



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SERTÃO  
PERNAMBUCANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO**

Projeto de Pesquisa

**ANÁLISE IN SILICO DE SISTEMAS BACTERIANOS PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE AZOCORANTES**

Thamirys Alves Pereira  
(Bolsista)

Renato César da Silva  
(Orientador)

Recife - PE  
2018

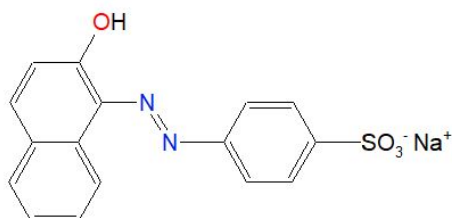
## Título

Análise *in silico* de sistemas bacterianos para biodegradação de azocorantes

## Introdução

### Azocorantes

Compostos-azo introduzem os principais corantes sintéticos de interesse da indústria têxtil, de alimentos, cosméticos e impressão digital. Referem-se a substâncias químicas que carregam o grupo funcional  $R-N=N-R'$ , em que R e R' podem ser grupos arila ou alquila (Fig. 1). Devido ao deslocamento de elétrons, os derivados mais estáveis podem conter duas ou mais arilas em sua estrutura, resultando em ampla gama de cores, facilidade de síntese, estabilidade em várias faixas de pH, altas temperaturas e condições de luz [1]. No entanto, esses compostos possuem alta toxicidade (genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade), o que afeta os recursos hídricos, fertilidade do solo, organismos aquáticos, seres humanos e a integridade do ecossistema quando descartados de forma incorreta pelas indústrias. Corantes à base de benzidina, por exemplo, são reconhecidos como cancerígenos à bexiga urinária humana [2].



**Figura 1.** Estrutura do azocorante laranja II

É possível remover corantes azóicos a partir da degradação biológica por microorganismos que possuem a capacidade de descolorir, transformar ou mineralizar completamente esses compostos de efluentes, auxiliando no tratamento de águas residuais ou prevenindo a poluição de recursos hídricos. Dentre as vantagens na utilização de sistemas bacterianos para degradação destacam-se a alternativa estritamente ecológica, facilidade de síntese e manutenção, uso de baixo teor de iodo no processo e maior eficiência para uma ampla gama de corantes dessa classe [3]. Para a identificação de estirpes funcionais de interesse no campo da biodegradação, cientistas estão investindo primeiramente em métodos *in silico* antes de realizar tratamentos *in situ* ou *ex situ*. Esse tipo de triagem preliminar auxilia na redução dos altos custos envolvidos em técnicas experimentais, além de promover um melhor direcionamento na seleção de microorganismos viáveis ao tratamento de efluentes têxteis [4]. O docking molecular é uma técnica computacional eficaz para descrever e compreender a interação de complexos (proteína-ligante). Enzimas mutantes de azorredutase (AzrC) com afinidade de interação melhorada para azocorantes foram criadas por docking e validadas experimentalmente [5].

Recentemente, as estruturas cristalográficas dos complexos de azorredutase (AzrA e AzrC) foram determinadas experimentalmente [6]. Essas enzimas com vários sítios ativos são indispensáveis para entender sua especificidade com substratos e mecanismo catalítico. Neste trabalho serão utilizadas abordagens *in silico* para identificação de azocorantes propícios à biodegradação por azoredutases e tentativas de propor possíveis mecanismos catalíticos relacionados aos inibidores mais favoráveis.

## Objetivos

Geral:

- Analisar sistemas bacterianos que possuem a capacidade de degradar azocorantes em meio aquático por meio de técnicas *in silico*.

#### Específicos:

- Prever energias de interação para possíveis inibidores com azoredutases utilizando docking molecular;
- Calcular propriedades químico-quânticas de azocorantes;
- Propor possíveis mecanismos catalíticos para azocorantes com melhor afinidade de interação..

#### Metas

Analisar sistemas bacterianos que possuem a capacidade de degradar azocorantes em meio aquático por meio de técnicas *in silico*.

Apresentar os resultados obtidos em congressos ou outros eventos.

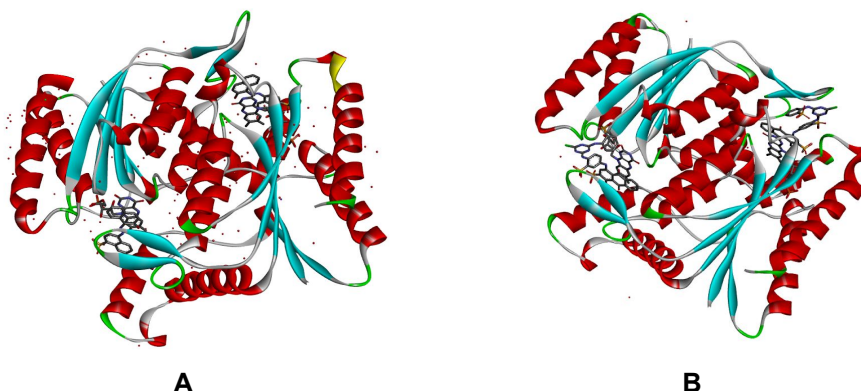
Publicar resumos ou artigos científicos.

#### Revisão de literatura

##### Azoredutases

As azoredutases são um grupo de enzimas pertencente às flavoenzimas, *i.e.*, proteínas que contêm como cofactor enzimático o dinucleótido de flavina e adenina (FAD) ou o mononucleótido de flavina (FMN). Apesar de serem identificadas em bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas, leveduras e mamíferos, seu papel fisiológico ainda permanece incerto devido a capacidade de reduzir uma ampla gama de substratos, tais como azo-compostos, quinonas e nitrofuranos. Por conta de sua versatilidade em interagir com vários compostos, as azoredutases têm sido objeto de estudo para técnicas de biorremediação, especialmente na remoção de corantes sintéticos (azocorantes) que contaminam recursos hídricos. Geralmente, o passo inicial para a biodegradação de azocorantes é a conversão para a amina através de clivagem catalisada pela azoredutase [6].

É possível compreender o reconhecimento de substratos e mecanismo catalítico das azoredutases conhecendo detalhadamente suas estruturas complexadas com ligantes. Infelizmente, até a data, não há informação de estruturas cristalinas para complexos de azoredutases com vários substratos. Recentemente, AzrA e AzrC, azoredutases complexadas com o inibidor Cibacron Blue (CB) de NAD(P)H e azocorantes modificados com Acid Red 88 (AR88) e Orange I (OI) tiveram suas estruturas cristalográficas determinadas para uma resolução de 2,2 Å (Fig. 2) [6].



**Figura 2.** Unidades biológicas das azoredutases: A = AzrA (PDB ID: 3W7A); B = AzrC (PDB ID: 3W78)

Os resultados experimentais mostraram que o CB interage no topo do FMN, sugerindo uma ligação semelhante ao NAD(P)H. As estruturas dos complexos AzrC-AR88 e AzrC-OI elucidaram duas formas de ligação para substratos que possuem um grupo hidroxila na posição orto ou para da azo ligação, respectivamente, enquanto AR88 e OI foram estimados para ter uma afinidade de ligação semelhante ao AzrC [6]. Essas duas estruturas podem auxiliar na descoberta de novos substratos azocorantes por meio de técnicas computacionais acuradas como docking e dinâmica molecular, reduzindo custos envolvidos em métodos experimentais.

### Cálculos semi-empíricos de química quântica

Os métodos semi-empíricos de química quântica utilizam várias aproximações para resolver, de forma autoconsciente, aproximações às equações de Hartree-Fock, ajustando parâmetros obtidos a partir de dados experimentais para a resolução da equação de Schrödinger (1). Por conta disso, dependem de pouco recurso computacional para a obtenção de estrutura eletrônica. São empregados, geralmente, para moléculas com poucos átomos e conseguem fornecer propriedades químico-quânticas com alta precisão para estruturas resolvidas experimentalmente.

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

Entre as propriedades que podem ser calculadas com esse método, destacam-se: estrutura química, que relaciona a posição esperada dos átomos constituintes; energias de interação; momento de dipolo elétrico; distribuição eletrônica de carga; frequências vibracionais; radioatividade e outras quantidades espectroscópicas. O tempo estimado de cálculo e recursos computacionais (e.g., memória e espaço em disco) depende estritamente do sistema estudado que, por sua vez, pode ser uma única molécula, um grupo de moléculas ou um sólido. Para cada tipo de sistema existem métodos apropriados e acurados que reproduzem os resultados estudados pelo pesquisador. Para esse trabalho, cálculos semi-empíricos podem ser utilizados para otimização de geometrias e obtenção das propriedades químico-quânticas dos azocorantes, tornando as estruturas favoráveis para as etapas de docking e dinâmica molecular. Para uma parametrização bem sucedida, um grande conjunto de dados experimentais e teóricos é necessário para validação dos métodos utilizados [7].

### Dinâmica e Docking Molecular

Para sistemas moleculares muito grandes, como os de biomoléculas, utiliza-se parâmetros de campo de força a partir de simulações clássicas para a energia do composto utilizando as equações clássicas de Newton. Entretanto, as constantes que aparecem na equação são obtidas por meio de dados experimentais ou de cálculos *ab initio*. Esse tipo de método é conhecido como Dinâmica Molecular (MD, do inglês *Molecular Dynamics*). É uma das principais ferramentas computacionais para o estudo de sistemas atômicos-moleculares, para os quais os efeitos de temperatura não podem ser desconsiderados, tornando o sistema intrinsecamente termodinâmico. Etapas de minimização da energia potencial do sistema de interesse são necessárias antes de simulações MD a fim de eliminar maus contatos entre os átomos [8].

O Docking Molecular é responsável por prever a conformação de uma molécula ligante (inibidor) acoplada ao sítio de ligação (sítio ativo) apropriado de um alvo molecular (e.g., receptores protéicos, enzimas, ácidos nucleicos e canais iônicos) relacionados a uma doença ou processo fisiopatológico. Além disso, o docking fornece a quantificação da afinidade de interação receptor-ligante, descrevendo uma infinidade de interações intermoleculares de interesse para a interpretação de mecanismos de ação relacionados ao sistema estudado. Geralmente, é possível obter resultados próximos à conformação nativa de complexos de proteínas através de docking e dinâmica molecular combinados ao considerar o solvente (água) [9].

## Materiais e métodos

### Metodologia computacional

1. À priori, será realizada uma busca no Pubchem por estruturas de azocorantes sintéticos.
2. Os métodos semiempíricos AM1, RM1, PM6-DH+ ou PM7 implementados nos softwares Hyperchem e MOPAC/2016 serão utilizados para a otimização de geometria dessas estruturas e obtenção das seguintes propriedades químico-quânticas: energia total ( $E_T$ ); energia do LUMO ( $E_L$ ), orbital molecular não ocupado de menor energia; energia do HOMO ( $E_H$ ), orbital molecular ocupado de maior energia; gap de energia ( $\Delta E_{L-H}$ ); dureza ( $\eta$ ); maciez ( $S$ ); energia eletrônica ( $E_{el}$ ); potencial de ionização (PI); afinidade eletrônica (AE); área molecular (A); volume molecular (V).
3. Propriedades dependentes serão obtidas de acordo com as seguintes equações:  $\Delta E_{L-H} = E_L - E_H$ ;  $AE = -E_L$ ;  $\eta = (PI - AE)/2$ ;  $S = 1/\eta$ .
4. Todos os dados das propriedades obtidas serão organizados em uma tabela, onde uma Análise de Componentes Principais (ACP) deverá ser realizada para o agrupamento das moléculas em um gráfico de três variáveis.
5. Estruturas complexadas da enzimas AzrA e AzrC serão obtidas do NCBI.
6. Utilizando o softwares Chimera ou Discovery Studio, os ligandos devem ser removidos da proteína, e sua forma monomérica deve ser considerada.
7. No servidor H++ os resíduos ionizáveis das enzimas serão corrigidos de acordo com os seguintes valores de pH: 7.0, 5.0 e 3.0.
8. Para o docking molecular serão utilizados o servidor online SwissDock e o software Autodock Vina. Todas as moléculas selecionadas na etapa 1 devem ser ancoradas nas proteínas com pH alterados. Observar a diferença de energia livre de Gibbs e conformações no docking, comparando com as estruturas experimentais.
9. Os complexos mais estáveis serão submetidos a uma simulação de dinâmica molecular de solvente explícito no servidor web WAXSiS, onde serão previstas as curvas de dispersão de raios-X de pequeno e grande ângulo (SWASX). Anteriormente, a energia do sistema enzima-inibidor deverá ter sua energia minimizada.
10. Discutir os resultados considerando as propriedades químico-quânticas obtidas na etapa 2, propondo possíveis mecanismos de redução dos azocorantes em função dos microorganismos biológicos para as melhores afinidades de ligação obtidas por docking e dinâmica molecular combinados.

### Leituras necessárias

A pesquisadora deverá que realizar levantamento bibliográfico sobre algumas técnicas computacionais, como:

- Modelagem molecular;
- Metodologias de docking e dinâmica molecular
- Cálculos computacionais semi-empíricos;
- Mecânica quântica;
- Mecânica clássica.

### Softwares que podem ser utilizados

Todas as simulações podem ser realizadas por Laptop ou Desktop, utilizando as seguintes opções de softwares:

- **Desenho das estruturas e visualização:** Discovery Studio, Chimera, Avogadro (livre), ChemsSketch IQmol (livre), Gaussian (licença), Hyperchem (licença).

- **Mecânica quântica (cálculos semiempíricos):** MOPAC/2016 (livre), Gaussian, Orca (licença), NWChem (livre).
- **Dinâmica molecular:** NAMD (livre), GROMACS (livre).
- **Docking molecular:** Servidor online WAXSiS.
- **pH:** Servidor H++.

*Opcionalmente, é possível submeter cálculos que exigem maior recurso computacional em Centros Nacionais de Alto Processamento (CENAPAD)*

## Resultados esperados

Com os resultados obtidos, pretende-se interpretar propriedades e mecanismos relacionados à capacidade de sistemas bacterianos em degradar azocorantes. Além disso, contribuir para a formação acadêmica e profissional de um discente do curso superior de Licenciatura em Química, impulsionando a pesquisa científica do IF-Sertão, campus Ouricuri, divulgando o campo da química teórica computacional para o estudo aprofundado de sistemas químicos e simulação de ambientes realistas por abordagens *in silico*.

## Produtos

Elaboração de trabalhos científicos (artigos e resumos) com o intuito de impulsionar a pesquisa científica no campus Ouricuri; Apresentação do trabalho em seminários, congressos ou eventos de outra natureza.

## Referências bibliográficas

- [1] Ogola HJO, Ashida H, Ishikawa T, Sawa Y (2015). Explorations and applications of enzyme-linked bioremediation of synthetic dyes, Shiomi N (Ed.), Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil, InTech, Rijeka.
- [2] Puvaneswari N, Muthukrishnan J, Gunasekaran P (2006). Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. Ind J Exp Biol 44:618-626.
- [3] Dubrow SF, Boardman GD, Michelsen DL (1996). Chemical pretreatment and aerobic-anaerobic degradation of textile dye wastewater. Reife A, Freeman HS (Eds.), Environmental Chemistry of Dyes and Pigments, Wiley, New York, pp. 75-102.
- [4] Khan F, Sajid M, Cameotra SS (2013). *In-silico* approach for the bioremediation of toxic pollutants. J Pet Environ Biotechnol 4:161.
- [5] Dehghanian F, Kay M, Kahrizi D (2015). A novel recombinant AzrC protein proposed by molecular docking and in silico analyses to improve azo dye's binding affinity. Gene 569:233-238.
- [6] Yu J, Ogata D, Gai Z, Taguchi S, Tanaka I, Ooi T, Yao M (2014). Structures of AzrA and AzrC complexed with substrate or inhibitor: insight into substrate specificity and catalytic mechanism. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 70:553-564.

[7] Simas AF, Rocha GB (2007). Métodos semi-empíricos de estrutura eletrônica em química quântica. Morgon NH & Coutinho K (Eds.), Métodos de química teórica e modelagem molecular, Editora Livraria da Física, São Paulo.

[8] Martínéz L, Borin IA, Skaf MS (2007). Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. Morgon NH & Coutinho K (Eds.), Métodos de química teórica e modelagem molecular, Editora Livraria da Física, São Paulo.

[9] Magalhães CS, Barbosa HJC, Dardenne LE (2007). Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. Morgon NH & Coutinho K (Eds.), Métodos de química teórica e modelagem molecular, Editora Livraria da Física, São Paulo.

Cronograma de execução												
Atividades	Ano/Mês											
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
1. Levantamento bibliográfico	X	X	X									
2. Modelagem e busca por estruturas de azocorantes sintéticos				X								
3. Cálculos computacionais de mecânica quântica semi-empíricos					X							
4. Obtenção das estruturas de azoredutases e ajuste de pH dos grupos ionizáveis.						X	X					
5. Docking molecular								X	X	X	X	
6. Reunião para acompanhamento das atividades		X		X		X		X		X		X
7. Simulações de Dinâmica Molecular e interpretação de curvas SWASX.							X	X	X	X	X	
8. Preparação de artigos ou resumos para publicação e apresentação.							X	X	X	X	X	X
9. Elaboração do relatório final											X	X

Discriminação orçamentária					
Nº	Qtd.	Descrição	Valor unit.	Valor total	Fonte financiadora¹
Material de Consumo					
1					C
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

Material Permanente					
9					C
10					
11					
Serviços de Terceiros – Pessoa Jurídica					
12					
13					
Serviços de Terceiros – Pessoa Física					
14					
15					
16					
TOTAL					

<sup>1</sup> - No item “Fonte financiadora”, identificar a fonte como: a) recurso próprio; b) recurso externo (empresas, outras instituições de ensino/pesquisa, instituições de fomento); c) recurso da Unidade onde se desenvolve a pesquisa.