-molecule force spectroscopy of supramolecular heterodimeric capsules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 10981–10987, 2010.

SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, v. 76, n. 2, p. 545–546, 1984.



SIGRIST, H.; GAO, H. Biosensors@CSEM. **Chimia**, v. 53, p. 81-86, 1999.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**, vol. 1. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2005. 766 p.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209–220, 1989.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173–1213, 2007.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods IV: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, p. 1–32, 2012.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013.

STÖRMER, F. C. The pH 6 Acetolactate-forming Enzyme from *Aerobacter aerogenes* II. Evidence that it is not a flavoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 13, p. 3740–3741, 1968.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C. Herbicide - Gas Chromatography. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Madrid, Spain: INIA, 2013.

TERRY, L. A.; WHITE, S. F.; TIGWELL, L. J. The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1309–1316, 2005.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121–131, 2001.

TITTMANN, K. et al. Electron transfer in acetohydroxy acid synthase as a side reaction of catalysis. Implications for the reactivity and partitioning of the carbanion/enamine form of (alpha-hydroxyethyl)thiamin diphosphate in a "nonredox" flavoenzyme. **Biochemistry**, v. 43, n. 27, p. 8652–8661, 2004.

TORSHIN, I. Y.; WEBER, I. T.; HARRISON, R. W. Geometric criteria of hydrogen bonds in proteins and identification of “bifurcated” hydrogen bonds. **Protein Engineering**, v. 15, n. 5, p. 359–363, 2002.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, n. 6, p. 700–712, 2002.

VALIEV, M. et al. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. **Computer Physics Communications**, v. 181, n. 9, p. 1477–1489, 2010.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VAN GUNSTEREN, W. et al. Molecular dynamics simulation of biomolecular systems. **Chimia**, v. 55, n. 10, p. 856–860, 2001.

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. Investigation of protein unfolding and stability by computer simulation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 348, n. 1323, p. 49–59, 1995.

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 25, p. 4064–4092, 2006.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. **Molecular Physics**, v. 34, n. June 2014, p. 1311–1327, 1977.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992–1023, 1990.

VERLET, L. Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.

VERLI, H. et al. **Bioinformática : da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2014.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica – A vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264 p.

WEEKS, B. L. Scanning: Probe microscopy. **Scanning**, v. 30, n. 2, p. 58, 2008.

YU, D. et al. Biosensors in Drug Discovery and Drug Analysis. **Analytical Letters**, v. 38, n. 11, p. 1687–1701, 2005.

ZOETE, V. et al. SwissParam : A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359–68, 2011.