

DIEGO ENRY BARRETO GOMES

**MODELOS MOLECULARES PARA O
CONFINAMENTO DA ENZIMA ORGANOFÓSFORO
HIDROLASE EM NANOESTRUTURAS**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOFÍSICA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

MAIO DE 2010

DIEGO ENRY BARRETO GOMES

**MODELOS MOLECULARES PARA O
CONFINAMENTO DA ENZIMA ORGANOFÓSFORO
HIDROLASE EM NANOESTRUTURAS**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOFÍSICA.

ORIENTADOR: PEDRO GERALDO PASCUTTI

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CO-ORIENTADOR: THEREZA AMÉLIA SOARES DA SILVA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MAIO DE 2010

Esta Tese foi desenvolvida no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do professor Pedro Geraldo Pascutti, em cooperação com o *Pacific Northwest National Laboratory* – EUA, e com o Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, sob a co-orientação da professora Thereza Amélia Soares da Silva e auxílios da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e dos institutos Norte Americanos, *National Science Foundation* (NSF), *Department of Energy* (DOE), e *National Institutes of Health* (NIH).

FICHA CATALOGRÁFICA

(numero de registro) Gomes, Diego Enry B. G..

Modelos Moleculares para o Confinamento da Enzima Organofósforo Hidrolase. / Diego Enry Barreto Gomes. Rio de Janeiro, 2010.

xi, 150 f. :il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Molecular e Estrutura, 2010.

Orientador: Pedro Geraldo Pascutti

Co-orientador: Thereza Amélia Soares da Silva

1. Dinâmica Molecular. 2. Nanomateriais. 3. Organofósforo Hidrolase.
– Teses.

I.Pascutti, Pedro Geraldo (Orient). II. Soares, Thereza Amélia da Silva (Co-orient). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. V. Titulo.

CDD: (numero de registro)

Resumo

A enzima organofósforo hidrolase (OPH) de *Brevundimonas diminuta* catalisa a hidrólise de uma grande variedade de compostos organofosforados com alta eficiência catalítica e ampla especificidade de substrato. O imobilização da OPH em superfícies de sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) amplifica de forma significativa sua capacidade catalítica e atividade específica, quando comparada com a enzima em solução, com importantes aplicações para a detecção e descontaminação de inseticidas e agentes de guerra química. Entretanto o mecanismo de adsorção à superfície ainda é pouco compreendido. Medidas experimentais da eficiência de imobilização em função da carga e percentagem de cobertura da superfície por diferentes grupos funcionais sugerem que as forças eletrostáticas são as interações predominantes responsáveis pela adsorção da OPH nas superfícies de FMS. A modelagem computacional pode elucidar este mecanismo e contribuir no processo de planejamento de dispositivos biológicos sintéticos de alta eficiência. Para emular os efeitos de confinamento, foi necessário desenvolver ferramentas computacionais, e avaliar diferentes modelos moleculares para descrever a FMS. Os modelos foram submetidos a simulações de dinâmica molecular em solvente explícito onde investigamos os efeitos do ambiente de confinamento na dinâmica interna da enzima e no comportamento da interface OPH-FMS. Nossos resultados suportam a conclusão de que as interações eletrostáticas são responsáveis pela ligação da OPH à superfície de FMS. Entretanto, estes resultados também mostram que as forças de van der Waals são fundamentais para a adsorção na interface. Demonstramos que a adsorção da OPH no modelo de FMS favorece a conformação na qual o sítio ativo é completamente acessível ao substrato, em contraste com a enzima não confinada.

Abstract

The enzyme organophosphorous hydrolase (OPH) from *Brevundimonas diminuta* catalyzes the hydrolysis of a wide variety of organophosphorous compounds with high catalytic efficiency and broad substrate specificity. The immobilization of OPH in functionalized mesoporous silica (FMS) surfaces increases significantly its catalytic specific activity, as compared to the enzyme in solution, with important applications for the detection and decontamination of insecticides and chemical warfare agents. However, the adsorption of OPH to the surface is not fully understood. Experimental measurements of immobilization efficiency as a function of the charge and coverage percentage of different functional groups have been interpreted as electrostatic forces being the predominant interactions underlying the adsorption of OPH onto FMS surfaces. Computational modelling can give an insight into the mechanism and contribute to the design of highly efficient biological-synthetic devices. To emulate confinement effects, it was necessary to develop computational tools and consider several molecular models to describe the FMS. The models were submitted to explicit solvent molecular dynamics simulations and in bulk solution to investigate the confinement effects on the internal dynamics of OPH, and on the behavior of the OPH-FMS interface. Our results support the conclusion that electrostatic interactions are responsible for the binding of OPH to the FMS surface. However, these results also show that the van der Waals forces are detrimental for interfacial adhesion. In addition, it is found that OPH adsorption onto the FMS models favors a protein conformation whose active site is fully accessible to the substrate, in contrast to the unconfined protein.

"As pequenas oportunidades são, freqüentemente, o início de grandes empreendimentos." (Demóstenes)

Agradecimentos

Aos meus pais, Arlindo e Eliane (Lily), meus irmãos, Dennys e Douglas, e minha família pela minha formação, apoio incondicional e amor, que me permitiram chegar até aqui, e que torceram sinceramente para o meu sucesso.

Aos meus mestres e orientadores, professores Pedro Pascutti e Thereza Soares.

Aos mestres Professores Araken Werneck, Chenghong Lei, Gilberto Weissmuller, Kleber Mundin, Paulo Bisch, Roberto Lins, Ronaldo Mohana, Tjserk Straatsma, e Wanda von Kruger, pela confiança e valiosos ensinamentos.

Aos meus queridos amigos do laboratório Arlan, Gabriel, Paulo Ricardo, Pedro Loureiro, Pedro Torres, Rafael, Reinaldo, Tácio, obrigado pelos desafios e problemas, de Linux, do cluster ou de simulações, que eu tentei ajudar a resolver.

A minha querida Priscilinha

Aos patrocinadores, CNPq, CAPES, FAPERJ, NIH, DOE, e aos laboratórios Núcleo de Computação da Alto Desempenho (NACAD) e Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM) da UFRJ e ao *Pacific Northwest National Laboratory* junto ao *Environmental Molecular Sciences Laboratory* pelos recursos computacionais dentro do projeto gc20896.

Lista de siglas e abreviaturas

AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
APBS	<i>Adaptative Poisson-Boltzmann Solver</i>
BKS	van Beest, Kramer, van Santer
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Molecular Dynamics</i>
DFT	Teoria do funcional da densidade
DM	Dinâmica Molecular
EC	<i>Enzyme Classification</i> – Consórcio internacional para classificação de enzimas
ED	Dinâmica essencial (Essential Dynamics)
EM	Minimização da energia (<i>Energy Minimization</i>)
EMSL	<i>Environmental Molecular Sciences Laboratory</i>
FMS	Sílica Mesoporosa Funcionalisada (<i>Functionalized Mesoporous Silica</i>)
FMS _{Coul}	Simulação da enzima organofósforo hidrolase em modelo de confinamento composto de esferas com carga formal -1e e parâmetros de van der Waals equivalentes ao átomo de oxigênio do campo de forças GROMOS, conjunto de parâmetros 53a6.
FMS _{vdW}	Simulação da enzima organofósforo hidrolase em modelo de confinamento composto de esferas com carga formal -1e e parâmetros de van der Waals equivalentes ao átomo P3 do campo de forças Martini.
GROMACS	<i>GROningen Machine for Chemical Simulations</i>
GROMOS	<i>GROningen Molecular Simulation</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
L1	Região compreendida entre os resíduos 155 e 165 da enzima OPH
L2	Região compreendida entre os resíduos 172 e 182 da enzima OPH
L3	Região compreendida entre os resíduos 201 e 215 da enzima OPH
L4	Região compreendida entre os resíduos 230 e 240 da enzima OPH
L5	Região compreendida entre os resíduos 255 e 275 da enzima OPH
L6	Região compreendida entre os resíduos 305 e 325 da enzima OPH
L7	Região compreendida entre os resíduos 130 e 145 da enzima OPH
MM	Mecânica Molecular
MSD	Deslocamento médio quadrático (<i>Mean squared displacement</i>)

NAMD	<i>NAnoscale Molecular Dynamics</i>
<i>NAMD-Lite</i>	<i>NAnoscale Molecular Dynamics - Lite</i>
OPH	Organofósforo Hidrolase
OPH _{free}	Simulação da enzima organofósforo hidrolase em solução aquosa
	OPH _{fins} Simulação da enzima organofósforo hidrolase em modelo de confinamento composto de esferas com carga formal -1e e parâmetros de van der Waals equivalentes ao átomo de oxigênio.
OPLS	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
PNNL	<i>Pacific Northwest National Laboratory</i>
RESP	<i>Restrained ElectroStatic Potential</i>
RMSD	<i>Root Mean Squared Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Squared Fluctuation</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCA	Análise dos componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
SASA	Área de superfície acessível ao solvente (<i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
SPC	Modelo de água SPC (<i>Single Point Charge</i>)
SPC/E	Modelo de água SPC/E (<i>Single Point Charge / Energy</i>)
TIP3P	Modelo de água TIP3P
vdW	van der Waals
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

Glossário

Amorfizar: Neologismo do termo inglês amorfize. Se refere ao processo de tornar algo amorfo.

Atividade específica: Medida de atividade por miligrama de proteína (enzima).

Campo de forças: conjunto de parâmetros e funções de interação para descrever um sistema.

Catalizador: catalisador é qualquer substância que acelera uma reação, diminuindo a energia de ativação, diminuindo a energia do complexo ativado, sem ser consumido, durante o processo

Compostos organofosforados: Substâncias químicas que contém carbono e fósforo, sendo geralmente obtidas através do uso de sais orgânicos do ácido fosfórico. São potentes agentes neurotóxicos amplamente utilizados como pesticidas, inseticidas e armas de guerra química, sendo fatais na proporção de alguns miligramas para um homem de cerca de 70kg.

Cross-linking (ligações cruzadas): em proteínas, são ligações que conectam uma cadeia de um proteína à outra, através de ligação covalente, ou iônica.

Desnaturação: de proteína é a perda da estrutura tridimensional (enovelamento) nativo. Comumente o termo desenovelamento é utilizado como sinônimo, um neologismo do inglês *unfolding*.

Enzimas: proteínas especializadas que atuam como catalisadores na maioria das reações bioquímicas, baixando a energia de ativação necessária para que se dê uma reação química. As enzimas possuem normalmente uma alta especificidade em relação às reações que catalisam e aos substratos que estão envolvidos nessas reações. Por serem catalisadores eficientes são aproveitadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica e alimentar.

Especificidade enzimática: a forma complementar, carga e características hidrofílicas / hidrofóbicas, são responsáveis por esta especificidade. As enzimas exibem também elevados níveis de estereoespecificidade, regioselectividade e quimioselectividade.

Gases dos nervos: é um termo comum usado como referência aos armas de guerra química, organofosforados, altamente tóxicos, que atuam no sistema nervoso central, inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase, que possui ação importante na transmissão de impulsos nervosos.

Proteínas: polímeros não ramificados de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, podendo ser constituídas por um ou mais de tais polímeros.

Rigidez dielétrica: A rigidez dielétrica de um certo material é um valor limite de tensão elétrica aplicada sobre a espessura do material (kV/mm), sendo que, a partir deste valor, os átomos que compõem o material se ionizam e o material dielétrico deixa de funcionar como um isolante

Simulated annealing: Um protocolo de *simulated annealing* (recozimento simulado) é uma analogia o processo metalúrgico de *annealing* que consiste em uma etapa de aquecimento até a fusão, seguida de resfriamento lento para obtenção de estados de baixa energia num sólido.

Volume excluído: para uma macromolécula é o volume efetivo que uma macromolécula, em solução diluída, exclui das demais

Lista de figuras

- Figura 1.1 Estrutura da proteína PhoB (código PDB: 1GXP). A) Superfície molecular colorida pelo potencial eletrostático calculado no vácuo. B) Estrutura tridimensional ilustrada pelo modelo *Cartoon* e colorida pela estrutura secundária. Em amarelo as estruturas em fita- β , em vermelho as estruturas em hélice- α , em verde as regiões de dobras e voltas. C e D) Os traços pontilhados em amarelo indicam as ligações Hidrogênio entre os átomos do esqueleto peptídico. C) Detalhe de uma folha β formada por três fitas- β , antiparalelas. D) Detalhe da estrutura em hélice- α . Note a maior ocorrência de resíduos polares na região superior desta hélice (lisina e arginina) contra os resíduos apolares (leucina e isoleucina) predominantes na região inferior. Na estrutura da proteína os resíduos polares coincidem com a área exposta ao solvente enquanto que os resíduos apolares se encontram enterrados na proteína..... 23
- Figura 1.2 Modelo molecular do dímero da enzima OPH (o centro da figura é a interface entre os monômeros), apresentado pela superfície molecular, em cinza transparente. A estrutura da enzima é representada pelo modelo *New Cartoon*, onde as fitas azuis são as estruturas em hélice- α e em amarelo, as fitas- β . Em detalhe, no monômero esquerdo, está destacado o sítio ativo..... 29
- Figura 1.3 Detalhe dos resíduos importantes do sitio ativo da OPH. Os íons Zn²⁺ estão destacados em verde, conectados por um radical μ -hidroxo e pela lisina 169, carboxilada 29
- Figura 1.4 Concepção artística do citosol, mostrando microtúbulos (azul claro), filamentos de actina (azul escuro); ribossomos (amarelo e rosa), proteínas solúveis (azul claro), kinesina (vermelho), pequenas moléculas (branco) e RNA (rosa). Autor: Tim Vickers, disponibilizada pela licença *Creative Commons*. 33
- Figura 1.5 Ilustração do volume disponível para o solvente (vermelho) para duas moléculas de diferentes tamanhos (preto) em um compartimento contendo alta concentração de macromoléculas (esferas cinzas). À esquerda uma molécula pequena pode explorar um volume superior ao da molécula grande à direita. Esta redução de volume acessível amplifica a concentração efetiva das macromoléculas em soluções concentradas – um efeito conhecido como aglomeração macromolecular (*macromolecular crowding*). Autor: Tim Vickers, disponibilizada pela licença *Creative Commons*. 34
- Figura 1.6 Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula de sílica mesoporosa. Autor: Dr. Victor Lin, Iowa State University. Disponibilizada pela licença *Creative Commons*. 37
- Figura 3.1 Interações intermoleculares (linhas tracejadas) e intramoleculares (linhas pontilhadas). Em geral, os campos de força de mecânica clássica desconsideram as interações do tipo não-ligadas até o terceiro vizinho (indicado com os índices 1 a 4). A contribuição destas interações estaria implícita nos termos de potencial: ligação, ângulo e diedro. Alguns campos de forças, entretanto, definem um potencial modificado para o par de átomos 1 e 4. 49
- Figura 3.2 Comparação da convergência do método de gradiente com tamanho de passo ótimo (em verde) e o gradiente conjugado (em vermelho) para minimizar uma função quadrática associada com um sistema linear. O gradiente conjugado converge com um menor numero de passos. Autor: Oleg Alexandrov, disponibilizada pela licença *Creative Commons*. 52
- Figura 3.3 Representação bidimensional das condições periódicas de contorno que simulam um ambiente infinito. A caixa central é repetida em todos os lados e é utilizado um raio de corte (círculo pontilhado) que

restringe a distância para contabilizar as interações de longo alcance. Os pequenos círculos em cinza representam grupos de carga adicionados ao cálculo pela presença de pelo menos um dos átomos no interior do raio de corte	56
Figura 3.4 Representação dos efeitos da aplicação do campo de reação na função potencial de Coulomb para partículas de mesma carga com e sem o campo de reação. Neste exemplo ϵ_0 é igual 54 e o raio de corte 1.5nm.....	58
Figura 3.5 Representação unidimensional dos componentes da soma de Ewald, em um sistema unidimensional de cargas pontuais. A esquerda, o espaço direto, ao centro a distribuição de cargas no espaço direto, a direita distribuição de cargas gerada para o espaço recíproco	59
Figura 3.6 Ilustração do método PME. Primeiro as posições atômicas e as cargas são armazenadas, em seguida é produzida uma rede de pontos, depois as cargas são interpoladas aos pontos da rede. A soma de Ewald é realizada apenas para os pontos da rede. Finalmente o potencial é transferido de volta aos átomos e as coordenadas são atualizadas para o próximo passo da DM.	59
Figura 3.7 Ligações Hidrogênio. São três as convenções para determinação de ligações hidrogênio, dados a distância r e o ângulo α : Na figura à esquerda são consideradas distâncias r entre Doador (D) e Aceitador (A) inferiores a 0,36nm, com α variando entre 0° e 60°; Na figura à direita, são consideradas distâncias r entre Hidrogênio (H) e Aceitador (A) inferiores a 0.27nm, com β variando entre 120° e 180°; A terceira convenção é a combinação dos critérios anteriores.....	63
Figura 3.8 Superfície Molecular: Uma ponta de prova esférica corre por sobre a superfície de van der Waals (SvdW), gerando superfícies de contato e superfícies de reentrâncias (SR), que somadas compõem a superfície molecular ou superfície exposta ao solvente (SM/SES). O centro da ponta de prova desenha a superfície acessível ao solvente (SAS). A superfície intermolecular (SI) é composta quando há sobreposição de SAS entre duas moléculas.....	65
Figura 4.1 Modelo para a OPH confinada (acima e abaixo, rodada em 90° no eixo Y). No modelo de constrição posicional, os átomos Nç dos resíduos de lisina, representados pelas esferas de van der Waals (VDW) são harmonicamente constringidos (exceto para a lisina 169 carboxilada no sítio ativo). No modelo coarse-grain os grupos funcionais COO- do poro FMS são representados pelas esferas de VDW em vermelho. O substrato soman é apresentado no modelo bastões (amarelos). Os íons Zn ²⁺ são as esferas de VDW em azul.	72
Figura 4.2 Desvio médio quadrático para os átomos do esqueleto peptídico da OPH _{free} (preto), OPH _{fix} (vermelho) e OPH _{fms} (azul) com respeito a estrutura cristalográfica 1EZ2	74
Figura 4.3 Flutuação do desvio médio quadrático para os átomos do esqueleto peptídico da A) OPH _{free} , B) OPH _{fix} e C) OPH _{fms} com respeito a estrutura 1EZ2	75
Figura 4.4 Magnitudes dos autovalores calculados a partir da matriz de covariância correspondendo as simulações OPH _{free} (preto), OPH _{fix} (vermelho) e OPH _{fms} (azul).....	77
Figura 4.5 Componentes dos autovetores para os deslocamentos atômicos ao longo do primeiro autovetor para os ensambles de A) OPH _{free} , B) OPH _{fix} e C) OPH _{fms}	77
Figura 4.6 Representação do potencial eletrostático distribuído na superfície molecular da OPH. A) Vista frontal, as setas em preto indicam os dois sítios ativos. B) Vista de traseira, que faz face para a parede do poro. A cor azul representa potencial positivo, vermelho representa potencial negativo, em branco estão indicadas	

as áreas de potencial neutro. A escala para o potencial da superfície é dada de kT na faixa entre -5 a 5 kT. 79

Figura 5.1: Representação em *cartoon* da estrutura da organofósforo hidrolase adsorvida na superfície de silica mesoporica. (A) Visão do topo do dímero de OPH. Regiões de grande flutuações atômicas nas simulações de DM são indicadas em violeta (*loop* L1, resíduos 155-165), azul (L2, resíduos 172-182), amarelo (L3, resíduos 201-215), laranja (L4, resíduos 230-240), roxo (L5, resíduos 255-275) e verde (L6, resíduos 306-325) apenas para um dos monômeros. (B) Vista aumentada do sítio ativo com resíduos representados em bastões e, em amarelo, os cátions Zn^{2+} pelo modelo Corey-Pauling-Koltun (CPK). O resíduo Y^{309} localizado na entrada do sítio ativo está indicado. (C) Vista lateral do dímero de OPH e FMS. Os resíduos carregados positivamente são apresentados pelo modelo de bastões. A sílica meroporosa funcionalizada é representada em CPK (vermelho). O modelo explícito para moléculas de água e íons do solvente foi removido para a exibição..... 88

Figura 5.2 RMSD para as posições dos átomos do esqueleto peptídico da OPH em relação a estrutura cristalina (1HYZ) em função do tempo. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde). As trajetórias foram sobrepostas a estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico..... 90

Figura 5.3 RMSF em relação as posições médias dos carbonos a em função do número do resíduo de aminoácido da sequência. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde). As trajetórias foram sobrepostas a estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico, com frequência de dados de 10 ps. 90

Figura 5.4 Autovalores dos 10 primeiros autovetores (os mais representativos), calculados a partir das trajetórias de dinâmica molecular para OPH_{free} (círculos pretos), FMS_{coul} (quadrados vermelhos), FMS_{vdW} (triângulos verdes). 93

Figura 5.5 Deslocamento ao longo do primeiro (i), segundo (ii) e terceiro (iii) autovetores, calculados a partir das trajetórias de dinâmica molecular para OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde). 94

Figura 5.6: **Esquerda:** Projeção dos deslocamentos atômicos ao longo do primeiro autovetor na estrutura tridimensional da (i) OPH_{free} , (ii) FMS_{coul} , e (iii) FMS_{vdW} . A largura das fitas ilustra a amplitude do deslocamento. **Direita:** Superfície molecular para o instante 50.0 ns da trajetória para a OPH (i) OPH_{free} , (ii) FMS_{coul} , e (iii) FMS_{vdW} . O resíduo Y^{309} e os cátions Zn^{2+} estão representados em CPK..... 95

Figura 5.7: Deslocamento médio quadrático dos átomos da OPH a partir da posição original em 50 ns de simulação nas simulações OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho) FMS_{vdW} (verde) 96

Figura 5.8 Distância minima entre pares de átomos OPH e superfície FMS nas simulações FMS_{coul} (vermelho) FMS_{vdW} (verde)..... 97

Figura 5.9: **(A)** Função de distribuição radial das moléculas de água em relação aos átomos N e O, das cadeias laterais dos resíduos da superfície da proteína, presentes na interface OPH-FMS. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho) e FMS_{vdW} (verde). **(B)** Densidade expressa pelo número médio de moléculas de solvente entorno da OPH nos modelos de poro FMS_{coul} (i) e FMS_{vdW} (ii). A representação do solvente é feita ao longo do eixo y. 99

Figura 6.1 Ilustração de um nanoporo de sílica amorfa contendo cópias da enzima organofósforo-hidrolase... 107

Figura 6.2 Blocos periódicos de sílica construídos usando o plugin *Inorganic Builder* no programa VMD 1.8.7. Os átomos são representados pelo modelo de esferas de van der Waals, em amarelo os átomos de silício,

em vermelho os átomos de oxigênio. A) Bloco de sílica cristalina produzido por replicação da célula unitária de α -quartzo. B) Bloco de sílica amorfa produzido por ciclos de <i>simulated annealing</i> por dinâmica molecular usando o programa NAMD-Lite	112
Figura 6.3 Ilustração do processo de criação da superfície a partir do bloco de sílica amorfa (mostrado na Figura 6.2B). O bloco está orientado no eixo Z. Os átomos a 20 Å do plano central da superfície são selecionados (A em azul) e removidos (B). O bloco originalmente é periódico em X, Y, e Z, e o processo remove a periodicidade no eixo Z deixando um espaço vazio (vácuo) acima e abaixo da superfície.....	113
Figura 6.4 Artefatos produzidos pelo corte da superfície de sílica amorfa. A) Superfície da Figura 5.3 B) Assinalamento dos átomos com numero de ligações incompleto. Em azul os átomos de silício com menos de kwquatro ligações, em verde os átomos de oxigênio com menos de duas ligações.....	114
Figura 6.5 (A) Busca das ligações químicas de superfície passíveis de rompimento. É necessário quebrar seletivamente ligações siloxano de superfície, que não resultem em átomos de silício com menos de 3 ligações, ou em grupos de átomos livres. Quando se escolhe uma ligação para romper, toda topologia deve ser vasculhada, seguindo seqüencialmente as ligações químicas a partir do ponto de quebra para evitar a formação de grupos livres, este processo se repete a cada ligação rompida. (B) Ilustração de um fragmento de átomos livres gerado quando as condições do algoritmo não são seguidas.....	119
Figura 6.6 Nas estruturas em que a sílica é simulada na forma superfície cristalina ou superfície amorfa, os átomos de hidrogênio e as hidroxilas são adicionados à coordenada do átomo receptor a $\pm 1.0\text{\AA}$ e $\pm 1.52\text{\AA}$, respectivamente, de acordo com a distância no eixo Z em relação ao centro da célula unitária. O átomo de hidrogênio da hidroxila é adicionado formando 115° com o silício.....	120
Figura 6.7 Tarefas dos programas <i>NanoSurface Tools</i> . (A) A distribuição de cargas parciais para os núcleos atômicos é distinta de acordo com a localização do átomo. O programa deve identificar os átomos de superfície e os de interior (<i>bulk</i>) e assinalar as cargas (A e B). Para reduzir o tempo computacional, os átomos do interior são considerados fixos e suas ligações, ângulos e diedros devem ser removidos da topologias desde que não comprometam os átomos de superfície. Os átomos marcados em preto estão fixos. Os traços em preto representam ligações removidas e as setas curvas em preto os ângulos removidos. As linhas pontilhadas significam continuidade das ligações, ângulos etc.....	121
Figura 6.8 O programa add_function usa como entrada arquivos no formato PDB onde as cargas ficam na coluna do fator B. As réplicas dos grupos funcionais são adicionadas aos átomos de oxigênio livres na superfície da sílica e a topologia é construída automaticamente. Uma biblioteca de grupos funcionais será distribuída junto com o pacote.....	123
Figura 6.9 Superfície de sílica amorfa funcionalizada randomicamente a 20% do número de átomos de hidrogênio de superfície usando grupos $(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$. Os átomos da sílica estão representados no modelo de esferas de van der Waals, os átomos do grupo funcional estão representados pelo modelo de bastões. O sistema é periódico no plano da superfície. Esquerda: vista superior da superfície. Direita: vista lateral da superfície, as esferas azuis representam as moléculas de água solvatando o sistema.....	124
Figura 6.10 Sobreposição das posições atômicas para uma simulação de dinâmica molecular da enzima lisozima na superfície de sílica amorfa não-funcionalizada gerada pelo método descrito. A superfície de sílica representa o último passo da simulação no modelo de esferas de van der Waals. A lisozima é representada	

pelo modelo <i>Cartoon</i> e colorida pelo tipo de estrutura secundária. São sobrepostos 50 quadros da simulação de 10.0 ns sem nenhum tipo de tratamento de translação ou rotação.....	124
Figura 6.11 Modelo de cargas para os átomos da sílica. A contribuição de carga de cada oxigênio do interior da sílica (<i>bulk</i>) para o grupo de átomos apresentado é metade do valor nominal (-0.225) e a outra metade para o outro grupo em que ele se liga. Considerando o esquema de cargas apresentado à esquerda dos quadros A e B, um pequeno ajuste da carga do silício permite zerar a carga do sistema.....	124
Figura 7.1 Grupo funcional $(\text{CH}_2)_4\text{COO}^-$ com a átomos identificados para o campo de forças CHARMM. As cargas atômicas parciais são baseadas no resíduo de aminoácido glutamato. O ponto de conexão com atomo de oxigênio livre da matriz de sílica é indicado pela seta (átomo C1, tipo CT2). O arquivo com as coordenadas se encontra no apêndice.....	129
Figura 7.2 Esquema do sistema de simulação da interface OPH-FMS atomística. O sistema é periódico em todas as direções com origem nas linhas pontilhadas. Uma das imagens periódica é mostrada à esquerda. A superfície de sílica tem espessura de 20 Å (2x10 Å), cada grupo funcional $(\text{CH}_2)_4\text{COO}^-$ se estende por até 8 Å. A face positivamente carregada da enzima OPH (inferior) foi disposta a 10 Å da superfície inferior da sílica e o tamanho do sistema foi ajustado para que a face da enzima (onde está o sítio ativo) estivesse a 15 Å de distância da superfície superior da sílica. A menor distância entre a enzima e sua imagem periódica foi ajustada para 14 Å. As dimensões finais do sistema foram definidas em 114x114x95 Å.....	130
Figura 7.3 Modelo atomístico da simulação OPH_{fms} , ilustrando a esquerda, em opacidade reduzida, uma das imagens periódicas do sistema. A proteína OPH está representada pelo modelo <i>New Cartoon</i> , com a estrutura secundária colorida, hélices-alfa em magenta e fitas beta em amarelo. A superfície de SiO_2 está colorida por tipo de átomo: amarelo silício, vermelho oxigênio, branco hidrogênio. O grupo funcional $[\text{CH}_2]_4\text{COO}^-$ é representado pelo modelo de bastões, omitidos os átomos de hidrogênio.....	130
Figura 7.4 RMSD para as posições dos átomos do esqueleto peptídico da OPH em relação a estrutura cristalina (1EZ2). OPH_{free} (preto), OPH_{fms} (vermelho). As trajetórias foram sobrepostas à estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico amostrando os dados a cada 10 ps.....	132
Figura 7.5 Sobreposição das estruturas médias a estrutura 1EZ2.....	133
Figura 7.6 Raiz do desvio médio quadrático para a flutuação (RMSF) das posições dos átomos do esqueleto peptídico em função do número do resíduo de aminoácido da sequência. OPH_{free} (preto), OPH_{fms} (vermelho). As trajetórias foram sobrepostas à estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico. A amostragem para o cálculo do RMSF é iniciada em 5 ns para OPH_{free} e 20 ns para OPH_{fms} e apresentada como média para os dois monômeros com frequência de coleta de dados de 10 ps. As marcações dos <i>loops</i> segue a proposta do capítulo 05.....	134
Figura 7.7 Simulação OPH no modelo atomístico de sílica mesoporosa funcionalizada (OPH_{fms}). A superfície está orientada no plano XY. A) Distância mínima entre pares de átomos Proteínas-Sílica (excluindo os grupos funcionais) nos primeiros 100 ps, mostrando a aproximação rápida da OPH. B) Distância mínima entre pares de átomos OPH-sílica (preto) OPH-grupo funcional (vermelho). Após a rápida aproximação inicial, a OPH se distancia da sílica, preservando os contatos com o grupo funcional.....	135
Figura 7.8 Deslocamento da enzima OPH em relação a superfície de sílica funcionalizada. C e D são as figuras A e B respectivamente, após rotação de 90° no eixo perpendicular ao plano da superfície. (A e C) Modelo inicial	135

Figura 7.9 Deslocamento médio quadrático para a OPH _{free} (preto) e OPH _{fms} (vermelho).	136
Figura 7.10 Detalhe da interface entre a OPH e a superfície de sílica funcionalizada. A e C representam o tempo de simulação 0 ns, B e D o tempo de simulação 10 ns. A localização das posições detalhadas nesta Figura são indicadas com setas na Figura 5.15A, para A e B, e 5.15C para C e D. A proteína OPH está representada pelo modelo <i>New Cartoon</i> , com a estrutura secundária colorida, hélices-alfa em magenta e fitas beta em amarelo. A superfície molecular da sílica é representada em cinza e os grupos funcionais [CH ₂] ₄ -COO ⁻ são representados pelo modelo de bastões, os átomos de carbono são estão em azul e oxigênio em vermelho. Para clareza, os átomos de hidrogênio para o grupo funcional não são representados.	137

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Descrição dos sistemas simulados, campos de forças, modelos de água e programas utilizados.....	46
Tabela 5.1 Descrição dos sistemas simulados.....	86
Tabela 5.2: Propriedades estruturais médias para a OPH nas simulações de DM.....	92
Tabela 6.1 Parâmetros do campo de forças BKS	115
Tabela 6.2 – Parâmetros não ligados para a sílica e água, incluindo coeficientes para o potencial de Lennard-Jones e cargas. (a) silício de grupo silanol isolado ou vicinal; (b) silício de grupo silanol vicinal.....	121

1 : Introdução.....	22
1.1 Considerações sobre a estrutura e a função de proteínas	22
1.2 Simulações de biomoléculas	24
1.3 Os compostos organofosforados	26
1.4 A enzima Organofósforo Hidrolase	27
1.4.1 Estrutura da OPH.....	28
1.4.2 Mecanismo de reação	30
1.4.3 OPH como base de biosensor.....	31
1.5 Confinamento de enzimas	32
1.5.1 Abordagens convencionais para imobilização de proteínas e enzimas:	34
1.5.2 Sílica mesoporosa funcionalizada	35
2 : Objetivos	44
2.1 Geral:	44
2.2 Específicos:	44
3 Métodos.....	45
3.1 Campo de Forças	45
3.1.1 Grupo 1: Átomos ligados	47
3.1.2 Grupo 2: Interações entre átomos não ligados.	48
3.2 Otimização das Geometrias Moleculares	50
3.2.1 Método do Máximo Declive (Steepest Descent).....	51
3.2.2 Método do Gradiente conjugado	51
3.3 Dinâmica Molecular	52
3.4 Condições periódicas de contorno.....	54
3.5 Tratamento das interações não-ligadas de longo alcance	56
3.5.1 Grupos de cargas	57

3.5.2	Alternativas à truncagem simples (cut off)	58
3.6	Cálculo de cargas dos ligantes pelo ajuste do potencial eletrostático (ESP ElectroStatic Potential).....	60
3.6.1	A escolha da Base.....	60
3.6.2	O método RESP para o ajuste de cargas.	61
3.7	Métodos de Análise	62
3.7.1	Desvio da Raíz Média Quadrática.....	62
3.7.2	Ligações Hidrogênio	62
3.7.3	Área de Interação Intermolecular.....	63
3.7.4	Deslocamento médio quadrático	65
3.7.5	Análise dos componentes principais para proteínas (PCA)	66
4	: Modelos moleculares para emular os efeitos de confinamento na dinâmica interna da organofósforo hidrolase.....	69
4.1	Procedimentos	70
4.1.1	Modelo da enzima OPH	70
4.1.2	Modelo para o FMS.....	71
4.1.3	Preparação das simulações de DM.....	73
4.2	Resultados.....	74
4.2.1	Estabilidade estrutural	74
4.2.2	Dinâmica interna da enzima	75
4.3	Discussão.....	78
5	: O Papel das Interações Não-ligadas na Dinâmica Conformatinal da Organofósforo Hidrolase Adsorvida em Superfícies de Sílica Mesoporosa Funcionalizada.....	82
5.1	Procedimento.....	84
5.1.1	Modelo da OPH	84
5.1.2	Modelo do FMS.....	85

5.1.3	Preparação das simulações.....	87
5.2	Resultados.....	89
5.2.1	Caracterização estrutural da OPH em água pura e adsorvida em FMS.....	89
5.2.2	Dinâmica da OPH em água e adsorvida nas superfícies de FMS.....	92
5.2.3	Interações na interface proteína-superfície.....	95
5.3	Discussão.....	100
6	: Desenvolvimento e aplicações de ferramentas para a modelagem molecular de nano estruturas funcionalizadas de sílica amorfa atomística.....	106
6.1	Simulações de dinâmica molecular de dispositivos baseados em silício	106
6.2	Modelagem de sistemas biomoleculares de silício.....	108
6.2.1	Construção dos modelos em escala atômica para nanodispositivos inorgânicos	
	109	
6.2.2	Modelagem de superfícies amorfas de SiO ₂	109
6.3	Princípios do desenvolvimento dos programas	111
6.4	Método	112
6.4.1	Construção da sílica amorfa	112
6.5	Simulações da superfície de sílica em água.	122
6.6	Simulações da superfície de sílica funcionalizada.....	122
6.6.1	Adição dos grupos funcionais.	122
7	: Simulações da OPH em água e na superfície de FMS em modelo atomístico	125
7.1	Procedimentos	127
7.1.1	Modelo de enzima OPH	127
7.1.2	Modelo da superfície de sílica mesoporosa amorfa em detalhe atômico.	127
7.1.3	Funcionalização da superfície	128
7.1.4	Grupo funcional.....	128
7.1.5	Modelo da interface OPH – FMS atomística	129

7.1.6	Protocolo de simulação	131
7.2	Resultados.....	131
7.2.1	Caracterização estrutural da OPH em água e adsorvida na superfície de FMS atomística.	131
7.2.2	Comportamento da OPH e MSD (desvio médio quadrático).....	134
7.2.3	Interface OPH-FMS atomística	136
7.3	Discussão.....	137
8	Conclusões gerais.....	140
9	Perspectivas.....	143

1 : Introdução

1.1 Considerações sobre a estrutura e a função de proteínas

As proteínas enovelam-se em estruturas tridimensionais estáveis e com funções biológicas específicas. A função de uma proteína é determinada tanto pela sua conformação, como pela sua interação com outras moléculas. Na última década, ferramentas computacionais de bioinformática e modelagem molecular tornaram-se um complemento indispensável às técnicas experimentais de determinação de estrutura de proteínas. Informações essenciais para a elucidação da função de proteínas podem ser obtidas a partir de uma avaliação detalhada das estruturas ou modelos tridimensionais. Estas informações possibilitam uma compreensão quantitativa do reconhecimento molecular e da especificidade enzimática com relação a substratos naturais, inibidores endógenos e exógenos. De fato, a determinação da estrutura de alvos moleculares visando o desenvolvimento racional de fármacos é um dos objetivos mais promissores da genômica estrutural (Ohlstein *et al.*, 2000; Barcellos *et al.*, 2008; Moult, 2008).

A estrutura tridimensional de proteínas é formada pelo arranjo espacial de motivos estruturais como hélices-alfa, folhas-beta, várias dobras e voltas (Figura 1.1). Estas estruturas possuem uma forma compacta que é termodinamicamente favorecida pelo empacotamento de resíduos hidrofóbicos, formação de ligações hidrogênio, interações eletrostáticas e, em alguns casos, por ligações dissulfeto. Estas interações conduzem a proteína à conformação nativa, indispensável à sua atividade biológica.

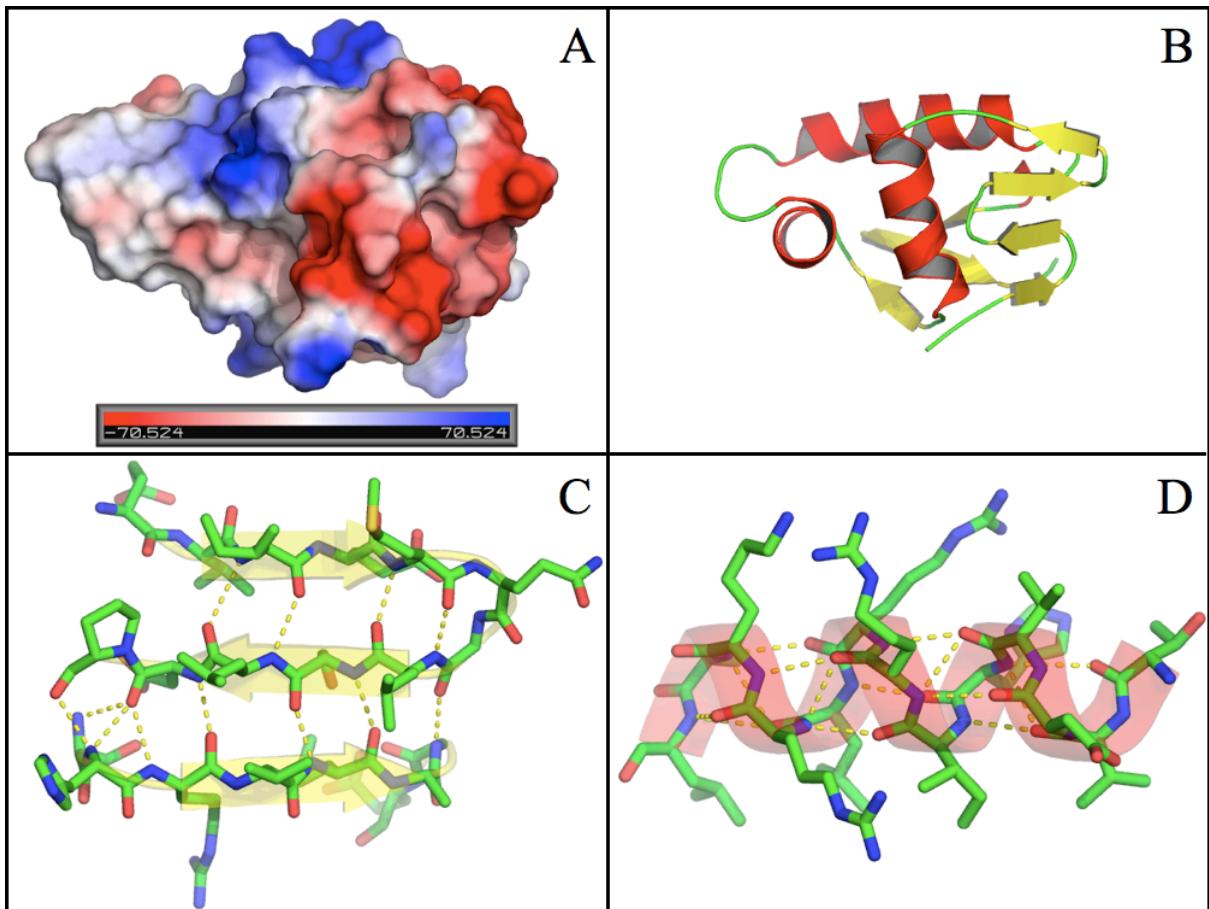


Figura 1.1 Estrutura da proteína PhoB (código PDB: 1GXP). A) Superfície molecular colorida pelo potencial eletrostático calculado no vácuo. B) Estrutura tridimensional ilustrada pelo modelo *Cartoon* e colorida pela estrutura secundária. Em amarelo as estruturas em fita- β , em vermelho as estruturas em hélice- α , em verde as regiões de dobras e voltas. C e D) Os traços pontilhados em amarelo indicam as ligações Hidrogênio entre os átomos do esqueleto peptídico. C) Detalhe de uma folha β formada por três fitas- β , antiparalelas. D) Detalhe da estrutura em hélice- α . Note a maior ocorrência de resíduos polares na região superior desta hélice (lisina e arginina) contra os resíduos apolares (leucina e isoleucina) predominantes na região inferior. Na estrutura da proteína os resíduos polares coincidem com a área exposta ao solvente enquanto que os resíduos apolares se encontram enterrados na proteína.

Um aspecto determinante para a função das proteínas é a flexibilidade estrutural. As flutuações estruturais e a flexibilidade conformacional das proteínas permitem o ajuste induzido ao substrato, necessário para a catálise enzimática (Batista *et al.*, 2010). Por exemplo, a flexibilidade também permite a abertura e fechamento de canais em proteínas de membrana e o processo de transdução celular. Considerando que estes processos biológicos requerem movimentos internos que abrangem diferentes amplitudes e escalas de tempo, a análise da dinâmica molecular de proteínas e seus complexos é uma etapa fundamental para a

elucidação da função e para a caracterização das interações proteína-ligante em escala atômico-molecular.

1.2 Simulações de biomoléculas

Simulações computacionais moleculares vêm adquirindo uma importância crescente em áreas como biologia, química física, farmácia e engenharia. Uma vez que apenas um pequeno número de propriedades de sistemas biomoleculares é diretamente acessível por meios experimentais, as simulações computacionais podem complementar os experimentos fornecendo não apenas médias, mas distribuições e informação temporal de qualquer quantidade – observável ou não observável – que possa ser definida matematicamente, como por exemplo, a distribuição de conformações ou interações entre pares de moléculas (Van Gunsteren e Dolenc, 2008).

As simulações de mecânica molecular (MM) baseadas em campos de forças e na mecânica clássica são uma importante ferramenta para estudar as propriedades de sistemas biomoleculares em resolução atômica. As simulações de dinâmica molecular (DM) estendem a descrição molecular da MM, adicionando a dimensão tempo às coordenadas estruturais. Na simulações de DM, as trajetórias de cada partícula do sistema são calculadas em passos sucessivos, a partir de um campo de forças, que consiste de funções de potencial de interação calibradas com parâmetros empíricos. Tais funções de potencial descrevem as interações entre átomos ligados e não ligados diretamente. Integrando as equações do movimento através de cálculos computacionais, as simulações de DM permitem que, a partir de estruturas moleculares obtidas experimentalmente ou por modelagem molecular, seja simulado o comportamento das biomoléculas em solução. Com esta técnica, é possível monitorar, em escala atômica, mudanças estruturais e conformacionais, permitindo uma descrição quantitativa do comportamento de biomoléculas e complexos biomoleculares.

A análise das simulações de DM fornecem propriedades cinéticas e energéticas que podem ser analisadas estatisticamente para comparação com dados experimentais (Soares, T. *et al.*, 2004; Soares e Ferreira, 2004; Van Gunsteren *et al.*, 2008). A análise das simulações nos orientam na construção de modelos que auxiliam na compreensão dos processos bioquímicos, destacando a relação da tríade estrutura, dinâmica e função, com a atividade biológica.

Atualmente, é possível realizar simulações de sistemas moleculares contendo centenas de milhares de átomos empregando funções atômicas mais realistas e técnicas melhores de amostragem temporal. Desta forma, é comum encontrar na literatura simulações de sistemas tão complexos quanto canais de membranas e mesmo um organismo completo como um vírus (Freddolino *et al.*, 2006; Arkhipov *et al.*, 2009). Isto é possível graças ao aumento progressivo da capacidade de processamento dos computadores e melhorias consideráveis nos campos de forças, e das ferramentas de modelagem molecular (Van Gunsteren e Dolenc, 2008; Van Gunsteren, Dolenc *et al.*, 2008). A visualização molecular, a modelagem por MM e DM, e as metodologias de ancoramento molecular (*docking*) (Lengauer e Rarey, 1996; Soares, Goodsell *et al.*, 1999; Soares, Goodsell *et al.*, 2000; (Da Rocha Pita *et al.*, 2008) compõem o portfólio de ferramentas comumente utilizadas para a caracterização de propriedades biomoleculares, tais como: flexibilidade estrutural, planejamento de fármacos, refinamento de estruturas determinadas por difração de raios-X e RMN, catálise enzimática, etc. A abordagem computacional no desenvolvimento de novos fármacos, pesticidas e demais compostos bioativos é baseada na exploração do conceito de complementaridade estrutural para a geração de antagonistas, ou mesmo agonistas, que sejam específicos para a molécula alvo.

A flexibilidade de proteínas é uma característica essencial para o desempenho de funções altamente específicas, tais como: catálise e reconhecimento molecular. Entretanto,

pouco é conhecido sobre como estes movimentos, inclusive os de grande amplitude, podem ser controlados para melhorar a eficiência do processo catalítico (Smock e Giersch, 2009; Tokuriki e Tawfik, 2009; Vinson, 2009).

1.3 Os compostos organofosforados

Os compostos organofosforados (OP) são substâncias extremamente tóxicas usadas exclusivamente como inseticidas e agentes de guerra química (ex. sarin, soman e VX). A toxicidade aguda dos OP resulta primariamente da inativação da enzima acetilcolina esterase (acetilcolinesterase) através de fosforilação irreversível de uma serina do sítio ativo, o que leva a interrupção da degradação da acetilcolina nas sinapses nervosas e membranas de eritrócitos. Outros alvos diretos da intoxicação por OP incluem os receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina.

Devido a alta toxicidade e amplo uso destes compostos, existe um grande interesse em desenvolver estratégias para detecção e desintoxicação (Cao, 2005). Diversos métodos analíticos (cromatografia em fase gasosa; ensaios enzimáticos) têm sido propostos para detectar agentes organofosforados, mas falham na falta de portabilidade e rapidez na apresentação dos resultados da análise (Das e Kulkarni, 1981; Mendoza, 1981; Barceló, 1988; Cairns e Sherma, 1992; Palchetti, Cagnini *et al.*, 1997; Sherma, 2001). Outro problema é que estes métodos têm um custo bastante elevado e necessitam de pessoal capacitado para a operação dos equipamentos, realização dos experimentos e interpretação dos resultados. Descobertas recentes em tecnologia de biosensores permitiram o desenvolvimento de dispositivos recicláveis baseados em enzimas através do seu confinamento em nanomateriais (Lei *et al.*, 2002; Cao, 2005).

1.4 A enzima Organofósforo Hidrolase

As fosfotriesterases são um grupo de enzimas que degradam compostos OP, e tem grande potencial para uso em tecnologias de biorremediação e detecção através do seu confinamento em estruturas em nanoescala. A enzima organofósforo hidrolase (OPH ; EC 3.1.8.1) da bactéria de solo *Brevudimonas diminuta* (previamente *Pseudomonas diminuta*) é a fosfotriesterase mais bem caracterizada (Hill *et al.*, 2000; Raushel e Holden, 2000; Benning *et al.*, 2001; Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a; Chen-Goodspeed *et al.*, 2001b; Raushel, Frank M., 2002).

A OPH é capaz de catalisar seletivamente a hidrólise de ligações fosfotriéster (P-O), fosfotionato (P-S), fosfofluoridrato (P-F) e fosfocianato (P-CN), presentes numa grande variedade de compostos organofosforados, com alta eficiência catalítica e ampla especificidade de substrato (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a) (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001b) (Caldwell *et al.*, 1991) (Gopal *et al.*, 2000) (Li *et al.*, 2003) (Li *et al.*, 2001) (Omburo *et al.*, 1992) (Russell *et al.*, 1999) (Raushel, Frank M., 2002). Notavelmente o substrato natural e função biológica da OPH permanecem desconhecidos. Especula-se que ela seja um produto da evolução, nas últimas décadas, já que os fosfotriésteres não são compostos que ocorrem naturalmente e foram inicialmente sintetizados durante a Segunda Guerra Mundial (Raushel, Frank M, 2002; Roodveldt e Tawfik, 2005).

A hidrólise do seu substrato mais eficiente (paraoxon) é extraordinariamente eficiente, com valores k_{cat} (contante de catálise) e k_{cat}/K_M (K_M : constante de Michaelis) ($10^4 s^{-1}$ e $10^7 s^{-1} M^{-1}$, respectivamente) que se aproximam ao limite de difusão dos reagentes em solução (Caldwell *et al.*, 1991; Omburo *et al.*, 1992) (Dumas *et al.*, 1990). Em contraste a hidrólise química do paraoxon por KOH ocorre com a constante de segunda ordem de apenas $10^{-2} M^{-1} s^{-1}$ (Dumas *et al.*, 1990).

Foi mostrado que modificações no sítio ativo da enzima alteram a especificidade aos substratos e amplificam a eficiência catalítica para substratos mais lentos (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a; Chen-Goodspeed *et al.*, 2001b; Cho *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006). Variantes da OPH também têm mostrado estéreo seletividade para a hidrólise de organofosfato triésteres quirais (Hill *et al.*, 2004). Esta é uma característica catalítica altamente desejada, já que a maioria dos agentes de guerra química são misturas racêmicas com diferenças substanciais na toxicidade dos diferentes enantiômeros.

1.4.1 Estrutura da OPH

As estruturas cristalográficas têm mostrado a OPH como proteína homodimérica enovelada em um motivo barril-(α/β)₈, contendo um sítio ativo por monômero (Benning *et al.*, 2001) (Figura 1.2). Cada sítio ativo é composto por dois íons metálicos divalentes conectados ou por um hidróxido ou por um íon μ -hidroxo e por um resíduo de lisina carboxilada (Figura 1.3). O átomo Zinco (Zn^{2+}) aparenta ser o metal nativo, porém é observada atividade substancial após substituição deste íon por Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} ou Ni^{2+} em cada monômero da enzima (Omburo *et al.*, 1992; Benning *et al.*, 2001; Rochu *et al.*, 2004). Dois íons metálicos por sítio ativo são necessários para completa atividade catalítica e as constantes cinéticas, k_{cat} e k_{cat}/K_M , são dependentes da identidade do cátion específico no sítio ativo. A hidrólise do organofosfato triester pela OPH ocorre através de inversão da configuração estereoquímica no centro fosfórico em um mecanismo S_n2 (Lewis *et al.*, 1988).

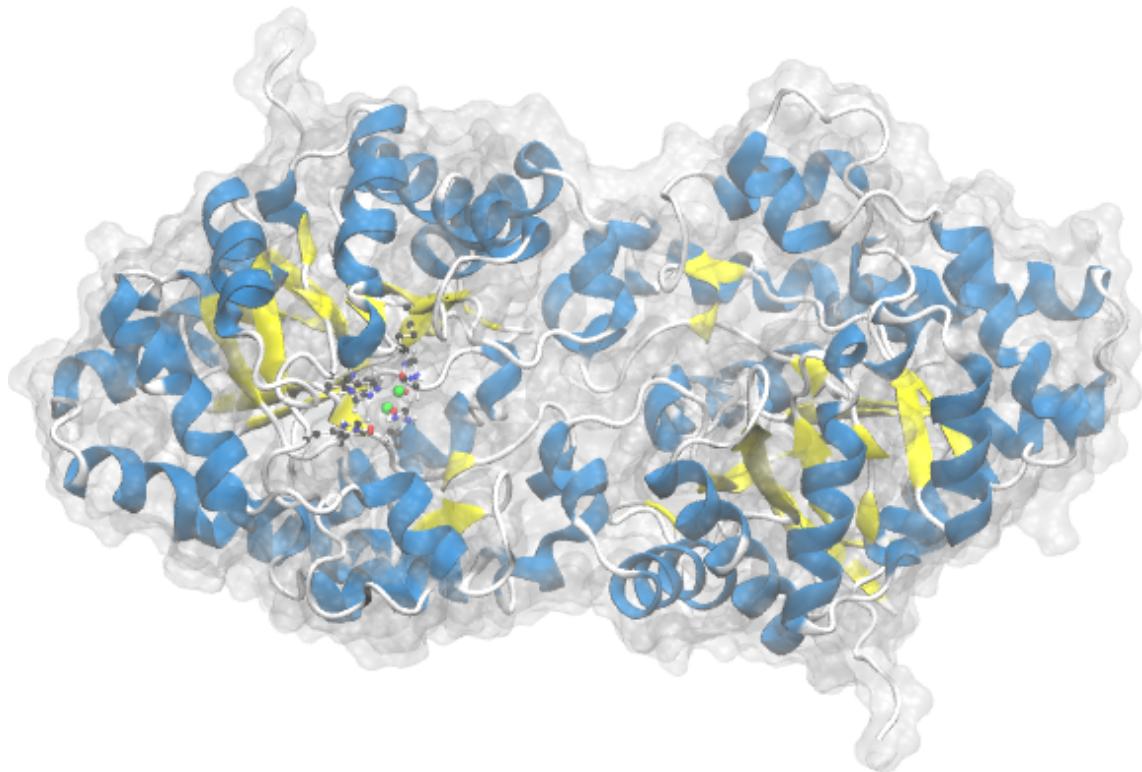


Figura 1.2 Modelo molecular do dímero da enzima OPH (o centro da figura é a interface entre os monômeros), apresentado pela superfície molecular, em cinza transparente. A estrutura da enzima é representada pelo modelo *New Cartoon*, onde as fitas azuis são as estruturas em hélice- α e em amarelo, as fitas- β . Em detalhe, no monômero esquerdo, está destacado o sítio ativo.

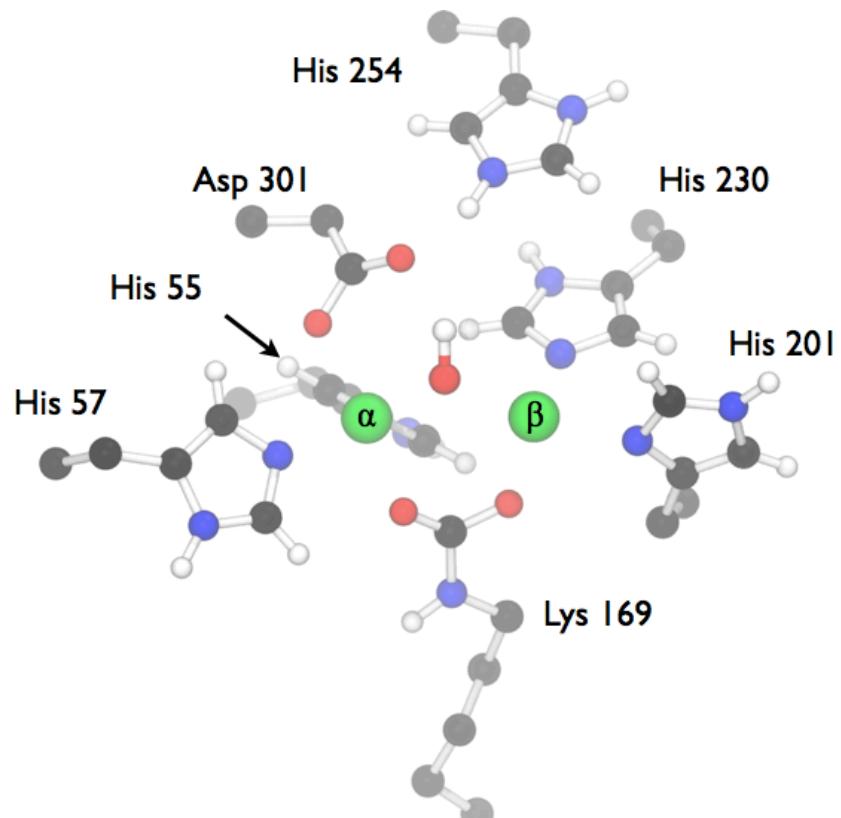


Figura 1.3 Detalhe dos resíduos importantes do sítio ativo da OPH. Os íons Zn²⁺ estão destacados em verde, conectados por um radical μ -hidroxila e pela lisina 169, carboxilada

1.4.2 Mecanismo de reação

Um mecanismo de reação foi postulado onde o substrato organofosforado liga ao sítio ativo por disposição da molécula de água coordenando o cátion metálico β . Em seguida, a interação metal-oxigênio polariza a ligação fosforil-oxigênio e torna o centro fosfórico mais eletrofilico para o ataque nucleofílico do grupamento da ponte metálica (seja o hidróxido ou íon μ -hidroxil) (Samples *et al.*, 2007). O próton do hidróxido, nucleofílico, é então transferido para o resíduo ^{301}Asp e é proposto que seja transportado para fora com assistência dos resíduos ^{254}His e ^{233}Asp (Aubert *et al.*, 2004). Foi sugerido que este último passo aumenta significativamente a reatividade do nucleófilo da ponte metálica já que a mutação tanto para ^{254}His quanto para ^{233}Asp resulta em decréscimo das constantes cinéticas para paraoxon (Aubert *et al.*, 2004).

1.4.2.1 Controvérsia no sitio ativo.

Apesar do mecanismo $S_{n}2$ ter sido reconhecido para a hidrólise de organofosfato triésteres pela OPH, diversas modificações ao mecanismo postulado têm sido propostas, por recentes estudos experimentais e computacionais (Wong e Gao, 2007) (Jackson *et al.*, 2008) (Zhang *et al.*, 2009). Um ponto de dissenso é a identidade da base geral. Baseados na estrutura da fosfotriesterase de *Agrobacterium radiobacter*, que compartilha 90% de identidade de aminoácidos e todos os ligantes com afinidade a metal da OPH de *Brevudimonas diminuta*, Jackson e colaboradores (Jackson *et al.*, 2008) sugeriram que o μ -hidroxil da ponte metálica atua como base para as moléculas de água coordenadas a porção terminal do α -cátion metálico. Além disso, estudos computacionais usando métodos híbridos de mecânica quântica / mecânica molecular (QM / MM) e cálculos de QM de alto nível não ofereceram suporte a uma transferência de próton do íon hidróxido para o resíduo ^{301}Asp durante a hidrólise de paraoxon por OPH (Wong e Gao, 2007) (Zhang *et al.*, 2009). Em vez disso, Wong e Gao

(Wong e Gao, 2007) sugeriram um mecanismo de reação modificado para OPH onde ^{254}His atua como uma base para ativar e desprotonar o hidróxido (nucleófilo).

Nas estruturas de raios-X da OPH, diversos resíduos ionizáveis estão bem posicionados para formar ligações de hidrogênio com vários resíduos de ácido aspártico perto dos metais bivalentes, incluindo ^{233}Asp e ^{301}Asp (Benning *et al.*, 1994; Aubert *et al.*, 2004) (Benning *et al.*, 1995). Flutuações das ligações de hidrogênio, através da modulação das flutuações estruturais locais, são de importância direta para a dinâmica de proteínas, a estabilidade e a reatividade. Essas interações são moduladas pelos estados de protonação de doadores e receptores na proteína. Portanto, a caracterização dos estados de protonação dos resíduos do sítio ativo é de considerável interesse no estudo do mecanismo catalítico de enzimas.

1.4.3 OPH como base de biosensor

A OPH é um excelente candidato para imobilização em biosensores devido à sua habilidade única degradar compostos organofosforados. Neste contexto a imobilização da OPH em suporte de FMS oferece grande potencial para o desenvolvimento de biosensores para bioremediação e desintoxificação de pesticidas tóxicos e agentes dos nervos como o soman, sarin e VX (Ghanem e Raushel, 2005; Lei *et al.*, 2007b). Surpreendentemente, a imobilização da OPH em sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) mostrou amplificação da estabilidade e aumento na atividade catalítica em 200%, quando comparada com a OPH livre em solução (Lei *et al.*, 2002).

Os sensores e filtros baseados em OPH têm enorme potencial para o uso na indústria agrícola, no monitoramento ambiental e na área militar, na forma de detector e desintoxicador de ambientes/amostras contaminados. Estes se aproveitam da resposta direta da OPH aos organofosforados num sistema enzima-substrato, o que permite a operação em um único

passo para detecção e medição direta da atividade enzimática (Mulchandani, Mulchandani *et al.*, 1999; Singh, Flounders *et al.*, 1999; Mulchandani, Chen *et al.*, 2001; Lei, Mulchandani *et al.*, 2005; Singh, 2009). Ao final da reação, a enzima está reativada e o biosensor/filtro está pronto para ser reutilizado no monitoramento contínuo ou desintoxicação de organofosforados do ambiente ao redor.

1.5 Confinamento de enzimas

Uma das questões científicas de grande interesse é a compreensão de como as enzimas isoladas mantêm uma conformação nativa em solução ou em uma matriz de imobilização. Quando confinadas em ambiente nativo, seja no interior de uma célula viva, ou em uma membrana biológica, as proteínas exibem máxima atividade biológica e estabilidade. Descobertas na área de teoria do confinamento e em simulações computacionais indicam que uma proteína, em um ambiente confinado, é estabilizada por forças não presentes em solução (Minton, 2001; Zhou e Dill, 2001; Zhou, 2004; Minton, 2005; 2006; Zhou, Rivas *et al.*, 2008). Para prevenir a agregação, proteínas intrinsecamente desordenadas em soluções diluídas podem adotar conformações globulares contendo estrutura secundária, quando em ambiente confinado. A desnaturação de uma cadeia peptídica, que resultaria na desnaturação protéica, tem uma menor chance de ocorrer neste espaço confinado devido ao volume excluído.

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) o volume excluído para uma macromolécula é o volume efetivo que uma macromolécula, em solução diluída, exclui das demais. Assim, o confinamento de uma proteína atuaria excluindo algumas configurações expandidas da cadeia desnaturada, deslocando o equilíbrio do estado desnaturado para o estado nativo. Uma implicação deste conceito é que o confinamento de proteínas em espaços pequenos e inertes resultaria no aumento da estabilidade e,

possivelmente, da taxa de enovelamento destes sistemas. Um efeito direto do volume excluído junto com a aglomeração de macromoléculas num meio de confinamento molecular, como o meio intracelular (Figura 1.4) é a redução do volume acessível a outras macromoléculas (Figura 1.5). O resultado é o aumento da concentração efetiva das macromoléculas, que, por sua vez, altera as taxas e o equilíbrio das reações, afetando, particularmente, as constantes de dissociação e favorecendo a associação entre macromoléculas na formação de complexos (Wieczorek e Zielenkiewicz, 2008).

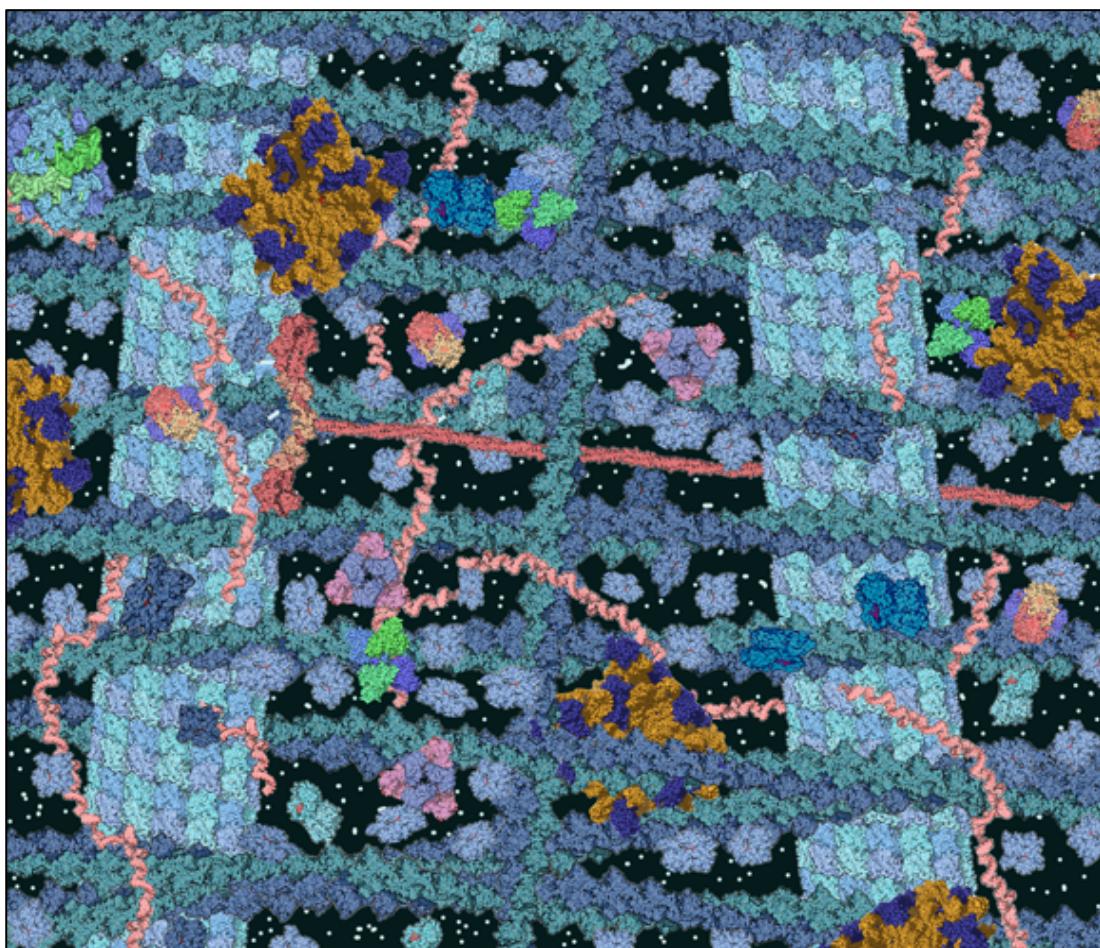


Figura 1.4 Concepção artística do citosol, mostrando microtúbulos (azul claro), filamentos de actina (azul escuro); ribossomos (amarelo e rosa), proteínas solúveis (azul claro), kinesina (vermelho), pequenas moléculas (branco) e RNA (rosa). Autor: Tim Vickers, disponibilizada pela licença *Creative Commons*.

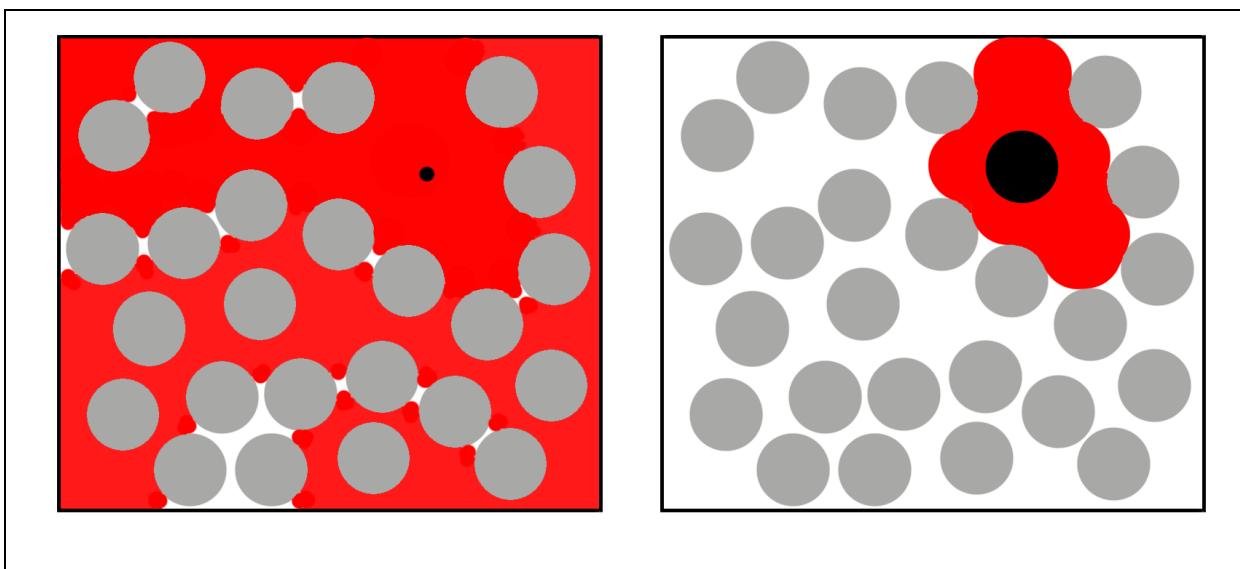


Figura 1.5 Ilustração do volume disponível para o solvente (vermelho) para duas moléculas de diferentes tamanhos (preto) em um compartimento contendo alta concentração de macromoléculas (esferas cinzas). À esquerda uma molécula pequena pode explorar um volume superior ao da molécula grande à direita. Esta redução de volume acessível amplifica a concentração efetiva das macromoléculas em soluções concentradas – um efeito conhecido como aglomeração macromolecular (*macromolecular crowding*). Autor: Tim Vickers, disponibilizada pela licença *Creative Commons*.

1.5.1 Abordagens convencionais para imobilização de proteínas e enzimas:

Existe uma longa trajetória científica sobre imobilização de enzimas usando suportes sólidos, como a sílica porosa sol-gel, desenvolvida por muitos grupos de pesquisa. Entretanto, empregando os métodos convencionais de imobilização (sol-gel, *cross-linking*, polimerização), a atividade específica de enzimas imobilizadas é normalmente menor, ou muito menor, que a das enzimas em solução anterior à imobilização. O encapsulamento de enzimas por sílica sol-gel com estrutura de poros fechados, geralmente apresenta problemas de transporte de massa, tanto para o substrato enzimático quanto para os produtos (Heller e Heller, 1998; Flounders *et al.*, 1999; Bhatia *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, o *cross-linking* e a polimerização geralmente resultam em ligações cruzadas intra e intermoleculares, deteriorando a conformação funcional da enzima (Havens e Rase, 1993; Lejeune e Russell, 1996; Mulchandani, Mulchandani *et al.*, 1999; Karyakin, Kotelnikova *et al.*, 2002; Jia, Zhang *et al.*, 2003). Por exemplo, em 1985 Mosbach e colaboradores publicaram um trabalho pioneiro sobre a captura da enzima glicose oxidase (GOX) em sílica porosa coberta por poli-

siloxano. Entretanto, a atividade específica retida após a imobilização não era maior do que 5.0% (Glad *et al.*, 1985).

A enzima organosfósforo hidrolase (OPH) tem sido amplamente investigada para bio-sensoramento e descontaminação de agentes neurotóxicos, como os gases dos nervos. As matrizes de imobilização para a OPH incluem o método de sol-gel (Flounders *et al.*, 1999), poliuretano (Havens e Rase, 1993; Lejeune e Russell, 1996; Lejeune, Wild *et al.*, 1998), nylon (Caldwell e Raushel, 1991), e a membrana nafion (Mulchandani, Mulchandani *et al.*, 1999; Karyakin, Kotel'nikova *et al.*, 2002; Jia, Zhang *et al.*, 2003). Entre estas matrizes, o poliuretano pode reter cerca de 50% da OPH ainda ativa. Em contrapartida, a OPH em membrana nafion, ambientada em solução aquosa, é mantida a apenas 13% de sua atividade inicial. Em geral, a baixa eficiência de imobilização dos métodos convencionais deve-se a menor área de superfície dos suportes, tamanho de poro reduzido, poros não abertos, e outras condições como *cross-linking* e polimerização, resultando na desnaturação da proteína e perda de atividade.

1.5.2 Sílica mesoporosa funcionalizada

O desenvolvimento de novos materiais permitiu o uso de suportes sólidos porosos para imobilização de proteínas via encapsulamento, aprisionamento e ligação covalente, com aplicações úteis em biotecnologia, biocatálise, sistemas de *protein-delivery* e sensoramento (Weitkamp *et al.*, 2001; Penn *et al.*, 2003; Kane e Stroock, 2007; Rusmini *et al.*, 2007; Slowing *et al.*, 2007a; Slowing *et al.*, 2007b; Trewyn *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). A imobilização em um suporte nanoporoso pode amplificar a estabilidade enzimática mantendo a atividade e seletividade próximas aos níveis do ambiente nativo (Eggers e Valentine, 2001; Hanefeld *et al.*, 2009). Uma série de suportes têm sido descrita para proteínas, cada uma tendo suas vantagens e desvantagens associadas para o uso em biocatálise (Hudson *et al.*, 2008).

A sílica mesoporosa é um suporte inerte que pode ser quimicamente modificado através da adição de grupos funcionais diversos. Estes suportes podem ser sintetizados com tamanhos de poro de 2 nm à 50 nm de diâmetro, cujas dimensões são ideais para imobilizar uma variedade de enzimas com dimensões bem distintas. O suporte de sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) tem atraído interesse considerável como matriz de imobilização de enzimas, devido à estrutura mesoporosa ampla, rígida e uniforme, com poros abertos e de tamanho controlado (Figura 1.6). O ambiente promove interação favorável fornecida por grupos funcionais ajustáveis, mimetizando o efeito do confinamento celular e favorecendo conformações ativas de proteínas. Além disso, pode facilitar o transporte de massa do substrato e produto da reação enzimática, e ainda proteger a enzima já que o poro é pequeno o suficiente para eliminar qualquer bactéria invasora (pelo menos 2 micrômetros em tamanho). (Liu *et al.*, 2000; Deere *et al.*, 2002; Chenghong e Et Al., 2006; Hudson *et al.*, 2008). Em conjunto, estas características permitem a obtenção de densidade muito maior de proteínas, atividade e estabilidade amplificadas quando comparado com suportes convencionais de sílica mesoporosa.

Resumidamente, a sílica mesoporosa possui pelo menos as seguintes características:

- 1) Estrutura uniforme, rígida, com poro aberto de tamanho bem definido de dezenas de nanômetros, permitem ao substrato acesso mais eficiente e melhor difusão do produto;
- 2) Grande área de superfície, que pode ser maior que $500\text{m}^2\text{g}^{-1}$, com superfície de poro ordenada, contabilizando >95% do total da área de superfície;
- 3) Quando funcionalizada, cerca de 5×10^{18} grupos de silanol por m^2 na superfície do poro;
- 4) Alguma cobertura de grupos funcionais utilizando espaçadores de cadeia carbônica podem ser conectados aos grupos silanol.

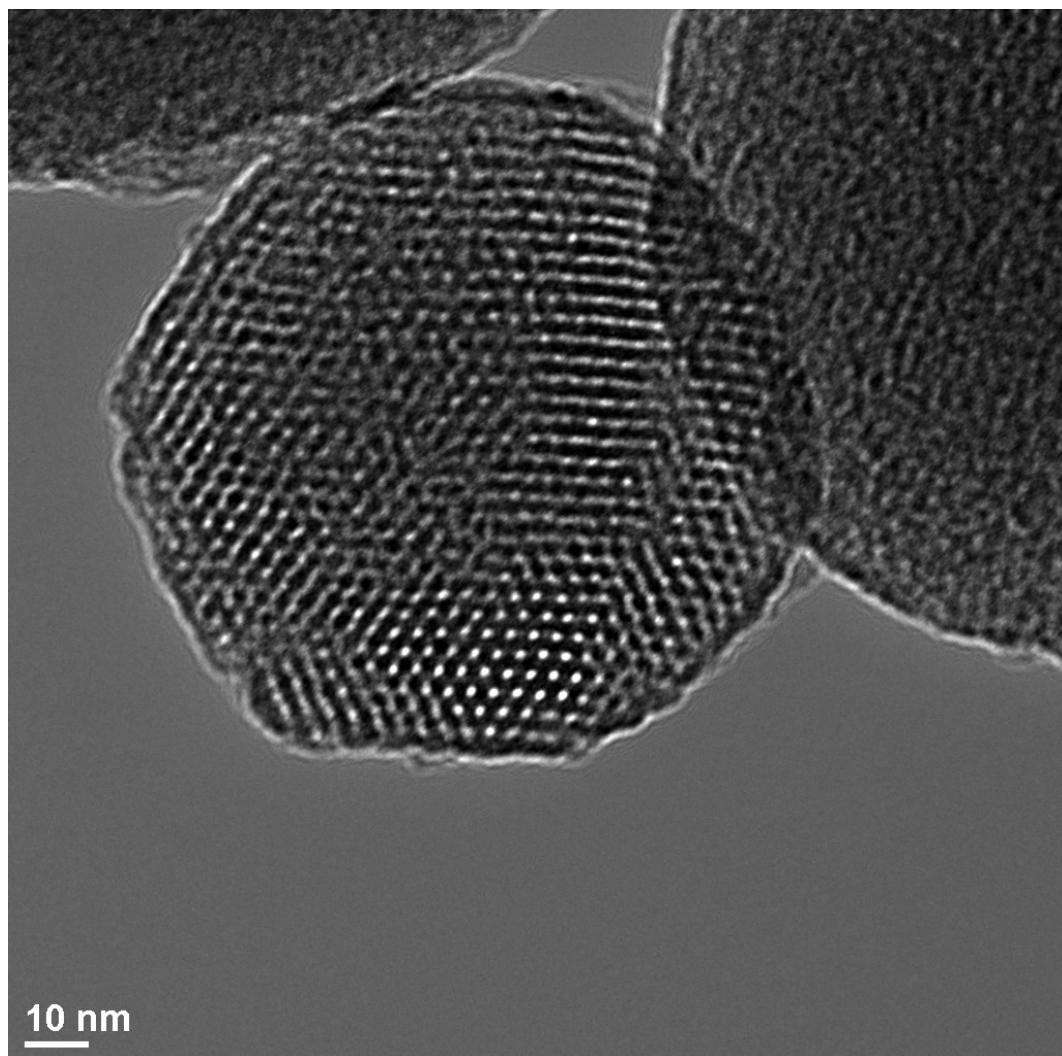


Figura 1.6 Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula de sílica mesoporosa. Autor: Dr. Victor Lin, Iowa State University. Disponibilizada pela licença *Creative Commons*.

Através da funcionalização com diferentes grupos químicos, a sílica mesoporosa pode ser manipulada, o que permite controlar interações eletrostáticas, ligações hidrogênio, e contatos hidrofóbicos com resíduos na superfície das moléculas de proteínas. Além disso, o planejamento da adsorção de moléculas de proteínas carregadas (hidrofóbicas e hidrofilicas regionalmente) pode beneficiar-se da manipulação do efeito hidrofóbico através da modificação química da superfície de sílica com a adição de cadeias alifáticas. As cadeias funcionam como extensões (*linkers*) e os grupos funcionais desejados são adicionados nas extremidades livres, sendo os mais comumente utilizados NH₂, COOH, HS e HO.

De acordo com a natureza e densidade dos grupos funcionais selecionados, a FMS apresenta volume excluído controlado, e grupos funcionais que interagem seletivamente com proteínas de interesse. FMS com poros de tamanho reduzido podem exibir uma alta afinidade por proteínas, resultando no sequestro destas moléculas da solução, permitindo o confinamento destas dentro do volume excluído funcionalizado. Se propriamente desenhado (tipo do grupo funcional, cobertura, e espaçador), o confinamento em nanoporos promove a estabilização do estado nativo de proteínas de modo similar ao meio celular.

De fato, ambas as matrizes de sílica (funcionalizada e não-funcionalizada) foram recentemente testadas para a imobilização de enzimas (Glad *et al.*, 1985; Braun *et al.*, 1990; Schmidt-Steffen e Staude, 1992; Reetz *et al.*, 1995; Bhatia *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). Entretanto, por causa do pequeno diâmetro do poro escolhido, limitando o acesso do substrato, ou não funcionalização, foram observadas baixa atividade enzimática e baixa velocidade de reação. Estes estudos reportaram apenas a atividade enzimática aparente, dado que a quantidade de enzima imobilizada era desconhecida, com isso, a atividade específica das enzimas imobilizadas foi pouco discutida.

As vantagens dos suportes mesoporosos sobre os materiais convencionais (como matrizes de sílica em base sol-gel) para a imobilização de enzima foram demonstradas por vários grupos (Deere, Magner *et al.*, 2002; Lei, Chenghong, Shin, Yongsoon *et al.*, 2002; Luckarift, Spain *et al.*, 2004; Chenghong e Et Al., 2006; Hudson, Cooney *et al.*, 2008; Chen, Lei *et al.*, 2009; Liu, Shin *et al.*, 2000; Vinu, Miyahara *et al.*, 2006; Vinu, Miyahara *et al.*, 2007; Hanefeld, Gardossi *et al.*, 2009; Ispas, Sokolov *et al.*, 2009). Em particular, Lei e coautores (Lei *et al.*, 2002) mostraram que a atividade enzimática e a estabilidade de algumas enzimas podem ser ampliadas de forma significativa através da imobilização das mesmas em suportes nanoporosos apropriadamente planejados.

Em uma série de trabalhos Lei e co-autores (Lei, Chenghong, Shin, Yongsoon *et al.*, 2002; Lei, Shin *et al.*, 2006; Lei, Shin *et al.*, 2007; Lei, Valenta *et al.*, 2007; Lei, Soares *et al.*, 2008; Chen, Lei *et al.*, 2009) aprisionaram três diferentes enzimas em FMS com tamanhos de poro grandes, de dezenas de nanômetros e demonstraram que todas exibem atividade aumentada em comparação com as enzimas em solução. Demonstraram ainda que a atividade enzimática específica pode ser aumentada ou reduzida significativamente ao mudar a densidade de proteína aderida a superfície da FMS. Além disso, descobriram que a FMS e agentes caotrópicos podem agir em sinergia para aumentar a atividade da enzima. Por fim, descobriram evidências experimentais indicando que existem modificações conformacionais favoráveis ocorrendo na FMS (Chen *et al.*, 2009). Lei e colaboradores demonstraram que a imobilização da metaloenzima organofósforo hidrolase (OPH) em FMS aumenta a atividade específica em 200% quando comparada com a enzima em solução (Lei *et al.*, 2002). A imobilização de outras enzimas em FMS corrobora com estes achados e demonstra ainda que a FMS com tamanho do poro e grupos funcionais apropriados pode resultar em aceleração da cinética, melhora substancial da atividade enzimática, e estabilidade para as enzimas alvo, comparado com os meios convencionais de imobilização enzimática (Lei *et al.*, 2007a; Lei *et al.*, 2008).

A quantidade máxima de enzima adsorvida em um material mesoporoso varia com o valor do pH, força iônica, diâmetro do poro, volume do poro, característica da superfície, ponto isoelétrico da enzima, morfologia, e tamanho da partícula (Deere *et al.*, 2004; Goradia *et al.*, 2005; Essa *et al.*, 2007). A adsorção de proteínas pode ser manipulada via diferentes tipos de interação: forças eletrostáticas, ligações hidrogênio, forças de van der Waals, entropia conformacional, e contatos hidrofóbicos (Hudson *et al.*, 2008; Hanefeld *et al.*, 2009). Além disso, a adsorção a superfície pode ser amplificada pelo ganho de entropia conformacional, desenovelamento da proteína na superfície, troca do pH para próximo de ponto isoelétrico e

ligação específica a íons (Haynes e Norde, 1995). A natureza da superfície sólida, incluindo sua hidrofobicidade e densidade de carga, exerce forte efeito na estrutura e conformação da camada de proteína (Kane e Stroock, 2007; Hudson *et al.*, 2008; Hanefeld *et al.*, 2009).

Modificações da superfície de sílica mesoporosa com grupos funcionais compatíveis com os encontrados na superfície de proteínas, podem modular estas interações e influenciar a densidade final e atividade da proteína imobilizada (Chong e Zhao, 2004; He *et al.*, 2008). Geralmente, as interações iônicas são as forças mais importantes que, juntas com o efeito hidrofóbico, conduzem a adsorção de proteínas a superfícies minerais, porém, a importância relativa destas interações em um dado sistema depende de detalhes da estrutura de proteínas e da superfície em particular (Deere *et al.*, 2002; Vinu *et al.*, 2003; Vinu *et al.*, 2004; Goradia *et al.*, 2005; Katiyar, Amit *et al.*, 2005; Katiyar, A. *et al.*, 2005; Vinu *et al.*, 2005; Chenghong e Et Al., 2006). Todavia é difícil saber a contribuição exata de cada diferente interação na interface para a adsorção de proteínas na superfície de FMS no nível microscópico. Isso porquê a natureza amorfa das paredes de SiO₂ torna muito difícil extrair informação estrutural em resolução atômica partindo apenas de dados experimentais (Liu *et al.*, 2000; Weitkamp *et al.*, 2001; Chenghong e Et Al., 2006). Ainda assim a caracterização molecular de tais interações de interface é um passo essencial para o planejamento racional das propriedades da superfície de FMS que levarão a imobilização eficiente de enzimas para aplicações ambientais e industriais.

O confinamento da OPH em um gel de sílica mesoporoso fornece alta afinidade para moléculas de proteína e cria um nano ambiente excepcionalmente favorável para a imobilização, com alta estabilidade enzimática e aumento da atividade específica, contudo, este mesmo efeito não pode ser reproduzido em gel de sílica não funcionalizado, lançando as seguintes questões:

1) Quais são os eventos moleculares que ocorrem com a enzima, nesta condição de confinamento, que induzem esse notável aumento na atividade específica?

2) Como as interações não-específicas e específicas entre as moléculas do gel de sílica funcionalizado conseguem influenciar as reações e eventos que definem a atividade catalítica da OPH?

A hipótese levantada neste trabalho é a de que a atividade enzimática e a estabilidade protéica podem ser amplificadas de forma significativa em suportes nanoporosos apropriadamente planejados, os quais funcionariam como nanoambientes confinados e interativos para promover uma mudança conformacional favorável para a proteína aprisionada. Até então, foi demonstrado que o confinamento de enzimas em suportes nanoporosos pode, ao mesmo tempo, estabilizar e induzir a amplificação das taxas de reação catalíticas comparadas com a enzima em solução (Lei *et al.*, 2002; Minton, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Fundamentados em conceitos de mecânica estatística e física de polímeros, Zhou e Dill atribuíram a estabilização à restrição do espaço configuracional para estados nativos, produto da redução da entropia dos estados desnaturados (Zhou e Dill, 2001; Zhou, 2004). Particularmente os estudos de Lei em FMS têm desvendado os efeitos do tamanho do poro e da densidade de cobertura e tipo do grupo funcional, na atividade específica da enzima OPH confinada (Lei *et al.*, 2002; Chenghong e Et Al., 2006; Chen *et al.*, 2009). Apesar do progresso na compreensão do efeito do confinamento na estabilidade de proteínas, seu papel na atividade enzimática permanece pouco entendido.

Através de colaboração com o grupo de Lei, no *Pacific Northwest National Laboratory* (PNNL), tomamos como modelo o sistema OPH-FMS para investigar os efeitos produzidos pelo confinamento molecular na dinâmica do dímero da enzima OPH. A partir deste modelo, pretende-se compreender os parâmetros que definem o comportamento

diferenciado de biomoléculas em diferentes microambientes, bem como em ambientes confinados. Em particular, pretende-se contribuir para o desenvolvimento de biosensores e biocatalizadores.

Neste contexto, desenvolvemos uma série de modelos moleculares e ferramentas computacionais visando emular as condições de confinamento de biomoléculas. Em particular, estudamos a enzima OPH capturada em FMS, buscando indícios sobre a origem molecular da modulação da atividade enzimática e o entendimento de como o confinamento afeta as taxas de reação catalítica de enzimas e como elas podem ser moduladas, seja modificando as proteínas ou a FMS para amplificar a atividade e estabilidade enzimática. Através de simulações de DM, investigamos o comportamento do dímero de OPH nos modelos de confinamento, tendo como controle a simulação da OPH em solução aquosa. Examinamos o complexo enzima-substrato em solução livre e confinada em modelo de FMS, e a influência da adesão ao suporte nanoporoso nas propriedades de difusão e orientação da enzima. Desta forma, técnicas de análise de flexibilidade estrutural foram empregadas no sentido de se quantificar as diferentes amplitudes dos movimentos exibidos pelos sistemas simulados. Os movimentos de grande amplitude, na escala de nanossegundos, foram identificados através da técnica de dinâmica essencial (Garcia, 1992; Amadei *et al.*, 1993; Stepanova, 2007).

As simulações computacionais realizadas nesta tese fornecem informações em nível molecular dos mecanismos que definem as reações enzimáticas em ambientes de confinamento dando indícios sobre:

- 1) Os movimentos que contribuem globalmente para o processo de catálise enzimática;
- 2) A flutuação das conformações, e movimentos rotacionais da proteína resultantes da restrição espacial imposta pela FMS;

- 3) Os efeitos locais da química da superfície, tamanho do nanoporo e morfologia, tipo de espaçador, tamanho do espaçador e sua flexibilidade, bem como a influencia do tipo de grupo funcional e cobertura da superfície da FMS na dinâmica e no mecanismo de reação da enzima confinada;
- 4) A contribuição relativa de diferentes interações químicas (eletrostáticas, ligações hidrogênio, van der Waals) para a ligação e estabilização da enzima OPH confinada em FMS;
- 5) O modo de ligação das enzimas com a FMS
- 6) O mecanismo pelo qual o ambiente de confinamento influencia a dinâmica da enzima para o incremento de estabilidade e atividade;
- 7) Os efeitos da adesão ao suporte nanoporoso sobre a difusão e orientação da enzima e as implicações para a taxa de encontro enzima-substrato e a atividade enzimática

Esta Tese está dividida em 06 Capítulos seguidos de uma conclusão geral. O capítulo 01 é esta introdução geral, o capítulo 02 lista os objetivos, e o capítulo 03 descreve os principais métodos utilizados. Os resultados são apresentados nos capítulos 04 a 06. Em seguida é apresentada a conclusão geral e perspectivas, seguida de um apêndice contendo descrições das ferramentas computacionais desenvolvidas, arquivos de parâmetros de simulação, protocolos e arquivos de entrada de programas, e a produção bibliográfica realizada durante o doutorado.

2 : Objetivos

2.1 Geral:

Criar modelos computacionais para mimetizar o confinamento de proteínas em superfícies funcionalizadas, para contribuir no desenvolvimento de biosensores e filtros desintoxicadores de alta densidade.

2.2 Específicos:

-Estabelecer parametrização para campo de forças para simulações de matrizes de sílica funcionalizadas por proteínas

-Avaliar diferentes protocolos de simulação para a enzima funcionalizada, nos estados livre e complexada ao substrato

-Avaliar a estabilidade estrutural e a dinâmica da organofosforado hidrolase funcionalizada

-Avaliar possíveis efeitos do confinamento na atividade da OPH e na sua ligação com o substrato organofosforado

-Desenvolver softwares para a construção de nanoporos realistas de sílica.

3 Métodos

3.1 Campo de Forças

A representação física de um sistema, em simulações computacionais, pode ser feita através de um campo de forças, definido como uma função de potencial associada a um conjunto de parâmetros. O uso de campo de forças permite a descrição de um sistema de muitas partículas através da sobreposição de termos simples, que descrevem a interação entre tais partículas. Tal tratamento permite o estudo de sistemas contendo centenas ou milhares de átomos, onde um conjunto de funções potenciais empíricas é calibrado a partir de informações empíricas e cálculos de mecânica quântica, usando pequenas moléculas modelo (Van Gunsteren e Berendsen, 1990; Jorgensen *et al.*, 1996; Kahn e Bruice, 2002; Mackerell, 2004; Lins e Hünenberger, 2005; Suardiaz *et al.*, 2006; Van Gunsteren e Dolenc, 2008; Van Gunsteren *et al.*, 2008; Ponder *et al.*, 2010).

A escolha de um campo de força depende das propriedades do sistema de interesse (Wang *et al.*, 2003; Martin, 2006; Marrink *et al.*, 2007; Guvench e Mackerell, 2008; Kirschner *et al.*, 2008; Monticelli *et al.*, 2008; Guvench *et al.*, 2009). Algumas aplicações requerem campos de força mais refinados do que outras, além disso, deve existir um equilíbrio entre os níveis de precisão ou refinamento para diferentes partes de um modelo molecular. Por outro lado o esforço computacional gasto na descrição detalhada ou exata dos cálculos em uma parte do sistema pode ser perdida em função da distorção causada pelas partes menos precisas na descrição do modelo (ex. acoplamento térmico, precisão do hardware, propagação de erro em cálculos paralelos) (Lippert *et al.*, 2007). Em outras palavras, um campo de forças que tem um potencial muito complexo para representar as ligações químicas, os ângulos, sendo muito preciso em termos de reproduzir as geometrias e as freqüências vibracionais, não conseguirá descrever bem as interações intermoleculares complexas se o modelo de cargas não apresentar alta qualidade, por exemplo.

Em comum, todos os campos de forças possuem uma função de energia potencial em que aparecem termos (em geral harmônicos) para descrever ligações covalentes entre pares de átomos e ângulos entre ligações químicas vizinhas, um termo rotacional para descrever rotações ao redor de ligações e termos que descrevem interações entre átomos não ligados, que levam em conta a impenetrabilidade das nuvens eletrônicas, as forças de dispersão e indução dipolar, assim como atrações e repulsões eletrostáticas. Neste trabalho empregamos os campos de forças GROMOS (Oostenbrink *et al.*, 2004; Oostenbrink *et al.*, 2005a), AMBER99 (Wang *et al.*, 2000), e CHARMM (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010) para descrever as interações entre os átomos da proteína, dos substratos e dos complexos. Para a sílica usamos o campo de forças BKS (Van Beest *et al.*, 1990; Kramer *et al.*, 1991). A escolha do modelo solvente, água, foi coerente com a utilização do campo de forças em cada caso. A Tabela 3.1 lista a relação completa de campos de forças, modelo de água e programas usados neste trabalho.

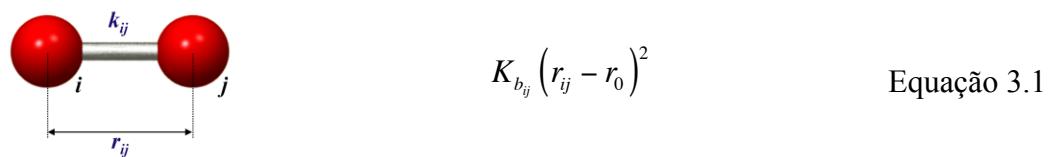
Tabela 3.1 Descrição dos sistemas simulados, campos de forças, modelos de água e programas utilizados.

Sistema	Campo de forças	Modelo de água	Programa (versão)
Proteína	AMBER 99	SPC/E	NWChem (4.5)
Proteína	GROMOS 53a6	SPC	GROMACS (4.03– 4.07)
Proteína + Sílica	CHARMM 27	TIP3P	NAMD (2.6)
Sílica	BKS	-----	NAMD-Lite (2.03)

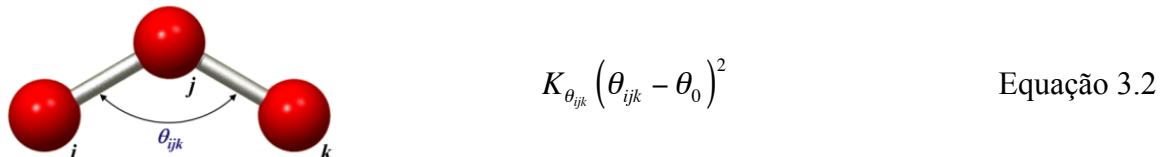
Num campo de forças qualquer, é possível separar as funções em dois grupos: o primeiro contendo quatro termos para as descrições dos átomos ligados, até seus terceiros vizinhos; o segundo contendo dois termos para as interações entre os átomos não ligados diretamente (átomos de uma mesma molécula que estão além do terceiro vizinho) e para os não-ligados efetivamente em interações soluto-solvente, solvete-solvente, inibidor-proteína, proteína-superfície, entre diferentes cadeias em uma proteína, etc.

3.1.1 Grupo 1: Átomos ligados

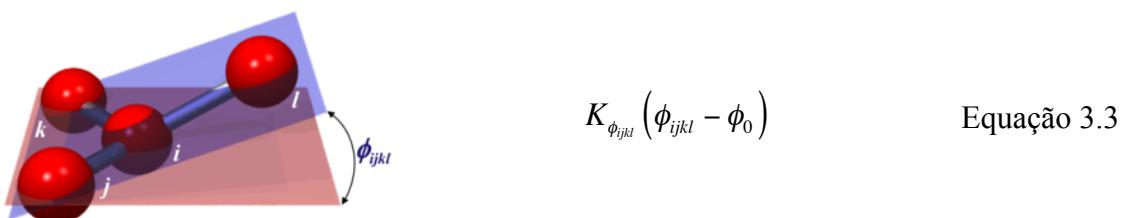
A reprodução da ligação química e do movimento vibracional entre um par de átomos $i-j$ é descrita por um **potencial harmônico linear** na forma da Equação 3.1, que obedece a lei de Hooke para um sistema de massas unidas por molas, em que K_b é a constante de Hooke, r_{ij} é o comprimento instantâneo da ligação e b_0 é o comprimento de equilíbrio da ligação.



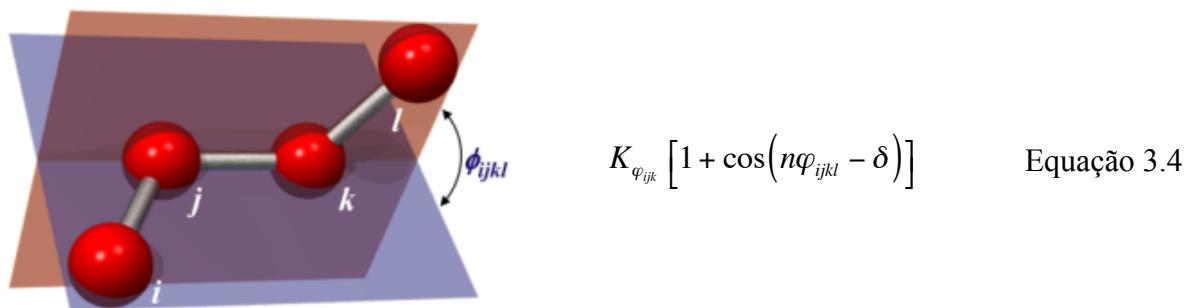
O ângulo formado por três átomos ligados consecutivamente (i, j, k) é dado por um **potencial harmônico angular** na forma da equação 3.2, em que K_θ é a constante de Hooke, o θ ângulo entre as ligações e θ_0 é o ângulo de equilíbrio. Esse potencial penaliza os desvios de ângulos de ligações.



Entre quatro átomos ligados haverá a formação de uma estrutura tridimensional descrita por um **potencial harmônico** (potencial diedral impróprio), que controla o ângulo entre os planos formados pelos átomos $i-j-k$ e $j-k-l$ na forma da Equação 3.3, em que K_ϕ é a constante de Hooke, ϕ o ângulo entre os planos e ϕ_0 é o ângulo de equilíbrio. Esse potencial é importante para manter a planaridade de certas moléculas, ou a estrutura tetraédrica de átomos com quatro ligações.



A rotação em torno das ligações químicas é modelada por um **potencial de torção** (potencial do tipo diedro próprio) que descreve a simetria rotacional das barreiras e mínimos de energia para a torção de cada ligação química com liberdade de rotação na forma da equação 3.4, em que δ é uma constante que define a altura da barreira de rotação, n é o número de mínimos da função, ϕ é a variação angular e δ é o ângulo de diferença de fase (180° ou 0°).



3.1.2 Grupo 2: Interações entre átomos não ligados.

As interações entre átomos não ligados diretamente (Figura 3.1) são representadas pelos termos de potencial de Lennard-Jones e pelo potencial de Coulomb. A contribuição dos átomos ligados consecutivamente até o terceiro vizinho está implícita nos potenciais do primeiro grupo. Portanto em alguns campos de forças a interação até o terceiro vizinho é desprezada. Entretanto nos campos de forças mais modernos, a interação com o terceiro vizinho (interação do tipo 1-4) é contabilizada, porém com um potencial reduzido.

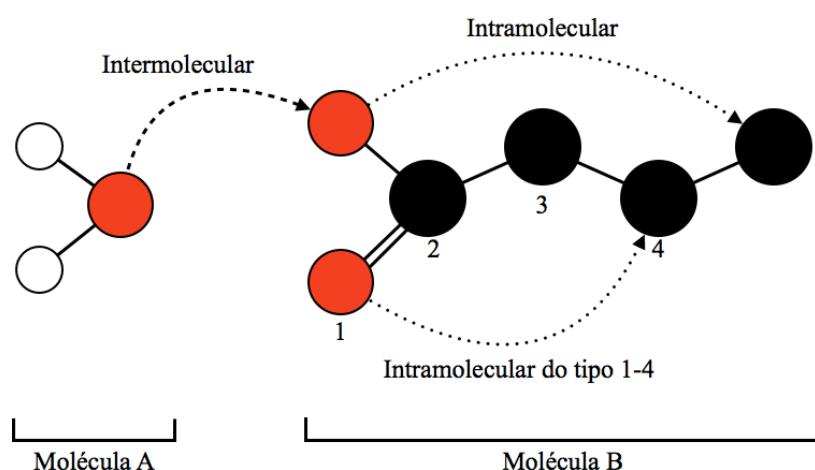
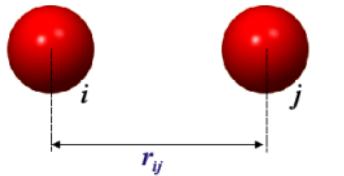


Figura 3.1 Interações intermoleculares (linhas tracejadas) e intramoleculares (linhas pontilhadas). Em geral, os campos de força de mecânica clássica desconsideram as interações do tipo não-ligadas até o terceiro vizinho (indicado com os índices 1 a 4). A contribuição destas interações estaria implícita nos termos de potencial: ligação, ângulo e diedro. Alguns campos de forças, entretanto, definem um potencial modificado para o par de átomos 1 e 4.

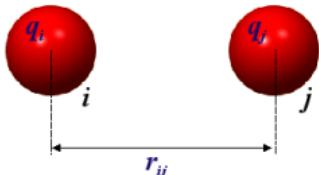
O potencial de Lennard-Jones (Jones, 1924) na forma da equação 3.5 comprehende os termos de van der Waals e de dispersão de London, sendo o primeiro repulsivo e o segundo atrativo (Figura 3.1), em que para um dado átomo i é computada a sua energia de interação com o átomo j . Os parâmetros $C^{(12)}$ e $C^{(6)}$ dependem dos átomos envolvidos, e r_{ij} é a distância entre eles.



$$\frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6}$$

Equação 3.5

A energia potencial eletrostática é simulada utilizando-se o potencial de Coulomb na forma da equação 3.6, em que q_i representa a carga do átomo i , q_j a carga do átomo j , ϵ_0 a permissividade elétrica do vácuo, ϵ a constante dielétrica do meio e r_{ij} a distância entre os átomos i e j .



$$\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}}$$

Equação 3.6

A função energia potencial total é dada pelo somatório de todas as funções anteriores. Desta forma, a função energia potencial para um sistema molecular formado por N átomos, com vetores posição \mathbf{r}_i ($i = 1, 2, \dots, N$ átomos), é geralmente descrita por:

$$V_{r_i} = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K_{b_{ij}} (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K_{\theta_{ijk}} (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 + \sum_{n=1}^{N_\phi} \frac{1}{2} K_{\phi_{ijkl}} (\phi_{ijkl} - \phi_0)^2 + \sum_{n=1}^{N_q} \frac{1}{2} K_{\varphi_{ijk}} [1 + \cos(n\varphi_{ijk} - \delta)] + \sum_{i < j} \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}}$$

Equação 3.7

em que os três primeiros termos são os potenciais harmônicos que descrevem as ligações químicas da molécula, N_θ ângulos entre pares de ligações consecutivas e N_ϕ os ângulos diedrais impróprios, respectivamente. Esses termos determinam como a energia varia alterando-se os valores dos comprimentos r_{ij} e dos ângulos θ_{ijk} e ϕ_{ijkl} de equilíbrio das ligações químicas. O quarto termo é o potencial de torção somado sobre os N_ϕ ângulos diedrais próprios, para as ligações químicas com liberdade de rotação de 360° . O termo seguinte corresponde aos potenciais de Lennard Jones e Coulomb somados sobre todos os pares de átomos i e j excluindo-se os primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados, cujas interações já estão descritas pelos termos harmônicos.

Os parâmetros $K_b, b_0, K_\theta, \theta_0, K_\phi, \phi_0, K_\psi, \psi_0, n, \delta$, as constantes $C_{ij}^{(12)}$ e $C_{ij}^{(6)}$ e as cargas atômicas parciais q_i e q_j , para proteínas, ácidos nucléicos, alguns açúcares e alguns inibidores enzimáticos são encontrados na literatura.

3.2 Otimização das Geometrias Moleculares

As forças resultantes sobre determinados átomos em uma configuração inicial para uma estrutura molecular podem ser demasiadamente grandes, levando a grandes acelerações locais o que traria um enorme ruído ao sistema inicial, invalidando a simulação. Portanto, torna-se necessário empregar um protocolo de otimização de geometria por minimização de energia do sistema para eliminar as tensões locais, ajustando distâncias de ligações, espaços não preenchidos na solvatação do sistema, sobreposição de átomos, etc.

Os métodos de minimização de energia podem ser divididos em diferentes classes dependendo da ordem da derivada empregada para localizar o mínimo na superfície de energia. Os métodos de ordem zero são aqueles que usam apenas a função de energia para identificar regiões de mínimos através de um procedimento busca. Entre as técnicas de

primeira derivada, existem diversos procedimentos, como o método do máximo declive (*steepest descent*) e do gradiente conjugado, que fazem uso do gradiente da função. Métodos de segunda derivada, como o algoritmo Newton-Raphson usam a matriz hessiana para localizar o mínimo. Nesta tese, foram empregados apenas métodos de primeira derivada os quais são descritos brevemente a seguir, e com a convergência ilustrada na Figura 3.2.

3.2.1 Método do Máximo Declive (Steepest Descent)

Dada a equação da força resultante sobre cada átomo do sistema:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\delta V(\{\mathbf{r}_i\})}{\delta \mathbf{r}_i} \quad \text{Equação 3.8}$$

que é proveniente do gradiente da energia potencial total, o método do máximo declive é descrito por:

$$\mathbf{r}_{(i,n+1)} = \mathbf{r}_{i,n} + k_n \left(\frac{\mathbf{F}_{i,n}}{|\mathbf{F}_{i,n}|} \right) \quad \text{Equação 3.9}$$

em que \mathbf{r} representa a nova posição do átomo i no passo $n+1$ e k_n o parâmetro de ajuste do tamanho do passo. O que se obtém ao final da minimização é um conjunto de coordenadas \mathbf{r} que representa um mínimo local de energia ao tornar a força próxima à zero. Em cada passo, a diferença entre a energia potencial atual e a anterior é verificada, se esta for menor do que um valor estipulado ΔV , o cálculo é interrompido. Para $\Delta V = 10^{-2} \text{ kcal/mol}$ são eliminadas as deformações de ligações, ângulos e em esferas de van der Waals.

Por ser um método de primeira derivada, converge lentamente nas proximidades do mínimo, sendo empregado como procedimento introdutório para estruturas distantes do mínimo de energia, seguido de um algoritmo mais avançado como o gradiente conjugado.

3.2.2 Método do Gradiente conjugado

O algoritmo do gradiente conjugado acumula a informação da função de energia, de uma interação para a outra. Este dado é utilizado como informação adicional para calcular a

nova direção do vetor do procedimento de minimização. Desta forma, cada passo sucessivo refina a direção apontando para o mínimo. O esforço computacional e necessidade de armazenamento são maiores do que para o máximo declive, porém o gradiente conjugado é o método de escolha para sistemas grandes. O tempo computacional elevado e maior tempo por interação é compensado pela convergência mais eficiente ao mínimo.

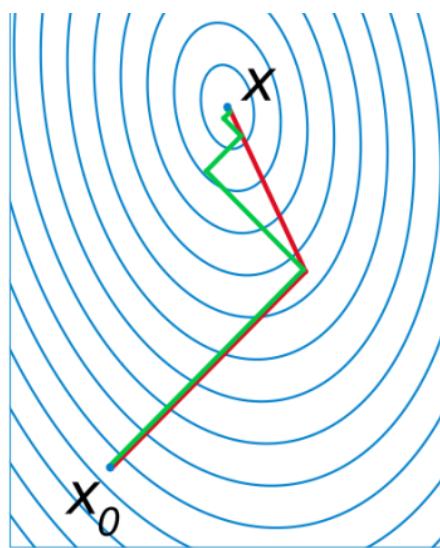


Figura 3.2 Comparação da convergência do método de gradiente com tamanho de passo ótimo (em verde) e o gradiente conjugado (em vermelho) para minimizar uma função quadrática associada com um sistema linear. Autor: Oleg Alexandrov, disponibilizada pela licença Creative Commons.

Em resumo, a escolha do método de minimização depende de dois fatores: o tamanho do sistema e o estado atual da otimização. Para estruturas distantes do mínimo, como regra geral, o método do máximo declive é o melhor minimizador a ser empregado por 100-1000 interações. A minimização pode ser completada para convergir com o gradiente conjugado. O valor escolhido como critério de convergência depende do objetivo da minimização. Para as simulações de dinâmica molecular de sistemas de proteínas, a diferença de 0.01 kcal/mol entre passos consecutivos é suficiente.

3.3 Dinâmica Molecular

Na simulação por Dinâmica Molecular são resolvidas as equações de Newton. Inicialmente calcula-se a força \mathbf{F}_i que atua sobre cada partícula i de um sistema a partir da

primeira derivada da função energia potencial $\mathbf{V}(\{\mathbf{r}_i\})$ oriunda do campo de forças, que descreve a interação entre as partículas:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla V(\{\mathbf{r}_i\}) \quad \text{Equação 3.10}$$

Pela segunda lei de Newton, a aceleração \mathbf{a} é obtida dividindo a força \mathbf{F}_i pela massa m_i da partícula:

$$\ddot{\mathbf{r}}_i = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \quad \text{Equação 3.11}$$

Em seguida, a propagação das posições em incrementos de tempo Δt é determinada substituindo-se as acelerações em um algoritmo integrador. O algoritmo de Verlet (Verlet, 1967) usa as posições \mathbf{r}_i e as acelerações $\ddot{\mathbf{r}}_i$ no tempo t e as posições no tempo $t - \Delta t$ para prever as posições no tempo $t + \Delta t$, onde Δt é o passo de integração. A partir de uma expansão de Taylor de terceira ordem em $\mathbf{r}(t+\Delta t)$ e $\mathbf{r}(t-\Delta t)$, nos obtemos

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \ddot{\mathbf{r}}_i \Delta t^2 \quad \text{Equação 3.12}$$

As velocidades são necessárias para o cálculo da energia cinética, que somada à energia potencial dão a energia total do sistema, como também para o cálculo da temperatura, que é definida em termos da energia cinética média. As velocidades são obtidas com o algoritmo de Verlet para a propagação das velocidades

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad \text{Equação 3.13}$$

com erro na ordem de Δt^2 (Morgan e Coutinho, 2007). Para obter velocidades com maior precisão, o algoritmo *leapfrog* (Van Gunsteren e Berendsen, 1988), uma versão variante do algoritmo de Verlet, é utilizado, empregando as velocidades no meio tempo (*half time step*).

$$\dot{\mathbf{r}}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \dot{\mathbf{r}}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \ddot{\mathbf{r}}_i(t)\Delta t \quad \text{Equação 3.14}$$

Neste caso, as velocidades no tempo t são computadas a partir da expressão

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t) = \frac{\dot{\mathbf{r}}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \dot{\mathbf{r}}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)}{2} \quad \text{Equação 3.15}$$

No algoritmo *leapfrog*, as trajetórias são calculadas por

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \dot{\mathbf{r}}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t \quad \text{Equação 3.16}$$

Este algoritmo é menos sujeito a erros numéricos. Em resumo, as acelerações calculadas pela eq 3.11 quando substituídas na eq 3.14 originam valores de velocidade mais precisos. Em seguida, esses valores de velocidade são inseridos na eq 3.16 para a obtenção de trajetórias.

Na simulação por dinâmica molecular resolve-se, portanto, as equações de movimento para cada partícula a cada incremento de tempo Δt . A avaliação das forças para a obtenção das acelerações é, em geral, o processo mais dispendioso em tempo computacional. O tempo gasto no cálculo dessas forças depende do tamanho do sistema simulado e da complexidade da função de energia potencial $V(\{\mathbf{r}_i\})$ para cada campo de forças empregado. Em sistemas envolvendo macromoléculas, as funções potenciais mais realistas são compostas por diversos termos, que descrevem as ligações químicas, os ângulos moleculares, as torções e as interações eletrostáticas e de Lennard-Jones entre átomos ligados e não ligados, como mostrado na eq 3.7-

3.4 Condições periódicas de contorno

As simulações de sistemas moleculares isolados, com o solvente em uma caixa de simulação, podem apresentar os efeitos de fronteira (ou efeitos de borda), uma vez que as moléculas do solvente, presentes nas extremidades da caixa passariam a interagir com um

número menor de átomos do que aqueles que estivessem no centro da caixa. Como a simulação tem como um dos objetivos a correlação entre propriedades do sistema microscópico com aquelas que descrevem o sistema macroscópico, deve-se eliminar tais efeitos. Para isso, utilizamos Condições Periódicas de Contorno (CPC) (Schlick, 2002).

Quando usamos CPC, a caixa onde se encontra o nosso sistema é replicada nas três direções cartesianas (Figura 3.3). Todas as imagens das partículas se movem em conjunto e somente uma delas é, de fato, representada no programa ? Se uma molécula deixa a caixa central, uma de suas imagens periódicas entrará pela face oposta.

A natureza pseudo-infinita do sistema implica na necessidade de algumas aproximações para tratar as interações intermoleculares. Aparentemente, o número de interações de pares aumentaria muito como um efeito da CPC. Para minimizá-lo algumas aproximações são empregadas. Em particular, a aproximação da imagem mínima supõe que cada partícula i da caixa central interaja com as partículas j , ou sua imagem mais próxima. Além disto, introduzir uma esfera de corte (raio de corte) com um valor igual ou menor que a metade da menor dimensão da caixa de simulação, de maneira que um átomo não interaja com sua própria imagem.

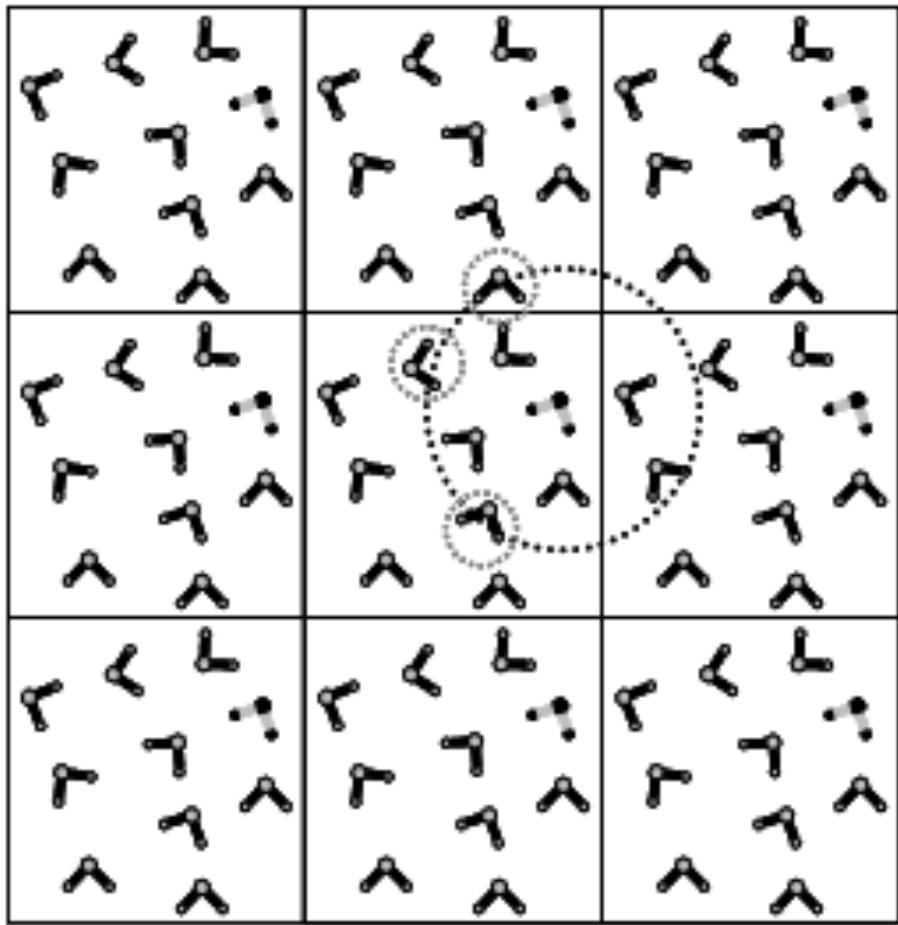


Figura 3.3 Representação bidimensional das condições periódicas de contorno que simulam um ambiente infinito. A caixa central é repetida em todos os lados e é utilizado um raio de corte (círculo pontilhado) que restringe a distância para contabilizar as interações de longo alcance. Os pequenos círculos em cinza representam grupos de carga adicionados ao cálculo pela presença de pelo menos um dos átomos no interior do raio de corte

3.5 Tratamento das interações não-ligadas de longo alcance

Como a contribuição para as interações de Lennard-Jones em distâncias superiores a 0.8 nm é muito próxima de zero, a introdução do raio de corte no sistema não traz grandes consequências, mas isto não se aplica nas interações de Coulomb, que decaem com $1/r$. Assim, se o valor do raio de corte for muito pequeno ($<1,5$ nm) muitas interações de longo alcance, que, somadas têm importância para o sistema, podem ser eliminadas.

Outro problema é a presença de espécies iônicas, considerando que o uso de uma esfera de corte induz a numerosos artefatos, que, evidentemente, distorcem os resultados da simulação. Além disso, deve-se destacar que, limitando-se a espécies dipolares, aplicar uma

esfera de corte causa singularidades nas derivadas da energia potencial na fronteira do raio de corte devido ao abandono da contribuição proveniente das interações além deste limite.

Hoje em dia há métodos mais refinados para a truncagem das interações que permitem reduzir consideravelmente estes efeitos deletérios e contornar tais dificuldades. Os métodos mais populares são a adoção de grupos de cargas, associados a uma função de *switching*, ou uma função de *shifting*, ou métodos como o de campo de reação (*reaction field*), ou então métodos mais rigorosos como o *Particle Mesh Ewald* (PME) que avaliam as interações de uma partícula com as demais contidas na caixa central, bem como com todas as caixas periódicas replicadas. Este último enfoque aumenta em muito o custo computacional. Todavia, é desejável para uma descrição rigorosa das interações de longo alcance num sistema cristalino.

3.5.1 Grupos de cargas

Os grupos de cargas são formados por pequenas subunidades das moléculas e, por regra, a carga de um grupo de cargas é sempre um número inteiro, com soma total nula, com exceção de alguns grupamentos funcionais carregados. Esta abordagem é necessária, pois o simples truncamento das interações no raio de corte pode fazer com que apenas partes de uma molécula, como o oxigênio de uma molécula de água, sejam contabilizadas no cálculo, o que introduz um erro considerável na simulação, principalmente quando se trata de interações eletrostáticas.

O uso de grupos de cargas visa reduzir o ruído causado por estas cargas desbalanceadas, reunindo pequenos grupos de átomos. Com a adoção de grupos de cargas na parametrização de subunidades das moléculas, à medida que um dos átomos do grupo fica dentro da distância do raio de corte, a carga referente a todos os demais átomos são adicionados ao cálculo. Mais exatamente, quando a menor distância entre os centros

geométricos de dois grupos de cargas distintos é menor do que o raio de corte, a contribuição de todos os átomos participantes dos grupos de carga é contabilizada. No exemplo da molécula de água, se esta restrição for satisfeita, toda a molécula seria introduzida no cálculo.

3.5.2 Alternativas à truncagem simples (cut off)

A função de *switching* substitui o comportamento abrupto do raio de corte por um decréscimo suave em torno da fronteira esférica. Com uma idéia similar, todavia mais refinada, o campo de reação faz com que o potencial de Coulomb também tenha o valor zero no raio de corte escolhido, ao assumir uma constante dielétrica ϵ_{rf} que simula o efeito da blindagem eletrostática causada pelo solvente além do raio de corte (Figura 3.4). O potencial para a interação de Coulomb passa a ser:

$$V_{Coulomb-RF} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} + \left[1 + \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \frac{r_{ij}^3}{r_c^3} \right] - \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_c} \frac{3\epsilon_{rf}}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \quad \text{Equação 3.16}$$

em que q_i e q_j são as cargas dos átomos envolvidos, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo, ϵ_{rf} a constante dielétrica para o campo de reação, e r_c o raio de corte.

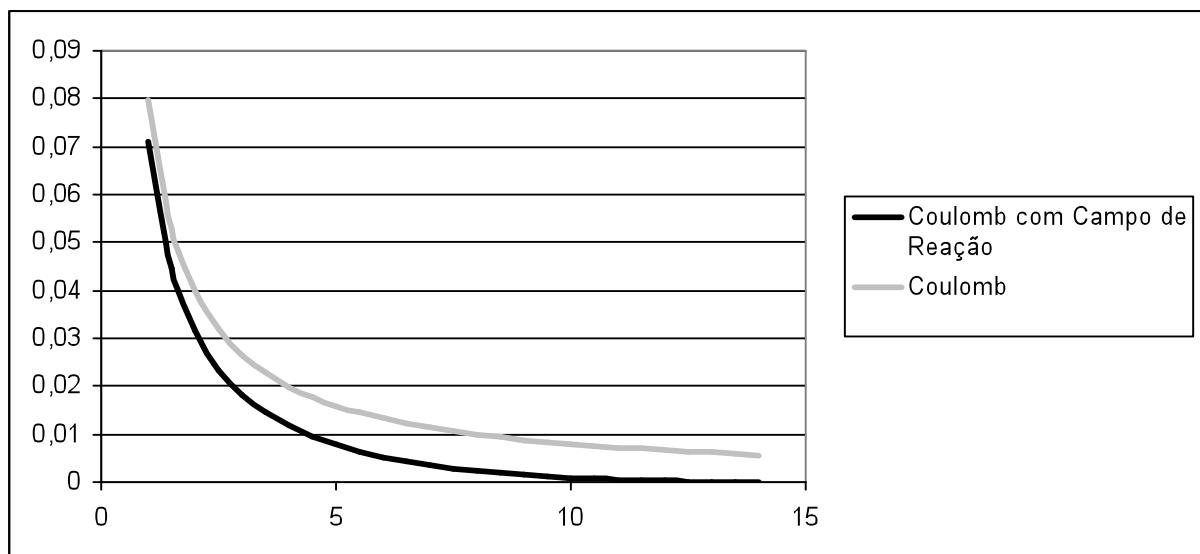


Figura 3.4 Representação dos efeitos da aplicação do campo de reação na função potencial de Coulomb para partículas de mesma carga com e sem o campo de reação. Neste exemplo ϵ_0 é igual 54 e o raio de corte 1.5nm.

O método PME é uma adaptação do método *Ewald Summation*, que admite que a função de energia potencial possa ser dividida em duas somas: uma no espaço direto e outra no espaço recíproco. O PME (Figura 3.5e Figura 3.6) baseia-se na avaliação da contribuição do espaço recíproco utilizando uma FFT. Uma rede tridimensional é construída contendo o espaço Cartesiano, onde a simulação de DM está sendo realizada, e as cargas pontuais provenientes das partículas do sistema são interpoladas na rede. Em seguida, a distribuição gaussiana é calculada. No espaço direto, cada carga está rodeada por uma distribuição gaussiana de cargas, de mesma amplitude e de sinal inverso. Esta contribuição é contrabalanceada no espaço recíproco por outra distribuição de sinal inverso (Figura 3.5). A contribuição eletrostática é calculada novamente nos pontos da rede, repetindo-se para cada partícula do sistema.

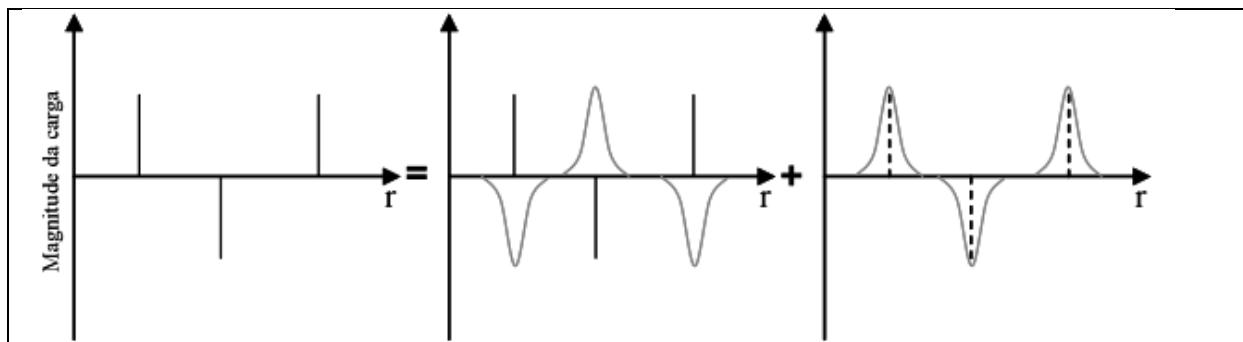


Figura 3.5 Representação unidimensional dos componentes da soma de Ewald, em um sistema unidimensional de cargas pontuais. A esquerda, o espaço direto, ao centro a distribuição de cargas no espaço direto, a direita distribuição de cargas gerada para o espaço recíproco

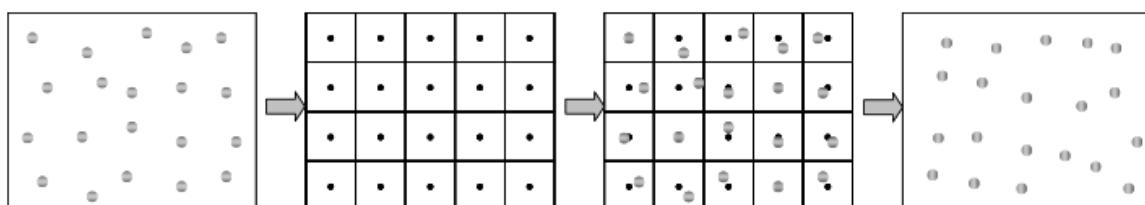


Figura 3.6 Ilustração do método PME. Primeiro as posições atômicas e as cargas são armazenadas, em seguida é produzida uma rede de pontos, depois as cargas são interpoladas aos pontos da rede. A soma de Ewald é realizada apenas para os pontos da rede. Finalmente o potencial é transferido de volta aos átomos e as coordenadas são atualizadas para o próximo passo da DM.

3.6 Cálculo de cargas dos ligantes pelo ajuste do potencial eletrostático (ESP ElectroStatic Potential)

As cargas ajustadas pela superfície de potencial eletrostático têm muitas vantagens. Elas reproduzem bem as energias de interação, podendo ser calculadas diretamente, e têm mostrado bom desempenho em computar as energias conformacionais quando usados fatores de escala eletrostáticos 1-4, que corrigem os valores para as interações não ligadas até o terceiro vizinho. O trabalho de Cornel et al no JACS (Cornell *et al.*, 1993) contém muitas validações para o este modelo de cargas. A idéia básica para o ajuste de cargas pelo potencial eletrostático é o algoritmo de ajuste dos mínimos quadrados (*least squares fit*) utilizado para derivar um conjunto de cargas pontuais centradas nos átomos de forma a reproduzir da melhor forma o potencial eletrostático da molécula, calculado a partir da mecânica quântica. Nos programas de ajuste de cargas, o potencial é avaliado em um grande número de pontos, definidos por uma ou mais superfícies, além do raio de van der Waals do átomo. O uso de quatro camadas de superfícies com distâncias de 1,4; 1,6; 1,8; e 2,0 vezes o raio de van der Waals têm se mostrado apropriado para derivar as cargas que reproduzem as interações intermoleculares (energias e distâncias), bem como o dipolo da molécula.

3.6.1 A escolha da Base

Para calcular as cargas dos ligantes selecionamos a base 6-31G* já que esta excede o momento de dipolo para a maioria dos resíduos em 10%-20%. Este comportamento é desejável para derivar cargas que serão utilizadas nas simulações de fase condensada, pois embute a quantidade de polarização que deve ser esperada na solução de fase aquosa (a polarização fica representada implicitamente no excesso de cargas) (Bayly *et al.*, 1993; Cornell *et al.*, 1993). Em outras palavras, espera-se que a molécula seja mais polarizada na fase condensada por causa de um maior número de interações com outros corpos.

3.6.2 O método RESP para o ajuste de cargas.

As cargas RESP (Restrained EletroStatic Potential) (Cieplak et al., 1995) mostram menor variabilidade conformacional do que as cargas ESP padrão, já que neste método o ajuste pode ser realizado empregando-se diversas conformações ou múltiplas moléculas. As cargas RESP também reproduzem bem as importantes energias de interação e energias livres de solvatação, e também resultam em energias conformacionais satisfatórias, para os pequenos ligantes estudados. A idéia básica deste algoritmo de ajuste é que as cargas dos átomos (que não o hidrogênio) são restringidas a um valor ótimo. Este modelo evoluiu do trabalho de Christopher Bayly (Bayly *et al.*, 1993; Cornell *et al.*, 1995), que mostrou que as cargas em átomos mais internos não eram bem determinadas pelos pontos do potencial eletrostáticos. Estes átomos, geralmente, assumiam altos valores durante os cálculos de ajuste de cargas. Além disto, os valores destas cargas mostravam grande variabilidade conformacional. A variação de cargas em função da conformação é um fenômeno perfeitamente normal e esperado para cálculos quânticos, porém na mecânica clássica, exceto nos campos de forças polarizáveis, as cargas são fixas. As restrições implementadas são de natureza hiperbólica, aproximadamente com a mesma força de restrição que é sentida pelas cargas de todas as magnitudes. Isto diminui a magnitude das cargas que podem ser reduzidas, sem afetar muito o ajuste do potencial. A eficiência da derivação de cargas pelo método RESP, aplicado para múltiplas moléculas e múltiplas conformações de moléculas similares, como estabelecido por Cieplak e colaboradores (Cieplak *et al.*, 1995), fez do RESP o método principal para o cálculo de cargas dos campos de forças de Mecânica Molecular (Wang *et al.*, 2000; Kahn e Bruice, 2002; Wang *et al.*, 2004; Lins e Hünenberger, 2005; Oostenbrink *et al.*, 2005b; Kirschner *et al.*, 2008).

3.7 Métodos de Análise

3.7.1 Desvio da Raíz Média Quadrática.

O Desvio da Raíz Média Quadrática (RMSD) do inglês *Root Mean Square Deviation* é o resultado do cálculo realizado para a comparação de dois conjuntos de dados. Sua aplicação neste trabalho é o cálculo para a comparação das coordenadas dos átomos (excluindo o solvente) ao longo do tempo das simulações em relação à estrutura inicial como referência. Neste caso, pode-se obter o gráfico do desvio global da estrutura em relação à conformação inicial versus tempo.

Outra análise com base no valor RMSD é a Flutuação da Raíz Média Quadrática (RMSF) do inglês *Root Mean Square Fluctuation*. Este método difere em relação ao primeiro pelo fato de tomar como referência a estrutura média calculada após a simulação de DM e calcular a flutuação de cada resíduo aminoácido, ou cada átomo, em relação à sua posição média. Neste caso pode-se obter um gráfico do desvio, ou flutuação conformacional de cada resíduo, versus sua posição na cadeia polipeptídica. A expressão geral do RMSF é definida por:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{Equação 3.17}$$

em que n é o número total de amostras, X_i é a coordenada tridimensional de cada átomo da amostra i e \bar{X} a coordenada de referência. O resultado deste cálculo indica o quanto a proteína variou ao em relação a estrutura média, além de permitir observar as variações locais. Neste caso, quais os resíduos, ou átomos, tiveram maior variação.

3.7.2 Ligações Hidrogênio

As interações não covalentes são essenciais na manutenção da estrutura da proteína, para os processos de reconhecimento e para as interações proteína/ligante. As ligações

hidrogênio são um tipo peculiar de interação não-covalente, que possui um papel muito importante nos sistemas biológicos. Elas contribuem para a afinidade e especificidade das interações receptor-ligante, e tanto na manutenção de conformações bioativas das macromoléculas como das estruturas secundárias hélices-alfa e as fitas-beta de proteínas. Nas biomoléculas estas interações são formadas entre átomos mais eletronegativos que o carbono, como o oxigênio e o nitrogênio, que atuam como aceitadores e doadores de hidrogênio (Figura 3.7). A energia envolvida nestas ligações é da ordem de 1,0 a 6,0 Kcal/mol, superior ao ruído térmico para a temperatura ambiente (0,6 Kcal/mol), porém inferior às energias envolvidas nas ligações iônicas, e bem menor que a das ligações covalentes.

Neste trabalho as ligações hidrogênio foram mapeadas seguindo o critério Doador-Hidrogênio-Aceitador com distância r máxima: Doador-Aceitador igual a 3,5 Å e ângulo mínimo β (Doador-Hidrogênio-Aceitador) igual a 120°.



Figura 3.7 Ligações Hidrogênio. São três as convenções para determinação de ligações hidrogênio, dados a distância r e o ângulo α : Na figura à esquerda são consideradas distâncias r entre Doador (D) e Aceitador (A) inferiores a 0,36nm, com α variando entre 0° e 60°; Na figura à direita, são consideradas distâncias r entre Hidrogênio (H) e Aceitador (A) inferiores a 0,27nm, com β variando entre 120° e 180°; A terceira convenção é a combinação dos critérios anteriores.

3.7.3 Área de Interação Intermolecular

A avaliação da Área de Interação Intermolecular pelo cálculo da superfície de contato proteína-ligante, com a discriminação para as áreas médias de contato com cada resíduo aminoácido, é uma das melhores ferramentas no acesso a informações sobre a qualidade e quantidade das interações entre a enzima e os ligantes, dando importante subsídio para o desenvolvimento de novos fármacos.

Com este exame pode-se identificar grupos de contato comuns aos ligantes que representam os bolsões de ligação (*biding pockets*) da enzima junto aos mesmos, e determinar, na enzima, não apenas quais seriam os resíduos mais importantes para a ligação, como também qualificar e quantificar a sua relevância. Além disso, com a comparação de áreas de contato de diferentes ligantes de mesmo alvo é possível observar pontos de contato distintos, que podem orientar o desenho de novos ligantes com maior especificidade utilizando a combinação de sítios comuns e dos sítios distintos de contato.

Esta técnica se vale da avaliação da superfície intermolecular entre duas ou mais superfícies moleculares, como, por exemplo, Proteína e Ligante. A Superfície Molecular (ou Superfície de van der Waals) e a Superfície Acessível ao Solvente (SAS) (Richards, 1971) são definidas a partir de uma ponta de prova esférica correndo sobre a proteína com seus átomos representados por suas esferas de van der Waals (Figura 3.8). Diferente da avaliação da superfície molecular, que leva em conta apenas as esferas de van der Waals na avaliação da Superfície Acessível ao Solvente, esta ponta de prova tem diâmetro próximo de 1.4Å para simular uma molécula de água. A partir das superfícies moleculares da proteína e do ligante é possível determinar a Superfície Intermolecular como sendo a superfície de intersecção entre a SAS do ligante e a SAS da proteína.

Para esta análise foi desenvolvido o programa SurfinMD (versão 1.52p2, GOMES, 2010) que aplica o algoritmo de Connolly (Connolly 1983) para cálculo da área média da superfície de contato molecular para as trajetórias de DM, descrevendo o caráter polar ou apolar da contribuição da interação, além de discriminar a contribuição de cada resíduo de aminoácido de uma proteína.

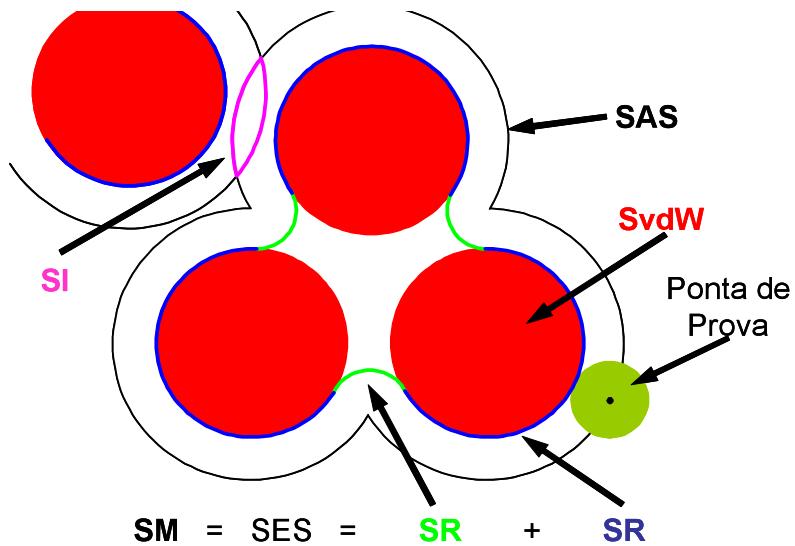


Figura 3.8 Superfície Molecular: Uma ponta de prova esférica corre por sobre a superfície de van der Waals (SvdW), gerando superfícies de contato e superfícies de reentrâncias (SR), que somadas compõem a superfície molecular ou superfície exposta ao solvente (SM/SES). O centro da ponta de prova desenha a superfície acessível ao solvente (SAS). A superfície intermolecular (SI) é composta quando há sobreposição de SAS entre duas moléculas.

3.7.4 Deslocamento médio quadrático

As moléculas em líquidos e gases não estão estacionadas, ou seja, movem-se constantemente. Este processo, denominado difusão, ocorre naturalmente em fluidos em equilíbrio. O movimento de uma molécula em um fluido relativamente denso não segue um caminho único. Na medida em que se desloca a molécula sofre colisões com outros átomos ou moléculas produzindo um caminho randômico. Este tipo de caminho foi analisado por Albert Einstein em seu estudo do movimento Browniano (Einstein, 1956), demonstrando que a média quadrática da distância percorrida por uma partícula seguindo um caminho randômico é proporcional ao tempo decorrido.

Sendo assim, a medida do deslocamento médio quadrático (MSD) contém informação da difusão dos átomos. Se um sistema é sólido o MSD satura em um valor finito. Se for líquido, o MSD cresce linearmente com o tempo. Neste caso torna-se útil caracterizar o comportamento do sistema em termos da inclinação da curva de MSD, e o coeficiente de difusão (D), que é uma quantidade mensurável a partir do MSD.

O deslocamento médio quadrático (MSD) de átomos em uma simulação pode ser calculado por:

$$MSD = \langle |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)|^2 \rangle \quad \text{Equação 3.18}$$

em que $\langle \rangle$ é a média de todos os átomos (ou átomos de uma subclasse) com a precaução de evitar saltos das moléculas através do uso das condições periódicas de contorno.

O coeficiente de difusão (D) é calculado por:

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{2dt} \langle |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)|^2 \rangle \quad \text{Equação 3.19}$$

3.7.5 Análise dos componentes principais para proteínas (PCA)

Um dos maiores problemas na interpretação de resultados de DM é o grande número de coordenadas que determinam a configuração do sistema. Quando se considera uma pequena proteína de 1000 átomos (~100 resíduos de aminoácidos) existirão 3000 posições em coordenadas Cartesianas [x, y, z] para serem consideradas. Este número nem ao menos inclui os átomos do solvente, que tem grande efeito no comportamento das proteínas. Felizmente, nem todas as combinações de coordenadas são permitidas. Por exemplo, átomos interconectados por ligação química estarão quase sempre à uma mesma distância. De forma similar, os ângulos de ligação também têm grau de liberdade bastante restrito. Além disso, a existência das estruturas secundárias e terciárias reduz muito o número de combinações de coordenadas possíveis.

O método de análise dos componentes principais para proteínas foi proposto por Amadei e colaboradores (Amadei *et al.*, 1993). Neste trabalho, Amadei e colaboradores investigaram as correlações entre as posições atômicas das proteínas a partir das trajetórias de dinâmica molecular, demonstrando através da diagonalização da matriz de covariância dos deslocamentos atômicos, que a maior parte dos movimentos correlacionados está concentrada

em um subespaço com poucos graus de liberdade, denominado subespaço essencial, enquanto que os demais graus de liberdade representam flutuações menos importantes consideradas essencialmente restrições físicas do sistema. O método oferece a possibilidade de expressar a dinâmica de proteínas apenas no subespaço essencial. As aplicações do método mostraram que a PCA é uma poderosa ferramenta de análise de movimentos coletivos (Amadei *et al.*, 1993; Scheek *et al.*, 1995; De Groot *et al.*, 1996a; De Groot *et al.*, 1996b; Aalten *et al.*, 1997; Van Aalten *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Mesentean *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2007)

O método funciona da seguinte forma: a partir de uma simulação de DM de proteína em equilíbrio em um dado ambiente e a uma dada temperatura T, em que os graus de liberdade de translação e rotação tenham sido removidos, assume-se que a trajetória no espaço de fase está disponível. O sistema é representado por coordenadas Cartesianas, cujo movimento interno pode ser descrito por uma trajetória $\mathbf{x}(t)$, onde \mathbf{x} representa o vetor posição e t o instante da simulação. A correlação entre os movimentos atômicos é expressa pela matriz de covariância dos desvios atômicos:

$$\mathbf{C} = \text{cov}(\mathbf{x}) = \langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)(\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \rangle \quad \text{Equação 3.20}$$

em que $\langle \rangle$ é a média ao longo do tempo. A matriz simétrica \mathbf{C} é diagonalizada por transformação ortogonal de coordenadas \mathbf{T} :

$$\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle = \mathbf{T}\mathbf{q} \quad \text{ou} \quad \mathbf{q} = \mathbf{T}^T(\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \quad \text{Equação 3.21}$$

que transforma \mathbf{C} na matriz diagonal $\Lambda = \langle \mathbf{q}\mathbf{q}^T \rangle$ de autovalores λ_i :

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}\Lambda\mathbf{T}^T \quad \text{ou} \quad \Lambda = \mathbf{T}^T\mathbf{C}\mathbf{T} \quad \text{Equação 3.22}$$

cuja coluna i do vetor \mathbf{T} é o autovetor pertencente ao autovalor λ_i . Quando um número suficiente de configurações (pelo menos $3N + 1$) for disponível para avaliar a matriz de covariância (C), existirão $3N$ autovalores, dos quais 6 representam os graus de rotação e translação. A contribuição total para as flutuações de posição $\sum_i (x_i - \langle x_i \rangle)^2$ pode ser construída a partir das contribuições dos autovetores:

$$\sum_i (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \geq \langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \rangle = \langle \mathbf{q}^T T^T T \mathbf{q} \rangle = \langle \mathbf{q}^T \mathbf{q} \rangle = \sum_i q_i^2 = \sum_i \lambda_i$$
Equação 3.23

Os autovalores são ordenados de forma decrescente, de forma que o primeiro autovetor representa o maior deslocamento e a maior parte das flutuações de posição ocorre nos primeiros n autovalores, onde n é um número pequeno quando comparado ao total ($3N$).

4 : Modelos moleculares para emular os efeitos de confinamento na dinâmica interna da organofósforo hidrolase.

A estabilização de proteínas através de confinamento tem sido estudada extensivamente através de técnicas experimentais e computacionais. Baseado em conceitos de mecânica estatística e física de polímeros, a estabilização de proteínas induzida por confinamento tem sido atribuída a restrição do espaço de configurações para os estados desnaturados (Minton, 2001; Zhou e Dill, 2001). Ainda assim, o efeito do confinamento na atividade catalítica das enzimas permanece pouco conhecido. A investigação teórica detalhada das reações químicas requer o conhecimento da estrutura eletrônica através de uma descrição quantum mecânica. Este nível refinado de teoria demanda tempo computacional muito maior do que modelos minimalistas, tradicionalmente utilizados para estudar os efeitos do confinamento no enovelamento e estabilidade de proteínas (Klimov *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006; Rathore *et al.*, 2006), impondo restrições severas ao período e escala de tempo dos sistemas a serem simulados.

O confinamento da metaloenzima organofósforo hidrolase em sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) amplifica a estabilidade e aumenta a atividade catalítica específica em 200%, quando comparada com a enzima em solução. O mecanismo pelo qual estes processos acontecem não é bem compreendido. Desenvolvemos modelos de confinamento macroscópico e *coarse grain* no intuito de fornecer pistas de como o ambiente confinado conduz a dinâmica conformacional da enzima para estados de estabilidade e atividade aumentados. A dinâmica estrutural da organofósforo hidrolase nas duas condições de confinamento propostas é distinta entre si. Comparações das simulações apresentadas mostram que apenas um dos modelos leva a uma descrição satisfatória da dinâmica interna da enzima.

Para estimar a atividade enzimática para OPH confinada em FMS, em solvente explícito, é desejável que se emulem as propriedades do poro que sejam relevantes para a atividade enzimática, descrevendo, minimamente, o tamanho do sistema. Já que o poro FMS é rígido e, basicamente inerte, assume-se que essas propriedades podem ser adequadamente descritas por uma representação macroscópica e/ou do tipo *coarse-grained* do poro. De fato, um modelo macroscópico foi utilizado previamente para simular o confinamento de enzimas (Bismuto *et al.*, 2002). O efeito do poro FMS foi emulado tanto por um modelo não-atômico como pelo modelo *coarse-grained*. Recentemente, também foi mostrado que mutantes da OPH com diferentes eficiências catalíticas exibem dinâmicas distintas (Soares *et al.*, 2007). Portanto, uma representação realista do ambiente de confinamento deve contabilizar estas diferenças. A dinâmica da OPH entre estas duas condições de confinamento, atômica e *coarse grained*, é bem distinta. Comparações das simulações apresentadas mostram que um modelo leva a descrição imprecisa da dinâmica interna da OPH.

4.1 Procedimentos

4.1.1 Modelo da enzima OPH

O modelo molecular da enzima OPH foi construído a partir das coordenadas da estrutura cristalográfica, determinada na resolução de 1.9 Å (código PDB 1EZ2) (Benning *et al.*, 2000). Os átomos foram representados pelo modelo atômico de van der Waals contendo cargas pontuais centralizadas, empregando-se o campo de forças AMBER (Cornell *et al.*, 1995). O composto diisopropilmetil-fosfonato (PUBCHEM CID: 3073) co-cristalizado com a enzima foi substituído pelo enantiômero *SpSc* do agente químico soman (PUBCHEM CID: 7305).

O estado de protonação dos resíduos de aminoácido foi determinado de acordo com o pH 7.0. Os dois átomos de Zinco do sítio ativo da enzima foram tratados por um modelo não

ligado, com a carga formal de $+2e$. As geometrias do soman e da lisina carboxilada foram otimizadas utilizando a teoria do funcional de densidade (DFT), empregando o funcional B3LYP e o conjunto de bases DZVP. As cargas atômicas parciais para o soman e a lisina carboxilada foram calculadas pelo método Hartree-Fock no conjunto de bases 6-31G*, aplicando-se restrições ao potencial eletrostático (RESP) (Bayly *et al.*, 1993) sobre as estruturas otimizadas como descrito por Soares (Soares *et al.*, 2007).

4.1.2 Modelo para o FMS

As interações entre OPH e a FMS possuem dois componentes: Lennard-Jones e eletrostático, devido à funcionalização do mesoporo com o grupo $[CH_2]_n\text{-COO}^-$. Neste contexto nós assumimos que:

i. As interações podem ser aproximadas por um modelo não-atômico em que as posições dos átomos N ζ dos resíduos lisina podem ser harmonicamente constringidos (exceto para a lisina 169, presente no sítio ativo). As cadeias laterais de lisina na superfície da enzima foram selecionadas, pois estes resíduos são os sítios onde sugere-se conexão com a sílica nos complexos OPH-FMS (Lei *et al.*, 2007a). Além disso, este modelo foi usado com sucesso por Bismuto e colaboradores (Bismuto *et al.*, 2002). A restrição com o potencial harmônico é feita com o objetivo de reduzir os movimentos da enzima.

ii. Interações eletrostáticas podem ser modeladas como um arranjo cilíndrico e uniforme de partículas, simulando a curvatura do poro, cada uma correspondendo a um grupo funcional. Neste modelo, denominado *coarse-grained*, cada partícula incorpora os atributos atômicos (parâmetros de van der Waals e Coulomb) característicos do grupo funcional em questão (Lei *et al.*, 2008), derivado do campo de forças AMBER.

Portanto, no caso do grupo funcional $[CH_2]_n\text{-COO}^-$, empregado experimentalmente para funcionalizar a sílica mesoporosa, a superfície foi representada por partículas com cargas

pontuais e número de carga formal $-1e$, e parâmetros de van der Waals correspondentes ao ânion carboxilato (átomo de oxigênio). Estas partículas foram ser distribuídas para reproduzir a densidade de grupos funcionais (1.0 nm para 20% de cobertura) (Lei *et al.*, 2002). A estrutura da OPH foi ancorada ao modelo do poro de FMS, baseado na complementaridade de cargas de suas superfícies eletrostáticas como calculado pelo programa APBS (Baker *et al.*, 2001). Um esquema da OPH no modelo de FMS é apresentado na Figura 4.1.

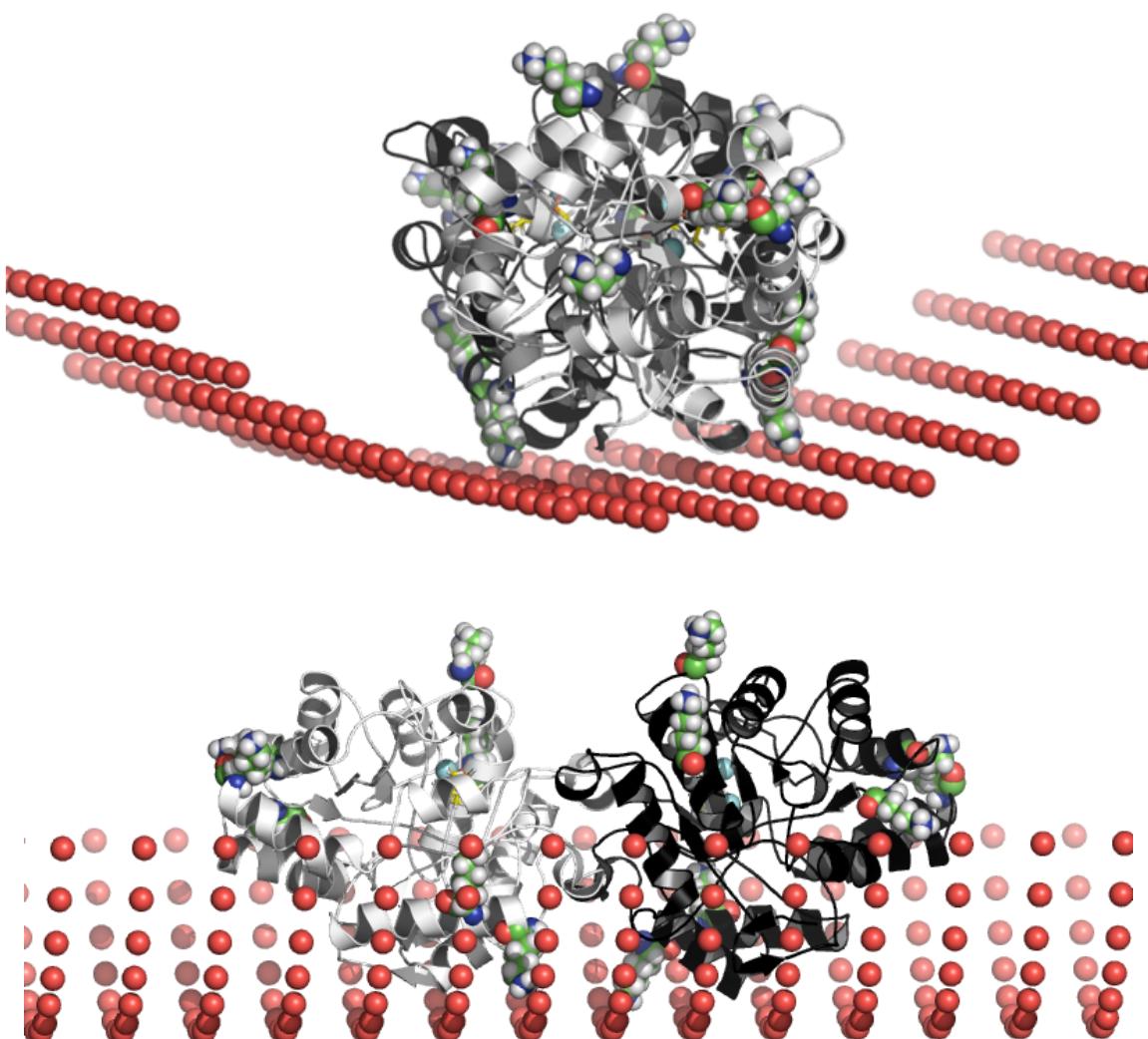


Figura 4.1 Modelo para a OPH confinada (acima e abaixo, rodada em 90° no eixo Y). No modelo de constrição posicional, os átomos N ϵ dos resíduos de lisina, representados pelas esferas de van der Waals (VDW) são harmonicamente constringidos (exceto para a lisina 169 carboxilada no sítio ativo). No modelo coarse-grain os grupos funcionais COO- do poro FMS são representados pelas esferas de VDW em vermelho. O substrato soman é apresentado no modelo bastões (amarelos). Os íons Zn $^{2+}$ são as esferas de VDW em azul.

4.1.3 Preparação das simulações de DM.

As simulações de DM foram realizadas para OPH livre em solução (OPH_{free}), OPH confinada por constrições de posição para os átomos N ζ das lisinas (OPH_{fix}) e através da representação *coarse-grained* do poro FMS (OPH_{fms}).

As simulações foram executadas no *ensamble* NPT com tempo de integração de 1 fs durante a etapa de equilíbrio e 2 fs durante a etapa de produção. A temperatura do soluto e do solvente foi controlada separadamente por acoplamento ao termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com tempo de relaxação de 0.1 ps. A pressão foi mantida constante a 1.025×10^5 Pa por reescalonamento isotrópico das coordenadas com um tempo de relaxação de $t = 0.4$ ps. O tempo de 2 fs foi usado para integrar as equações de movimento baseadas no algoritmo *leapfrog* (Van Gunsteren e Berendsen, 1988).

O comprimento das ligações entre átomos de hidrogênio e átomos pesados foi constringido usando o algoritmo SHAKE (Miyamoto e Kollman, 1992) com tolerância de 10^{-3} nm. Um raio de corte de 1.0 nm foi usado para todas as interações não-ligadas, e interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas com o método *Smooth Particle Mesh Ewald*. O procedimento de equilibração consistiu de termalização do solvente, com os átomos do soluto fixo, por 20 ps a 298.15 K, seguido por minimização de energia para os átomos do soluto, mantendo-se as coordenadas do solvente fixas, finalmente simulando todo o sistema livre em aumentos de temperatura de 0 para 298.15 K em incrementos de 20 ps e 50 K.

A produção dos dados foi realizada por 10 ns e as configurações da trajetória foram gravadas a cada 0.2 ps. Com este tempo modesto de simulação, diversas características estruturais incluindo RMSD, alcançaram a convergência. Todas as simulações foram realizadas com o programa NWChem versão 5.0 (E. J. Bylaska, 2006) e as análises das

trajetórias moleculares foram realizadas com aplicativos distribuídos com o programa GROMACS versão 3.33 (Lindahl *et al.*, 2001).

4.2 Resultados

4.2.1 Estabilidade estrutural

O deslocamento quadrático médio (RMSD) para as posições dos átomos foi calculado para os átomos do esqueleto peptídico na trajetória de DM com respeito as suas posições na estrutura determinada por difração de raios-X (Figura 4.2). Os perfis de RMSD da OPH_{free} e OPH_{fms} são compatíveis mas visivelmente distintos daqueles da OPH_{fix}. O RMSD para as simulação OPH_{fix} apresenta valores em torno de 0.075 ± 0.005 nm logo após a fase de equilíbrio e permanece assim por toda a trajetória. Em contraste, o RMSD para ambos OPH_{free} e OPH_{fms} converge após 4 ns para valores entre 0.135 ± 0.013 nm.

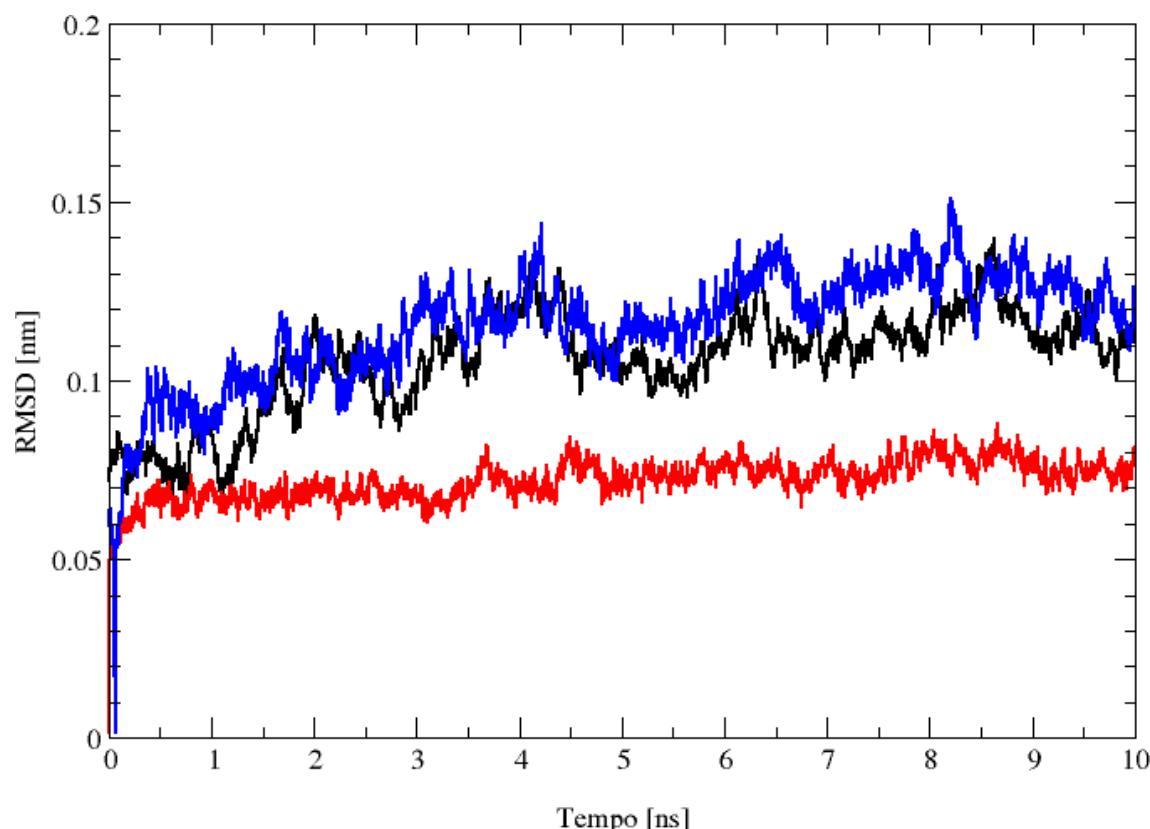
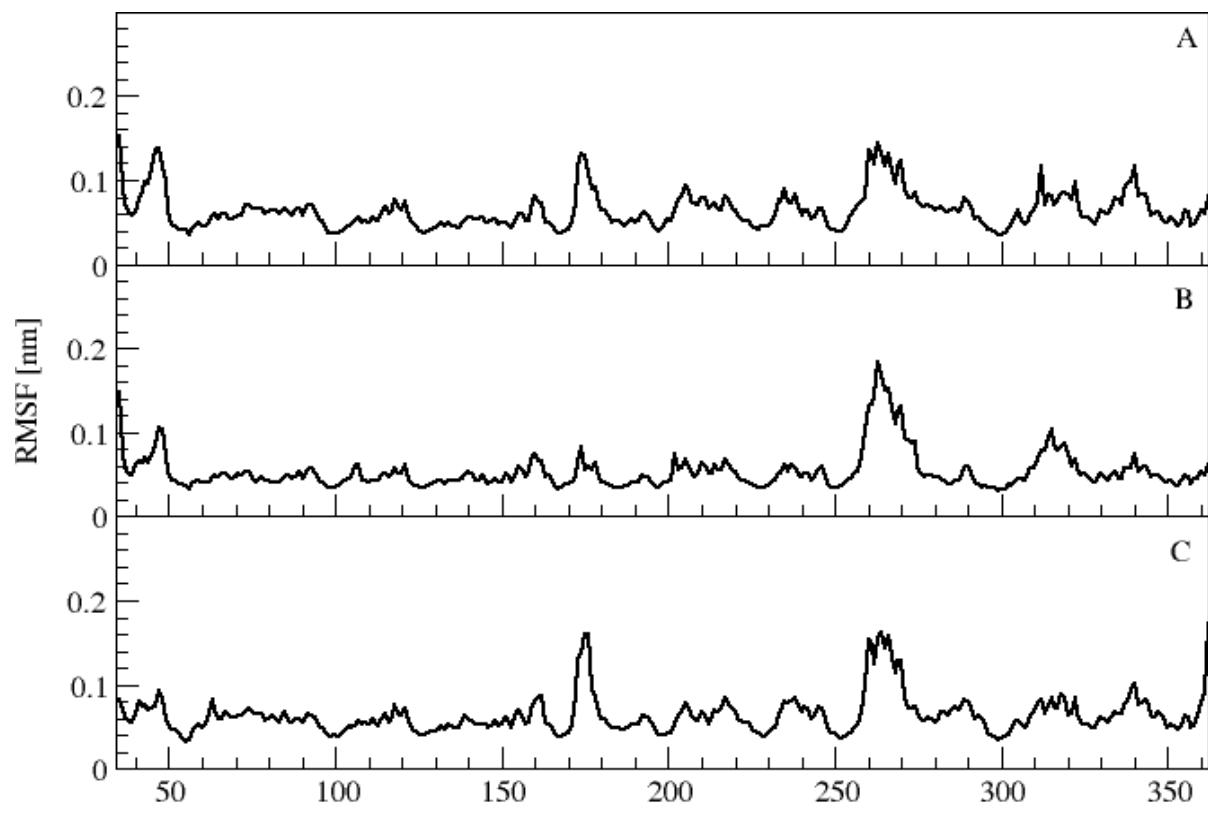


Figura 4.2 Desvio médio quadrático para os átomos do esqueleto peptídico da OPH_{free} (preto), OPH_{fix} (vermelho) e OPH_{fms} (azul) com respeito a estrutura cristalográfica 1EZ2

4.2.2 Dinâmica interna da enzima

O efeito do confinamento, segundo os modelos utilizados, na dinâmica interna da OPH pode ser inferido por comparações das flutuações das posições atômicas (RMSF) e da dinâmica essencial (ED) para OPH_{free} , OPH_{fix} e OPH_{fms} . O RMSF para os átomos do esqueleto peptídico foi calculado para esses três sistemas com respeito a estrutura resolvida por difração de raios-X (Figura 4.3). As três simulações exibem flutuações atômicas médias gerais abaixo de 0.03 nm, com valores médios de RMSF de 0.06 ± 0.02 nm para OPH_{free} e OPH_{fms} , e 0.05 ± 0.02 nm para OPH_{fix} . Os perfis de RMSF são equivalentes para os três sistemas exceto para a região correspondente aos resíduos 165 a 180, que apresentaram flexibilidade muito menor na OPH_{fix} .



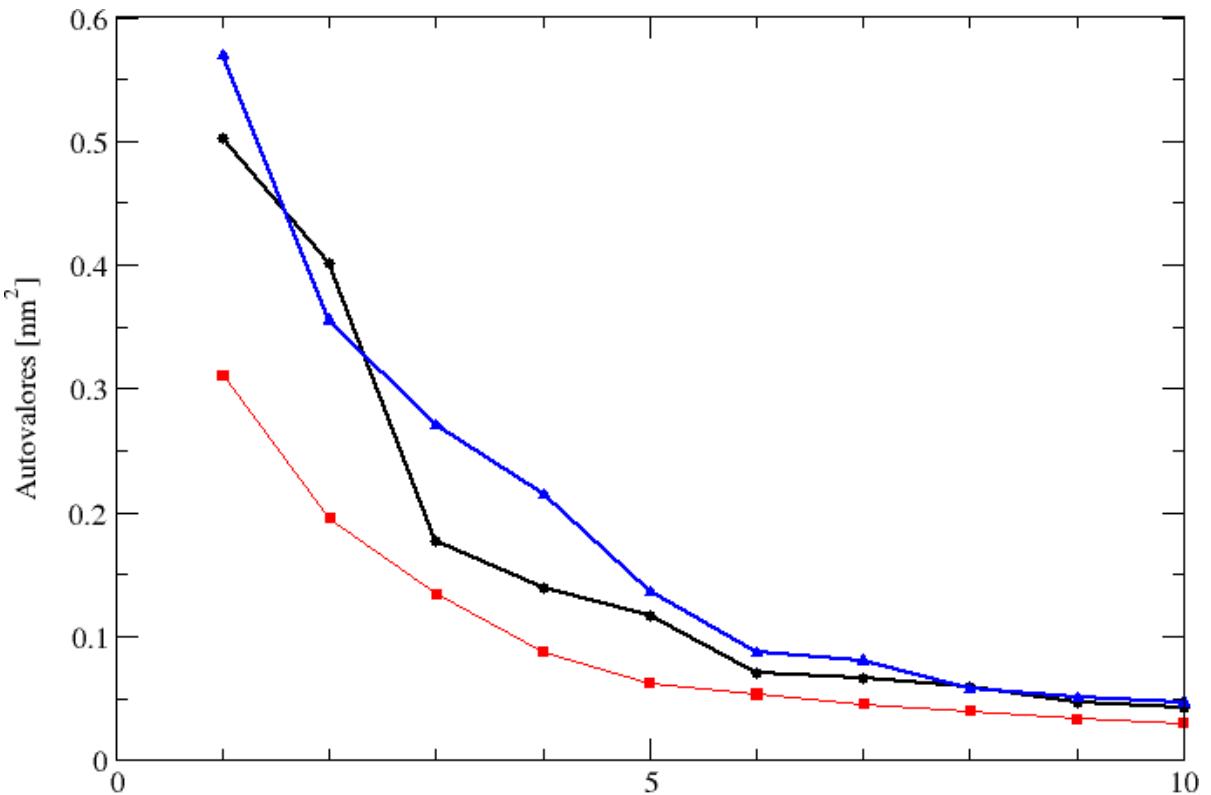
Número do resíduo.

Figura 4.3 Flutuação do desvio médio quadrático para os átomos do esqueleto peptídico da A) OPH_{free} , B) OPH_{fix} e C) OPH_{fms} com respeito a estrutura 1EZ2

A técnica de análise da ED foi aplicada às trajetórias de DM para separar os movimentos internos em movimento ortogonais (Garcia, 1992; Amadei *et al.*, 1993). Os

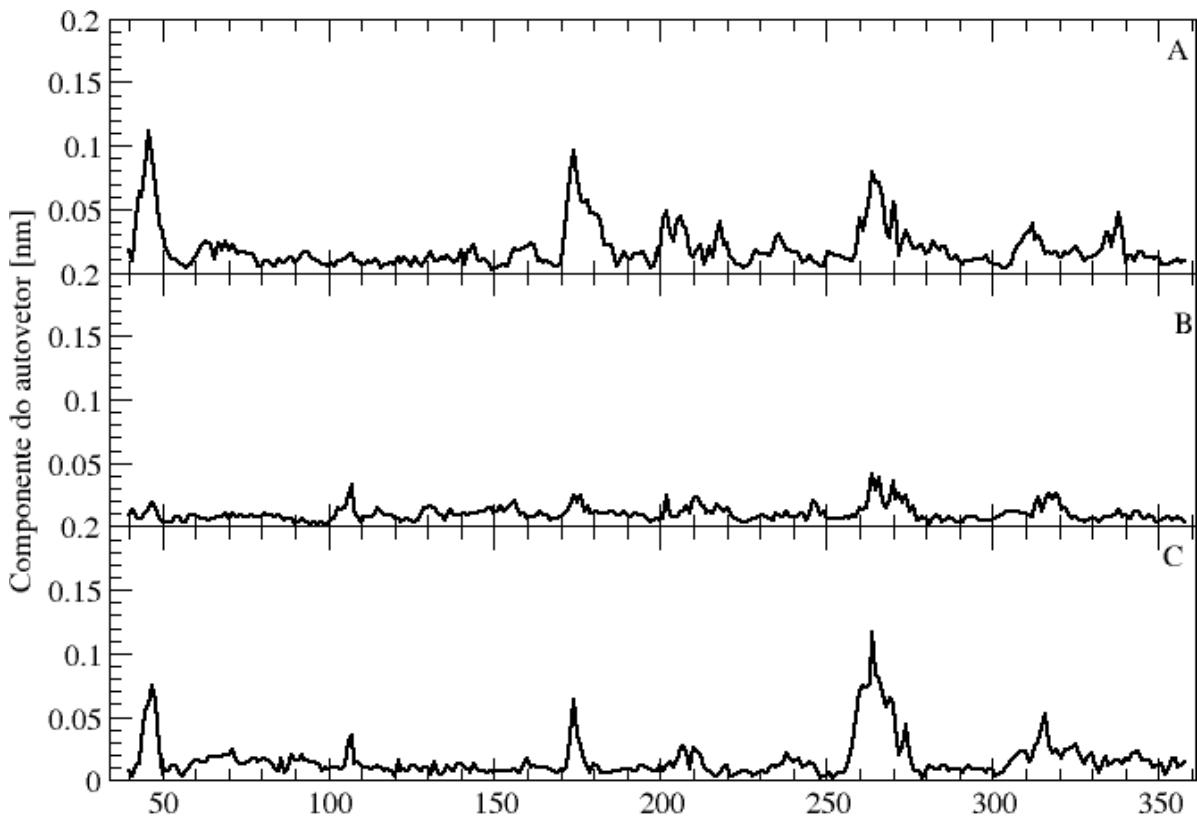
movimentos de grande amplitude de proteínas são descritos por poucos autovetores e separados de um número muito maior de modos de movimento de pequena amplitude. A técnica é baseada na diagonalização da matriz de covariância das flutuações atômicas obtida das trajetórias de DM, após a remoção dos graus de liberdade translacional e rotacional (Garcia, 1992; Amadei *et al.*, 1993). Os autovalores são a média quadrática dos deslocamentos atômicos e, consequentemente, a medida das amplitudes dos movimentos ao longo dos autovetores correspondentes.

As contribuições dos átomos do esqueleto peptídico para os primeiros autovetores é apresentada na Figura 4.4, cujos dados de trajetórias são os mesmo utilizados nas análises das figuras Figura 4.2 e Figura 4.3, representam os deslocamentos relativos de cada resíduo de aminoácido na direção do movimento descrito por 10 autovetores. Os movimentos não-harmônicos da OPH nas três simulações são descritos por poucos autovetores com a maior parte do deslocamento atômico restrito aos dois primeiros (Figura 4.4). Juntos, o primeiro e o segundo contabilizam 30%, 23% e 28% do total dos deslocamentos atômicos nas simulações OPH_{free}, OPH_{fix} e OPH_{fms}, respectivamente.



Índice do autovetor

Figura 4.4 Magnitudes dos autovalores calculados a partir da matriz de covariância correspondendo as simulações OPH_{free} (preto), OPH_{fix} (vermelho) e OPH_{fms} (azul).



Número do resíduo

Figura 4.5 Componentes dos autovetores para os deslocamentos atômicos ao longo do primeiro autovetor para os ensambles de A) OPH_{free}, B) OPH_{fix} e C) OPH_{fms}

4.3 Discussão

As simulações de DM das formas livre e confinada da OPH revelam um comportamento dinâmico e estrutural distinto para a OPH_{fix} comparada a OPH_{free} e OPH_{fms} . Primeiro, a OPH_{fix} exibe valores comparativamente menores e constantes para o RMSD. Nesta simulação a enzima é conformacionalmente mais homogêneo, e mais similar à estrutura cristalográfica do que nas simulações OPH_{free} e OPH_{fms} . A OPH_{fix} mostra flutuações atômicas significativamente menores ao longo da região da alça correspondente aos resíduos 165-180. Os movimentos não-harmônicos para a OPH_{fix} apresentam amplitude muito menor e mais distribuída do que OPH_{free} e OPH_{fms} , como visto pelos autovalores de ED. Como essas diferenças podem ser rationalizadas para permitir a escolha de um modelo de confinamento mais realista, porém ainda computacionalmente barato?

As diferenças no RMSD para as posições dos átomos da OPH_{fix} e as demais simulações sugerem que o modelo de constrições posicionais reproduz com maior fidelidade o espaço conformacional reduzido imposto a enzimas do que o modelo *coarse-grained* (OPH_{fms}). Todavia, este modelo também suprime a flexibilidade dos resíduos da alça 165-180 devido às restrições harmônicas aplicadas aos átomos N $\ddot{\text{C}}$ da lisina 175. Esta região de alça está localizada na entrada do sítio ativo e contém a lisina carboxilada que coordena os pares de cátion Zn^{2+} nos dois monômeros, essenciais para a atividade catalítica da OPH. Portanto, considera-se que esta região participa na dinâmica da ligação e possivelmente da catálise do substrato pela OPH, por delimitar parte do sítio ativo. Isso corrobora com as simulações prévias, mostrando que esta região de alça é mais flexível na forma da OPH complexada com o substrato do que na forma livre (Soares *et al.*, 2007). Além disso, experimentos demonstram que a atividade da OPH capturada é governada pela orientação da enzima no poro FMS, que, por sua vez, é determinada, predominantemente, por interações eletrostáticas entre a enzima positivamente carregada e a superfície da FMS negativamente carregada (Lei *et al.*, 2008).

A OPH mostra um potencial eletrostático positivo espalhado sobre a superfície oposta ao sítio ativo (Figura 4.6). A orientação mais favorável para a ligação da OPH com a superfície eletronegativa do poro é via esta região posterior. Nesta orientação o sítio ativo e os resíduos 165-180 estão de frente para o centro do poro, e distantes dos grupos funcionais na parede. Portanto, a lisina 175 e resíduos vizinhos devem estar sob influência mínima da parede da FMS. Estes achados sugerem fortemente que restrições nas flutuações atômicas dos resíduos 165-180 são introduzidos pelas constrições de posição impostas.

As análises de dinâmica essencial das trajetórias de dinâmica molecular fornecem indícios sobre os movimentos de maior amplitude de uma proteína, por exemplo, os quais estão associados à função biológica.

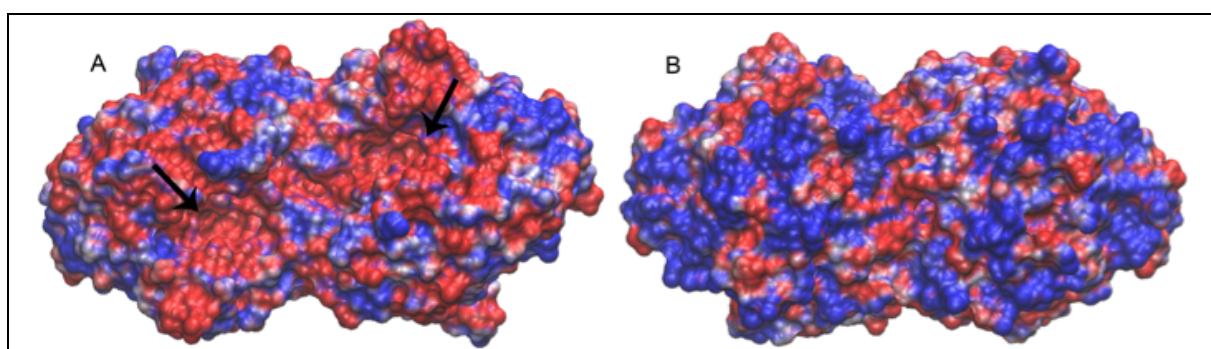


Figura 4.6 Representação do potencial eletrostático distribuído na superfície molecular da OPH. A) Vista frontal, as setas em preto indicam os dois sítios ativos. B) Vista de traseira, que faz face para a parede do poro. A cor azul representa potencial positivo, vermelho representa potencial negativo, em branco estão indicadas as áreas de potencial neutro. A escala para o potencial da superfície é dada de kT na faixa entre -5 a 5 kT .

O movimento não-harmônico de maior amplitude é consideravelmente menor para OPH_{fix} (0.31 nm^2) quando comparado a OPH_{free} (0.50 nm^2) e OPH_{fms} (0.57 nm^2) (Figura 4.4). As regiões da proteína que contribuem significativamente para estes movimentos são evidentes para OPH_{free} e OPH_{fms} (Figura 4.5). Em contraste, na OPH_{fix} , o movimento destas mesmas regiões é praticamente indistinguível do resto da enzima, como resultado, contribuem apenas marginalmente para esses movimentos de larga escala. Portanto, isso indica que o modelo de constrições posicionais suprime as flutuações conformacionais de toda a enzima de

forma não seletiva, claramente um sinal de uma representação não realista da OPH confinada.

Alem disso, esse modelo compromete a atividade biológica.

As reações enzimáticas envolvem, intrinsecamente, múltiplos passos cinéticos, interações complexas entre proteína-substrato, e substanciais mudanças conformacionais das proteínas (Boehr *et al.*, 2006). As taxas de flutuação entre moléculas individuais têm sido atribuídas a mudanças conformacionais das proteínas (Whitten *et al.*, 2005). Diferentes conformações do sítio ativo das enzimas são a razão primária para as diferenças na reatividade enzimática. Além disso, foi mostrado que mutantes da OPH com atividade catalítica distinta exibem dinâmica distinta (Soares *et al.*, 2007). Os resíduos que contribuem significativamente para a diferença conformacional entre estes mutantes estão confinados a regiões bem definidas da proteína. Assim é esperado que a supressão global das flutuações atômicas, independente da sua localização na estrutura da proteína, cause declínio na eficiência catalítica.

A comparação das curvas de RMSD e amplitude de flutuações para as três simulações mostraram que o modelo de constrições posicionais (OPH_{fix}) limita o espaço de fase da enzima, reduzindo o número de conformações acessíveis para a forma cataliticamente competente. Portanto, a dinâmica da OPH_{fix} é restrita a uma região do espaço configuracional diferente daquele amostrado pelas OPH_{free} e OPH_{fms} . Se apenas a análise de RMSD fosse considerada, a simulação OPH_{fix} aparentemente seria a que melhor descreveria o conjunto de configurações no entorno da estrutura cristalográfica. Entretanto, análises das flutuações e movimentos persistentes nos três sistemas revelam que a menor flexibilidade exibida pela OPH_{fix} é induzida pelo modelo de contrição posicional. Movimentos de larga escala estão geralmente associados com a atividade biológica e sua restrição deve levar a perda de atividade.

É provável que a supressão indiscriminada dos movimentos internos em toda a proteína se traduza no declínio da eficiência catalítica. Mesmo que a restrição dos estados desnaturalados possa estender a meia vida de uma proteína, uma redução excessiva das conformações nativas é inversamente relacionada a eficiência catalítica (Boehr *et al.*, 2006). Por outro lado, a interação entre o modelo *coarse-grained* da FMS e o modelo atomístico da enzima OPH não mostrou afetar os movimentos do estado nativo apresentados pela enzima em solução (OPH_{free}). Apesar da representação *coarse-grained* dos grupos funcionais produzir uma distribuição homogênea de cargas ao longo do material de sílica mesoporosa, é esperado que o potencial de força média associado com o modelo seja equivalente a de um sistema atomístico. Entretanto, a representação física do material mesoporoso através de um modelo atomístico ao invés da constrição de posições é crucial para determinar quantidades como coeficientes de difusão e taxas de colisão no ambiente confinado. Estes resultados apontam para uma abordagem em multi-escala como um modelo viável para proteínas confinadas.

As interações de proteínas com FMS são importantes para a compreensão do confinamento molecular e efeitos interativos. Esta compreensão é essencial para conduzir o planejamento de complexos enzima-FMS com maior densidade de proteínas e desempenho aprimorado para biosensor..

5 : O Papel das Interações Não-ligadas na Dinâmica Conformatacional da Organofósforo Hidrolase Adsorvida em Superfícies de Sílica Mesoporosa Funcionalizada.

Foi mostrado que a adsorção da OPH (ponto isoelétrico [pI] = 8.3) em FMS funcionalizada com grupos negativos [$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$] com baixa cobertura da superfície (2%) e pH 7.5 resulta na afinidade e eficiência ótimas, enquanto que a adsorção em FMS funcionalizada com grupos positivos [$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$] com alta cobertura (20%) leva a imobilização com eficiência significativamente menor (Lei *et al.*, 2002). Também foi mostrado que a OPH adsorve em superfícies mesoporosas de sílica não funcionalizadas na qual o grupo silanol de superfície é negativamente carregado, apesar disso a enzima exibiu baixa atividade enzimática específica. A partir destes resultados, foi proposto que as interações eletrostáticas fossem as forças predominantes governando a adsorção da OPH às superfícies de FMS. Entretanto, tal hipótese não é completamente compatível com a observação de que a OPH adsorve à superfícies funcionalizadas em baixa cobertura (2%) de grupos positivamente carregados [$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$], enquanto que o aumento da cobertura de grupos negativamente carregados [$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$] de 2 à 20% leva a uma diminuição acentuada na eficiência de imobilização (Lei *et al.*, 2002). Estes resultados aparentam indicar que outras interações têm papel importante em modular a adsorção de OPH em superfícies de FMS.

De fato, estudos anteriores de imobilização para diferentes enzimas sugeriram que o efeito hidrofóbico possui papel ainda mais importante do que se assumia na adsorção proteína-superfície FMS (Diaz e Balkus, 1996; Deere *et al.*, 2002; Chong e Zhao, 2004). Por exemplo, foi demonstrado que a imobilização da enzima penicilina acilase (pI = 7.0) em superfícies de sílica mesoporosa (SBA-15) funcionalizada com os grupos hidrofóbicos fenil-trimetoxi-silano e vinil-trietoxi-silano resultaram em taxas de adsorção e capacidade de

adsorção aumentadas comparadas com SBA-15 puro, que é negativamente carregado (Chong e Zhao, 2004).

Neste contexto, as simulações de dinâmica molecular podem fornecer caracterização em escala atômica para o papel das diferentes interações para a adsorção de proteínas em superfícies FMS (Van Gunsteren *et al.*, 2001; Adcock e Mccammon, 2006; Van Gunsteren *et al.*, 2006). Como base para compreender a natureza destas interações na adsorção e confinamento da OPH no suporte FMS, realizamos simulações da OPH livre em solução, bem como adsorvida em dois modelos *coarse-grained* para a FMS com grupos funcionais do tipo carboxil.

No capítulo anterior, dois modelos de confinamento foram estudados: **i.** restrição do movimento de resíduos Lisina na superfície e **ii.** arranjo de partículas com propriedades atômicas. Concluímos que o modelo de baseado no arranjo de partículas seria o mais adequado. Neste capítulo reaplicamos este modelo para reproduzir o arranjo espacial dos grupos funcionais na parede de sílica, desta vez variando os parâmetros atômicos das partículas. A superfície FMS é novamente representada como um cilindro no qual a curvatura e cobertura da superfície com o grupo funcional foi estimada de acordo com medidas experimentais (Feng *et al.*, 1997). Cada esfera representa um grupo funcional é espaçada entre si, de 1 nm, na proporção proteína/grupo funcional de 1:57.

No primeiro modelo de parâmetros para as partículas (FMS_{coul}), as interações de van der Waal (vdW) são virtualmente negligenciadas por representarmos o grupo funcional como um átomo oxiânion (O^-). No segundo modelo (FMS_{vdW}), os parâmetros de van der Waals para o grupo funcional acetato foram usados para aprimorar a contabilização destas contribuições.

O efeito de diferentes representações da superfície de FMS na dinâmica e propriedades de difusão da OPH foi investigada. Estas propriedades são caracterizadas em

análises tempo-dependentes da raiz do desvio médio quadrático (RMSD) para posições atômicas e para a raiz do desvio médio quadrático para as flutuações das posições atômicas (RMSF) tomando como referência a estrutura cristalográfica da OPH, o deslocamento médio quadrático (MSD) e as distâncias interatômicas da OPH em relação a superfície de FMS, área acessível ao solvente e conteúdo de estrutura secundária. A análise dos componentes principais para as simulações de dinâmica molecular foi utilizada para investigar os mecanismos pelos quais o confinamento em FMS conduz os movimentos locais e globais da OPH para conformações que amplificam a estabilidade e a competência catalítica.

5.1 Procedimento

5.1.1 Modelo da OPH

As estruturas cristalográficas de alta resolução para a OPH de *Brevundimonas diminuta* foram utilizadas como base para as simulações de DM (PDB ID 1EZ2 e 1HZY) (Benning *et al.*, 2000 2001). O análogo de substrato diisopropil-metil-fosfonato foi removido da estrutura 1EZ2 antes das simulações. O RMSD entre as posições atômicas das duas estruturas cristalográficas é de 0.02 nm e demonstra que as duas conformações são praticamente indistinguíveis.

As estruturas cristalográficas foram investigadas e os átomos não resolvidos foram reconstruídos quando necessário com o programa WHAT IF (Rodriguez *et al.*, 1998). As reconstruções de átomos só foram necessárias para os resíduos terminais. Os estados de protonação para os resíduos de aminoácido foram designados de acordo com cálculos de pKa com o programa propKa 2.0 (Bas *et al.*, 2008). Todas as simulações foram realizadas com o conjunto de parâmetros 53a6 do campo de forças GROMOS (Soares, T. A. *et al.*, 2004; Oostenbrink *et al.*, 2005a).

O sítio ativo de cada monômero da OPH contém dois átomos de zinco (Zn^{2+}), conectados por um ânion hidróxido e uma lisina carboxilada. O átomo de zinco e o ânion hidróxido foram tratados por um modelo não ligado. Este subsistema completo possui carga $+3e$. As cargas atômicas para o ânion hidróxido e para a lisina carboxilada foram designadas pelo método de ajuste hiperbólico restringido do potencial eletrostático (RESP) (Bayly *et al.*, 1993; Cornell *et al.*, 1993) para as posições nucleares de cada átomo, após otimização de geometria no nível HF/6-31G* com o programa NWChem (E. J. Bylaska, 2006) como descrito por Soares (Soares *et al.*, 2007). Este procedimento mostrou-se completamente compatível com o conjunto de parâmetros 53a6 do campo de forças GROMOS (Chandrasekhar *et al.*, 2003; Lins e Hünenberger, 2005; Soares *et al.*, 2005).

5.1.2 Modelo do FMS

As interações entre OPH e a superfície de FMS possuem dois componentes: de van der Waals, devido à natureza confinada da superfície mesoporosa, e eletrostático, devido à funcionalização do mesoporo com grupos químicos carregados. Para estudar o confinamento, assumimos que estas interações podem ser aproximadas por uma representação *coarse grained*, modelada como um arranjo cilíndrico e uniforme de partículas, cada uma correspondendo a um grupo funcional, separadas para representar a cobertura de grupos funcionais estimada experimentalmente (Feng *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 2002).

No modelo *coarse grained*, cada partícula incorpora os atributos atômicos (parâmetros de van der Waals e Coulomb) característicos de um dado grupo funcional, derivado de um campo de forças de mecânica molecular. A representação *coarse grained* de grupos funcionais permite a redução do número de graus de liberdade do sistema e, consequentemente, maior amostragem do espaço de configurações para a proteína. Para avaliar as contribuições relativas das interações eletrostáticas e de vdW para a adsorção da

OPH no FMS, dois modelos foram desenvolvidos para representar os grupos negativamente carregados comumente usados experimentalmente na imobilização da OPH em FMS.

No modelo FMS_{coul} , a superfície do poro foi representada por partículas de cargas pontuais, com carga $-1e$ e parâmetros de vdW correspondendo ao oxiâniônio. No modelo FMS_{vdW} , a superfície do poro foi representada por partículas pontuais de carga $-1e$ e parâmetros de vdW correspondentes aos grupos acetato (tipo de átomo P3) do campo de forças Martini (Marrink *et al.*, 2007).

A caracterização da superfície de potencial eletrostático da OPH demonstra que a face da proteína oposta ao sítio ativo exibe potencial eletrostático muito positivo (Figura 4.7), enquanto que a superfície contendo a entrada do sítio ativo exibe, em grande parte, potencial eletrostático negativo. Desta distribuição de carga ao longo da superfície da OPH, foi proposto que a face positivamente carregada da OPH seria atraída por interações eletrostáticas a superfície negativamente carregada da FMS, deixando a entrada para os sítios ativos exposta para o lúmen do mesoporo e livremente acessível para o trânsito de substratos e produtos (Gomes *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2008).

Como no capítulo anterior, a estrutura da OPH foi ancorada na parede do poro de FMS com base na complementariedade de cargas dos seus potenciais eletrostáticos calculados com o programa APBS. O sistema é ilustrado na Figura 5.1 e descrito na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Descrição dos sistemas simulados

Sistema	Número de átomos	Número de Partículas			Total de Átomos	Dimensão (nm)
		Proteína	Moléculas de Água	Íons	FMS	
OPH_{free}	6.472	27.765	0	0	89.769	0.8 x 0.90 x 13.0
FMS_{coul}	6.444	51.611	166	168	161.611	15.0 x 14.0 x 0.8
FMS_{vdW}	6.444	51.611	166	168	161.611	15.0 x 14.0 x 0.8

5.1.3 Preparação das simulações.

Os sistemas foram dispostos em uma caixa retangular, tratada em condições periódicas de contorno e solvatada com moléculas de água a partir do modelo SPC (Berendsen *et al.*, 1981). As cargas negativas resultantes foram neutralizadas com contra-íons Na^+ , quando necessário. As simulações foram realizadas no *ensamble* NPT, com o passo de tempo de 2 fs para integrar as equações de movimento baseadas no algoritmo *leapfrog* (Van Gunsteren e Berendsen, 1988). A temperatura do soluto e do solvente foi acoplada separadamente ao termostato *velocity-rescale* em 298.15 K com o tempo de relaxação de 0.1 ps. A pressão foi mantida a 1 atm por reescalonamento isotrópico das coordenadas com tempo de relaxação de 1 ps.

Os comprimentos de ligação e ângulos foram constringidos empregando-se o algoritmo P-LINCS (Hess *et al.*, 1997; Hess, 2008), e a geometria das moléculas de água foi constringida utilizando o algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman, 1992). Um raio de corte de duplo intervalo (*twin-range cut off*) de 1,0 e 1,2 nm foi utilizado para as interações de vdW, e as interações eletrostáticas além do raio de corte foram tratadas pelo método *Particle Mesh Ewald* (Essmann *et al.*, 1995).

Os sistemas foram inicialmente minimizados em 20.000 iterações a partir do algoritmo do máximo declive. Em seguida, as moléculas do solvente foram relaxadas durante 500 ps de DM a 298.15 K com restrições de posições aplicadas para os átomos pesados da proteína. O sistema como um todo foi então equilibrado por 10 ns, sem restrições de posição, seguido pela etapa de produção de dados de 40 ns. As configurações do sistema foram gravadas em arquivos de trajetória a cada 1.0 ps. O programa GROMACS v.4.04 (Hess *et al.*, 2008) compilado em precisão dupla foi utilizado para as simulações e análise de propriedades estruturais e dinâmicas. As trajetórias foram visualizadas com o programa VMD 1.86 (Humphrey *et al.*, 1996).

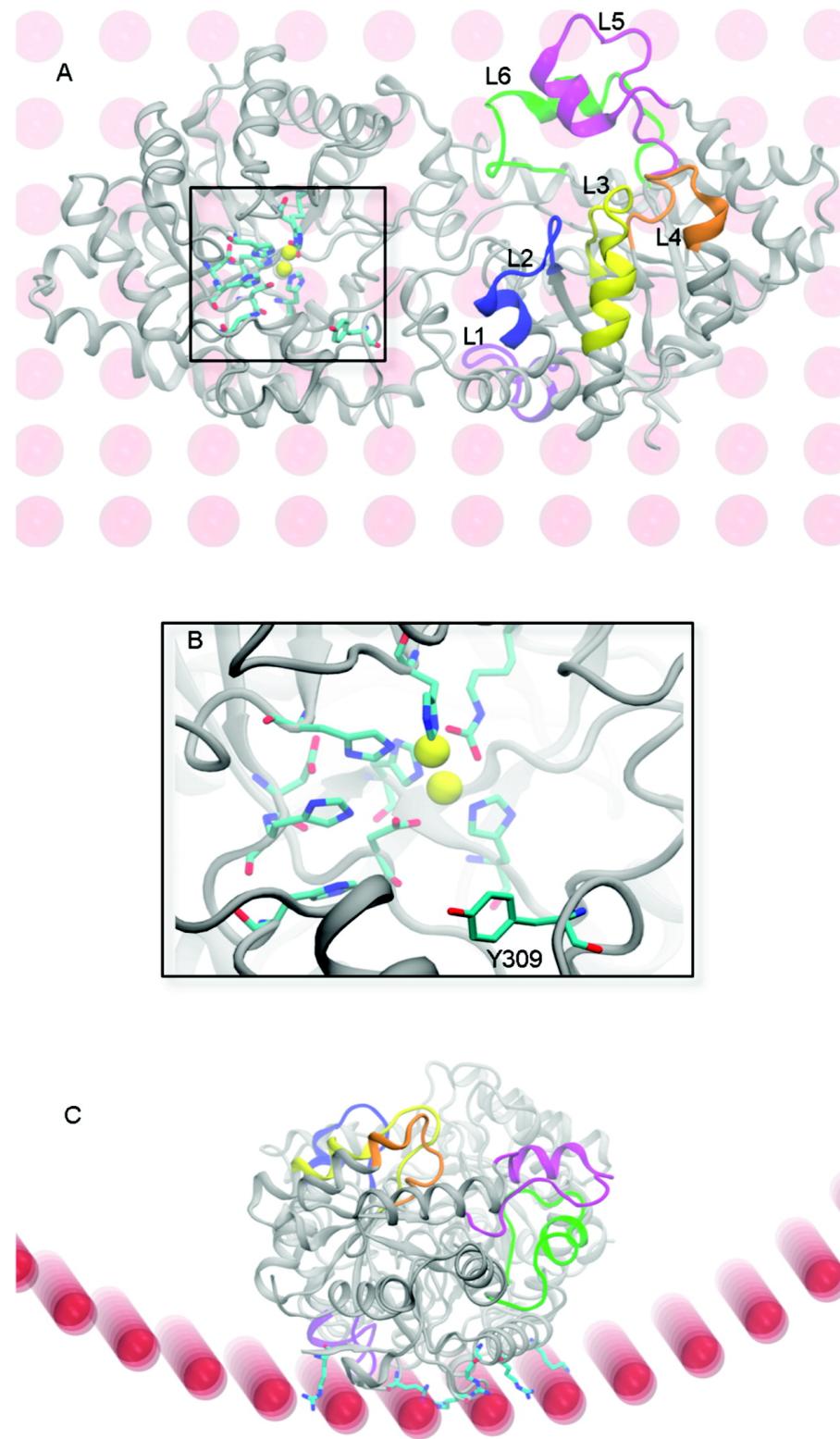


Figura 5.1: Representação em *cartoon* da estrutura da organofósforo hidrolase adsorvida na superfície de silica mesoporica. (A) Visão do topo do dímero de OPH. Regiões de grande flutuações atômicas nas simulações de DM são indicadas em violeta (*loop* L1, resíduos 155-165), azul (L2, resíduos 172-182), amarelo (L3, resíduos 201-215), laranja (L4, resíduos 230-240), roxo (L5, resíduos 255-275) e verde (L6, resíduos 306-325) apenas para um dos monômeros. (B) Vista aumentada do sítio ativo com resíduos representados em bastões e, em amarelo, os cátions Zn^{2+} pelo modelo Corey-Pauling-Koltun (CPK). O resíduo Y³⁰⁹ localizado na entrada do sítio ativo está indicado. (C) Vista lateral do dímero de OPH e FMS. Os resíduos carregados positivamente são apresentados pelo modelo de bastões. A sílica meroporosa funcionalizada é representada em CPK (vermelho). O modelo explícito para moléculas de água e íons do solvente foi removido para a exibição.

A interface entre os monômeros foi computada empregando o programa SurfinMD, desenvolvido pelo nosso grupo (Gomes *et al.*, 2009a). As propriedades calculadas a partir da trajetória como RMSD e RMSF, análise dos componentes principais (PCA), conteúdo de estrutura secundária, densidade de solvente, função de distribuição radial, e área de superfície acessível ao solvente (SASA) foram computadas utilizando os algoritmos implementados no pacote GROMACS.

5.2 Resultados

5.2.1 Caracterização estrutural da OPH em água pura e adsorvida em FMS.

O RMSD relativo às posições atômicas foi calculado para as simulações de DM para OPH_{free} , FMS_{coul} , FMS_{vdW} em relação à estrutura cristalográfica complexada (PDB ID 1EZ2 e 1HZY) (Benning *et al.*, 2000; Benning *et al.*, 2001) (Figura 5.2). O RMSD para as três simulações tende a um platô de 0.15 nm durante os primeiros 15 ns de simulação, indicando que a OPH inicialmente adotou uma conformação similar quando em água ou adsorvida na superfície FMS. Estes valores de RMSD permanecem praticamente estáveis para o conjunto de conformações das simulações FMS_{Coul} e FMS_{vdW} ao longo do tempo. Por outro lado, os valores de RMSD para o conjunto de conformações da simulação OPH_{free} continua crescendo tendendo a 0.2 nm após 20 ns de simulação.

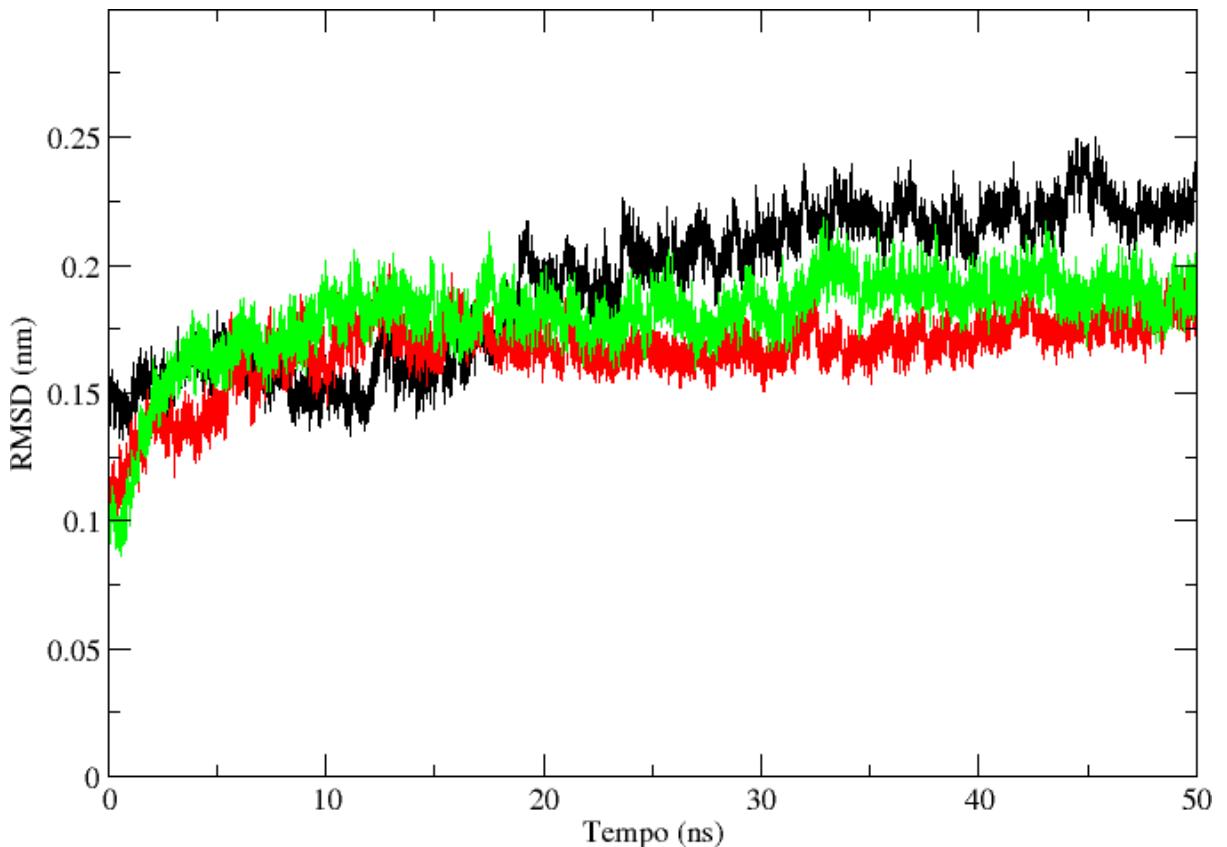


Figura 5.2 RMSD para as posições dos átomos do esqueleto peptídico da OPH em relação a estrutura cristalina (1HYZ) em função do tempo. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde). As trajetórias foram sobrepostas a estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico.

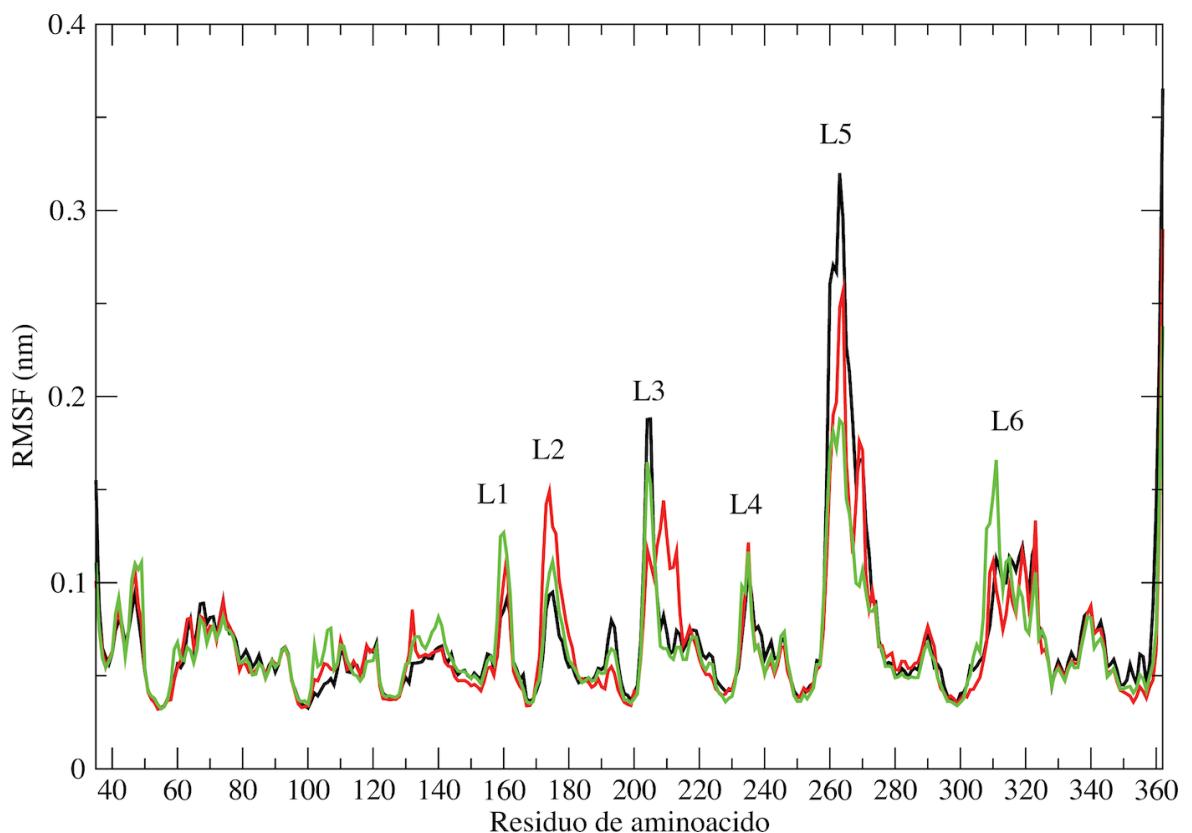


Figura 5.3 RMSF em relação as posições médias dos carbonos a em função do número do resíduo de aminoácido da sequência. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde). As trajetórias foram sobrepostas a estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico, com frequência de dados de 10 ps.

Portanto, a média de conformações da OPH desvia mais da conformação complexada ao substrato presente na estrutura cristalográfica quando em água do que quando adsorvida na superfície de FMS. Os valores de RMSF das posições atômicas das três simulações exibe padrão similar (Figura 5.3). As regiões de maior flutuação atômica são as mesmas para OPH_{free}, FMS_{Coul}, e FMS_{vdW}, elas correspondem aos motivos de *loop*.

Os *loops* L3 (resíduos 201-215), L5 (resíduos 255-275), e L6 (resíduos 305-325) estão situados na entrada do sítio ativo, enquanto que o *loop* L1 (resíduos 155-165) está localizado na interface monômero-monômero e na interface proteína-FMS. (Figura 4.2). *Loop* L2 (resíduos 172-182) também se encontra na interface monômero-monômero, porém numa região de baixo contato com a superfície da FMS.

Diversas tendências podem ser observadas ao se comparar o RMSF para as três simulações. Primeiro, a OPH adsorvida ao FMS exibe menor flutuação nos *loops* L3 e L5, que juntos delimitam a entrada do sítio ativo. Segundo, ela também apresenta maiores flutuações nos resíduos da interface monômero-monômero (resíduos 100-110, 130-140) quando comparados com a OPH em água. Já que o *loop* L2 não se encontra próximo a superfície de FMS, o aumento no deslocamento atômico nesta região sugere que as interações de longo alcance tenham papel importante na estabilidade dinâmica.

Finalmente, os valores de RMSF são particularmente grandes para os resíduos S³⁰⁸, Y³⁰⁹, e V³¹⁰ na simulação FMS_{vdW}. Estudos computacionais anteriores do tipo selvagem e mutantes de OPH ligados a paraoxon, sarim e soman, também reportaram aumento no deslocamento atômico para Y³⁰⁹ (Koca *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2007). Estas simulações mostraram que o deslocamento do resíduo Y³⁰⁹ leva a abertura e fechamento de um caminho para a cavidade do sítio ativo, e tem sido proposto que ele auxilia a saída do “grupo de saída” do bolsão hidrofóbico (Koca *et al.*, 2001).

Todavia, experimentos de mutação Y309F (tirosina para fenilalanina, na posição 309) falharam em encontrar qualquer diferença significativa na magnitude tanto do k_{cat} ou k_{cat}/K_M quando comparados com a enzima do tipo selvagem para a hidrólise do paraoxon ou dietil p-clorofenil fosfato (Aubert *et al.*, 1994). Não foram observadas mudanças significantivas no conteúdo de estrutura secundária nas simulações de DM (Tabela 5.2). Estes resultados estão de acordo com os experimentos de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para a OPH confinada em FMS (Chenghong e Et Al., 2006). Mudanças na dinâmica estrutural foram mais significantivas na interface monômero-monômero onde a área de contato decresce significantemente no conjunto de estruturas FMS_{vdW}, enquanto exibe um perfil muito similar as simulações OPH_{free} e FMS_{Coul} (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Propriedades estruturais médias para a OPH nas simulações de DM.

Sistema	Estrutura Secundária [%]			Superfície [nm ²]	Coeficientes de Difusão [cm ² s ⁻¹]	
	Hélice-α	Fita-β	Turn+coil	Acessível ao solvente		
OPH _{free}	45.0	12.6	33.1	455.2	140.7	3.69 x 10 ⁻⁷
FMS _{coul}	45.0	13.1	32.3	448.8	138.5	2.93 x 10 ⁻⁷
FMS _{vdW}	44.8	13.4	32.0	439.8	118.6	1.3 x 10 ⁻⁸
Experimental ^a						
Lisozima	-	-	-	-	-	~10 ⁻⁷ /~10 ⁻¹¹

^a Coeficientes de difusão em água (Dubin *et al.*, 1971) e adsorvido superfície de sílica oxidada (Hanasaki *et al.*, 2008), respectivamente.

5.2.2 Dinâmica da OPH em água e adsorvida nas superfícies de FMS.

A análise dos componentes principais (PCA) dos deslocamentos das posições atômicas em relação à estrutura média foi realizada para a OPH nas três simulações de DM (Garcia, 1992; Amadei *et al.*, 1993). Este tratamento matemático permite separar os movimento de baixa frequência e grande amplitude, que tipicamente determinam a cinética das reações enzimáticas, isolando-os de um grande número de movimentos de alta frequência.

A separação em componentes de alta e baixa frequência é obtida pelo cálculo dos autovalores da matriz de covariância, o que permite a extrapolação dos movimentos na direção dos autovetores (Garcia, 1992; Amadei *et al.*, 1993). Os modos de maior amplitude de uma PCA geralmente representam as transições dinâmicas mais lentas. Neste estudo, a PCA é empregado para descrever movimentos persistentes, de alta amplitude, da OPH durante as simulações de DM.

A amplitude dos componentes principais do movimento, calculada a partir das trajetórias de DM, indica que apenas alguns modos de movimento são suficientes para descrever a maior parte dos deslocamentos de grande amplitude da OPH nestes conjuntos de estruturas (Figura 5.4). Somados, os primeiros três autovetores contabilizam 40%, 34%, e 24% do total de movimentos de baixa frequência na OPH_{free} , FMS_{Coul} e FMS_{vdW} , respectivamente. A projeção dos autovetores correspondentes na sequência da proteína revela que os resíduos dos *loops* L3, L5 e L6 representam os contribuintes primários para os movimentos (Figura 5.5 e Figura 5.6).

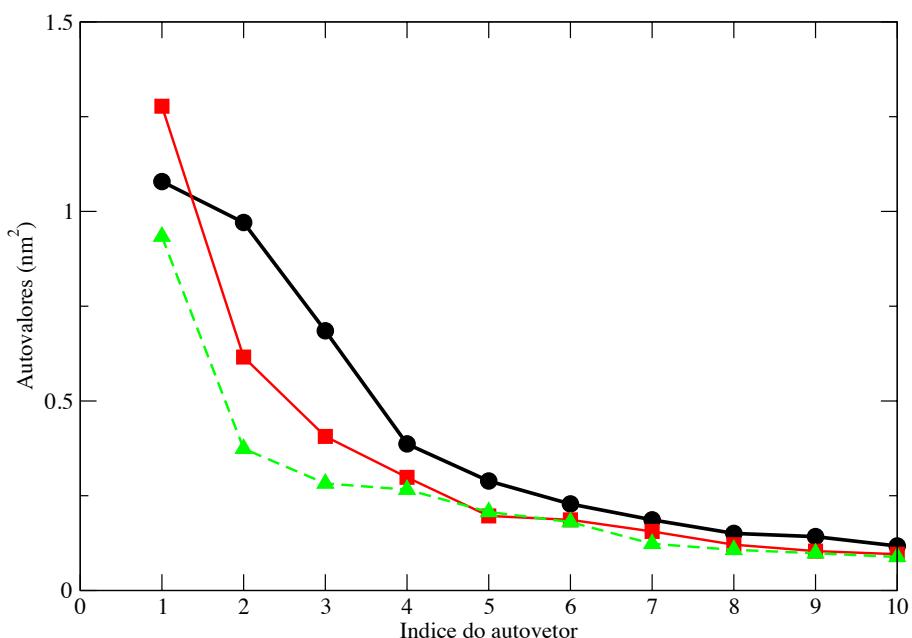


Figura 5.4 Autovalores dos 10 primeiros autovetores (os mais representativos), calculados a partir das trajetórias de dinâmica molecular para OPH_{free} (círculos pretos), FMS_{coul} (quadrados vermelhos), FMS_{vdW} (triângulos verdes).

Na OPH_{free} e FMS_{Coul} , as regiões de maior deslocamento atômico estão confinadas nos *loops* L3 e L5 na entrada do sítio ativo. Estes *loops*, entretanto, não contribuem significantemente para os movimentos de baixa frequência no FMS_{vdW} , onde o *loop* L6 exibe o maior deslocamento atômico. A persistência de deslocamentos grandes no *loop* L3 ao longo dos três primeiros autovetores para a simulação OPH_{free} indica que este *loop* se move de uma forma mais desordenada que na simulação FMS_{Coul} ou, de forma mais acentuada, na simulação FMS_{vdW} (Figura 5.5 e Figura 5.6).

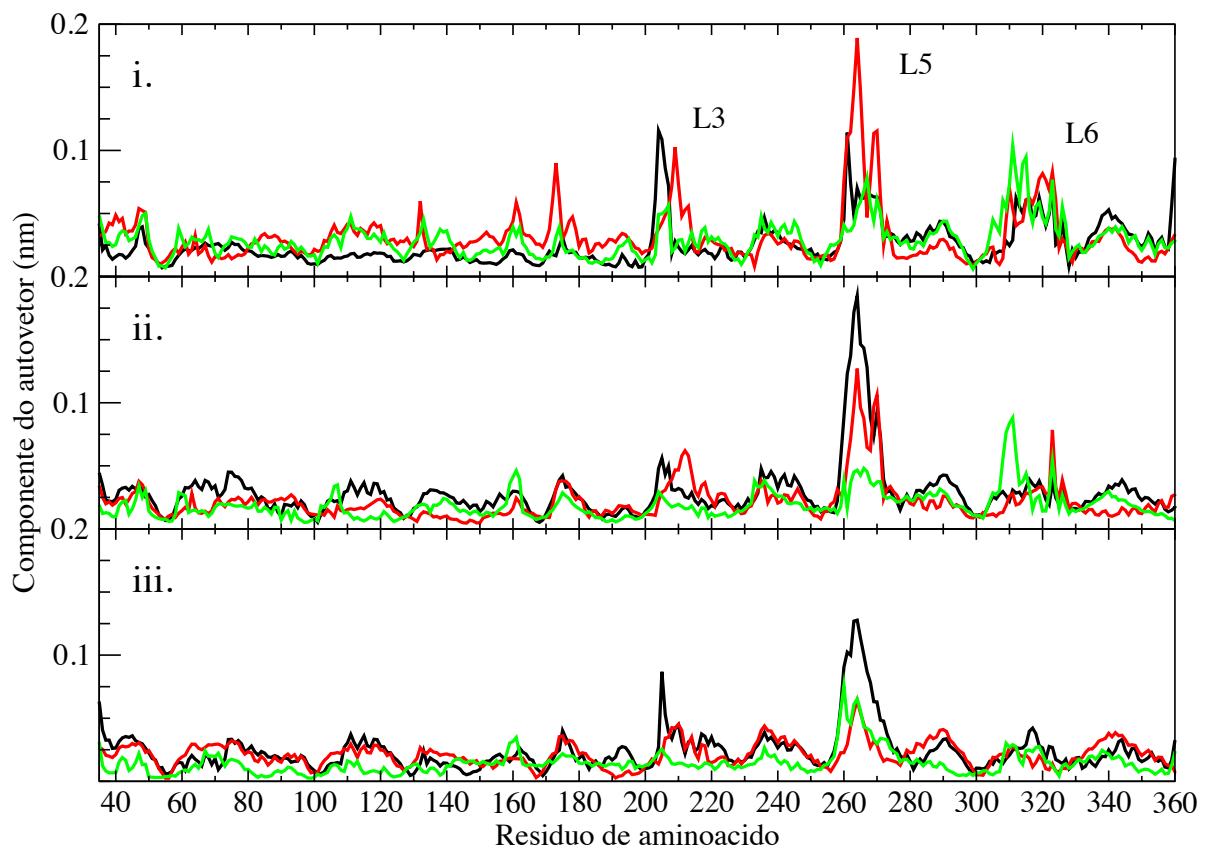


Figura 5.5 Deslocamento ao longo do primeiro (i), segundo (ii) e terceiro (iii) autovetores, calculados a partir das trajetórias de dinâmica molecular para OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho), FMS_{vdW} (verde).

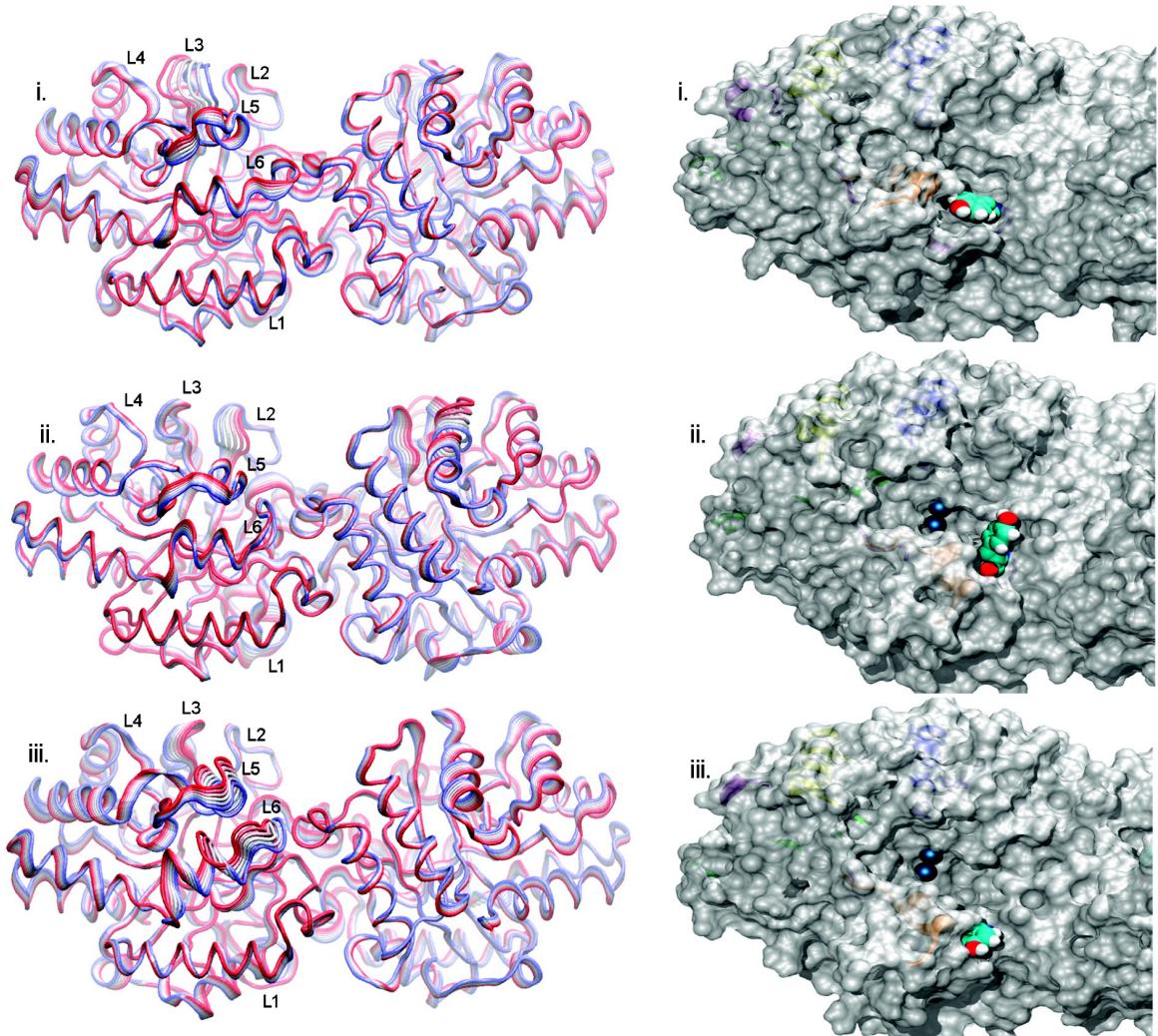


Figura 5.6: **Esquerda:** Projeção dos deslocamentos atômicos ao longo do primeiro autovetor na estrutura tridimensional da (i) OPH_{free}, (ii) FMS_{coul}, e (iii) FMS_{vdW}. A largura das fitas ilustra a amplitude do deslocamento. **Direita:** Superfície molecular para o instante 50.0 ns da trajetória para a OPH (i) OPH_{free}, (ii) FMS_{coul}, e (iii) FMS_{vdW}. O resíduo Y³⁰⁹ e os cátions Zn²⁺ estão representados em CPK.

5.2.3 Interações na interface proteína-superfície

O MSD para todos os átomos da proteína a partir de suas posições iniciais para a OPH em água e nos diferentes modelos para a superfície de FMS foi calculado para as trajetórias de DM (Figura 5.7). Estes valores de MSD exibem, em média, uma dependência linear com o tempo, porém esta propriedade não convergiu após 50 ns de simulação. Apesar disso, como dado qualitativo, estes valores ainda são úteis como proposta para comparar as diferenças relativas no comportamento de difusão da OPH em solução aquosa e adsorvida nas diferentes representações de superfície de FMS no nível microscópico.

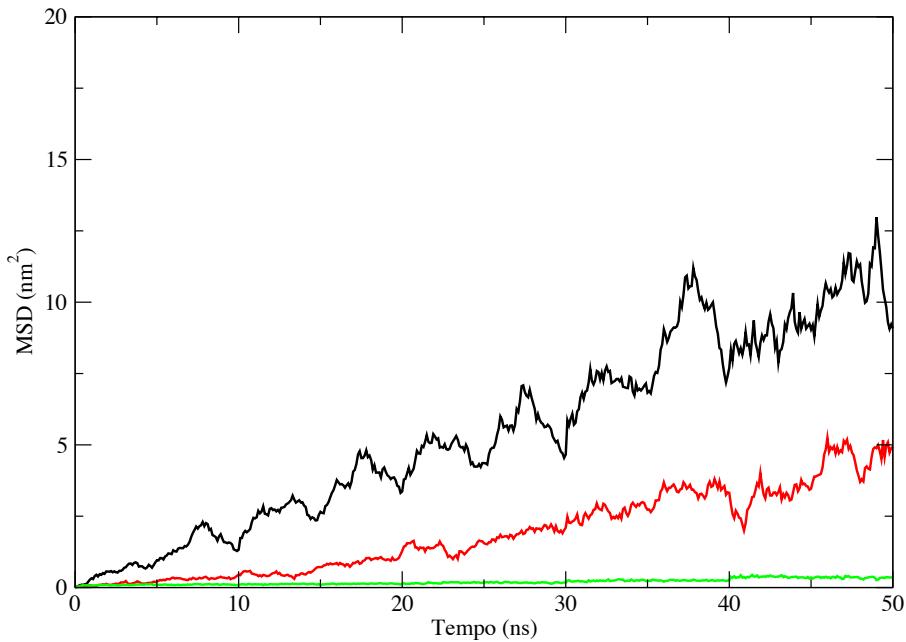


Figura 5.7: Deslocamento médio quadrático dos átomos da OPH a partir da posição original em 50 ns de simulação nas simulações OPH_{free} (preto), FMS_{Coul} (vermelho) FMS_{vdW} (verde)

As curvas de MSD diferem significativamente ao longo das simulações (Figura 5.7).

Na presença da superfície de FMS, a OPH exibe predominantemente difusão lateral ao longo do plano da superfície (eixos x e y) enquanto que em solução aquosa a proteína difunde aleatoriamente ao longo dos eixos Cartesianos. Observou-se que o MSD da OPH ao longo da superfície FMS_{Coul} foi maior do que ao longo da superfície FMS_{vdW}. Os coeficientes de difusão calculados para a proteína a partir do MSD nas formas OPH_{free}, FMS_{Coul}, e FMS_{vdW} foram 3.69×10^{-7} , 2.93×10^{-7} , e $1.3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4.2).

Os coeficientes de difusão calculados experimentalmente para a OPH em solução aquosa e em superfícies inorgânicas não estão disponíveis. Entretanto, coeficientes de difusão estimados para a enzima lisozima adsorvida em silica oxidada e superfícies vítrias são três ordens de magnitude menores do que aquelas em solução aquosa, que é $\sim 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Dubin *et al.*, 1971; Hanasaki *et al.*, 2008). A lisozima é bem distinta da OPH com respeito ao tamanho (163a.a. versus 662 a.a.), pI (pH 11 versus pH 8.3), e flexibilidade conformacional (lisozima é estabilizada por ligações disulfeto intramoleculares). Portanto, é esperado que os coeficientes de difusão para as duas proteínas adsorvidas em superfície de sílica seja distinto em seu valor

absoluto. Entretanto, pode ser racionalizado a partir do comportamento de difusão da lisozima, que proteínas geralmente exibem difusão muito reduzida quando adsorvidas, do que quando livres em água. A negligência dos parâmetros de interação de vdW, no modelo de superfície FMS_{Coul}, resulta em coeficiente de difusão para a OPH na mesma ordem de magnitude daquele livre em água.

A diferença na difusão da OPH nas simulações FMS_{Coul} e FMS_{vdW} também é refletida na média das distâncias de interação atômica entre OPH e superfície. A comparação entre a distância mínima entre pares de átomos da OPH e da superfície de FMS mostra um comportamento bastante distinto nos dois sistemas (Figura 5.8). Na escala de tempo de 50 ns, a distância mínima entre átomos na interface é quase invariável em 0.25 nm para o conjunto de configurações FMS_{vdW}, enquanto flutua entre 0.09 e 0.64 nm no conjunto FMS_{Coul}. Estes achados indicam que apesar das interações eletrostáticas serem suficientes para a ligação da OPH na superfície de FMS, as interações de van der Waals possuem papel fundamental na adesão a superfície.

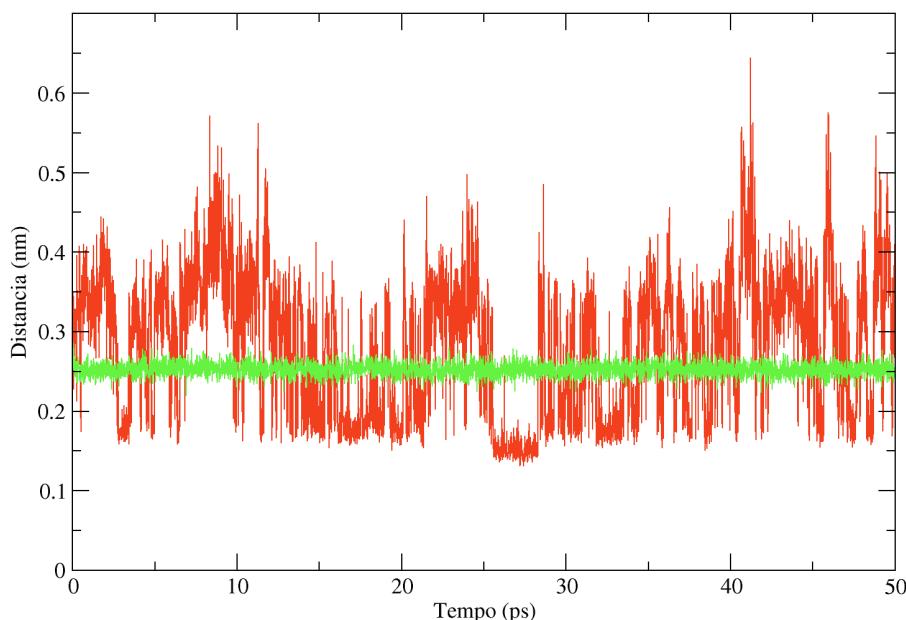


Figura 5.8 Distância mínima entre pares de átomos OPH e superfície FMS nas simulações FMS_{Coul} (vermelho) FMS_{vdW} (verde)

Os diferentes regimes de ligação entre a OPH e os dois modelos de superfície (Figura 5.9) estão relacionados aos padrões de hidratação distintos, na região de interface. A estrutura do solvente na interface proteína-FMS foi inferida através do cálculo da densidade de moléculas de água, bem como da função de distribuição radial (RDF) das moléculas de água em relação aos átomos N e O, das cadeias laterais dos resíduos da superfície da proteína, presentes na interface OPH-FMS (Figura 5.9). O RDF mostra que a interface OPH-FMS é menos hidratada no modelo FMS_{vdW}. A projeção da densidade do solvente nas coodenadas tridimensionais confirma que as diferenças de hidratação estão restritas na região de interface proteína-FMS. Em um raio de corte de 0.45 nm, existe um total de 139, 144 e 122 moléculas de água coordenadas pelos átomos das cadeias laterais na superfície de interação OPH-FMS, nas simulações OPH_{free}, FMS_{Coul}, FMS_{vdW}, respectivamente. Portanto, os padrões de hidratação locais para a OPH adsorvida ao modelo de superfície FMS_{Coul} e livre em água (OPH_{free}) são comparáveis, porém distintos do que foi observado para o modelo de superfície FMS_{vdW}.

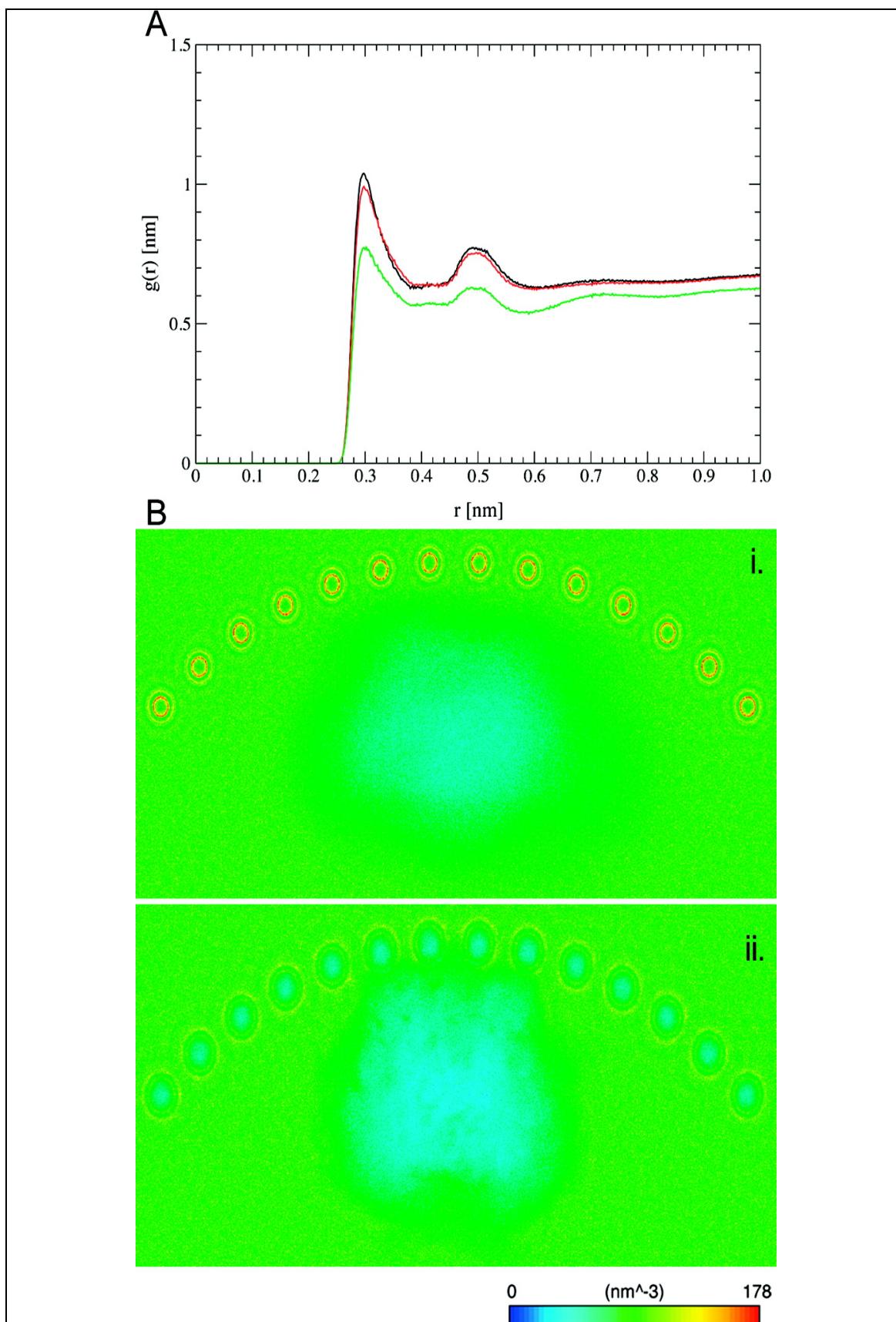


Figura 5.9: **(A)** Função de distribuição radial das moléculas de água em relação aos átomos N e O, das cadeias laterais dos resíduos da superfície da proteína, presentes na interface OPH-FMS. OPH_{free} (preto), FMS_{coul} (vermelho) e FMS_{vdW} (verde). **(B)** Densidade expressa pelo número médio de moléculas de solvente entorno da OPH nos modelos de poro FMS_{coul} (i) e FMS_{vdW} (ii). A representação do solvente é feita ao longo do eixo y.

5.3 Discussão

A representação das superfícies de FMS através de modelos *coarse grained*, com potenciais de interação distintos, pode fornecer informações valiosas sobre o efeito das interações não ligadas da superfície de FMS na dinâmica da proteína. Nesta abordagem, as interações entre a OPH e a superfície FMS podem ser genericamente agrupadas em dois componentes: vdW devido a natureza do confinamento na superfície mesoporosa, e eletrostático devido a funcionalização do mesoporo. Foi observado que o contato estérico imposto pela curvatura da superfície FMS induz, predominantemente, rearranjos locais da estrutura da proteína, enquanto que os potenciais de interação influenciam rearranjos estruturais locais e globais. Os rearranjos locais são predominantemente confinados aos *loops* na entrada do sítio ativo (Figura 5.6), o qual se torna mais acessível ao solvente e, possivelmente, aos substratos. O passo determinante da taxa catalítica de segunda ordem em enzimas com taxas de reação extremamente eficientes (10^{10} - $10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) corresponde à associação da enzima livre ao substrato livre.

A OPH hidrolisa o paraoxon com taxas limitadas pela difusão ($\sim 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em água) (Dumas *et al.*, 1989), entretanto, foi demonstrado, em uma série de experimentos com análogos do paraoxon, que o pK_a do grupo de saída é um fator limitante da velocidade de reação (Caldwell *et al.*, 1991). A partir disto, foi argumentado que a menor velocidade de reação da OPH comparada com enzimas supereficientes seria devido à um rearranjo conformacional após a ligação ao substrato (Caldwell *et al.*, 1991). De fato, nossos estudos sugerem que a OPH confinada em FMS adota um estado conformacional que pode facilitar a ligação de substratos, quando comparada com a OPH em solução, devido a maior exposição do sítio ativo, estabilidade dinâmica, orientação em relação a superfície e redução dos graus de liberdade de movimento interno.

Os rearranjos estruturais locais também são influenciados pela natureza das interações na interface OPH-FMS, como evidenciado pelos padrões de deslocamentos atômicos distintos e, também, pela projeção dos autovetores ao longo da sequência da proteína, calculados a partir das trajetórias das simulações de DM (Figura 5.6). As regiões de maior deslocamento atômico correspondem aos *loops* L3 e L5 na OPH_{free} e FMS_{Coul} e *loop* L6 na FMS_{vdW}. Nesta última, os *loops* L3 e L5 são estabilizados em uma conformação predominante, na qual o sítio ativo está mais exposto ao solvente. Os resíduos S³⁰⁸, Y³⁰⁹, e V³¹⁰ são os maiores contribuíntes para o deslocamento atômico do *loop* L6 levando à abertura e o fechamento de uma rota para a cavidade do sítio ativo, como previamente proposto por Soares (*et al.*, 2007) e Koca (Koca *et al.*, 2001).

Os diferentes potenciais de interação descrevendo a superfície de FMS também afetam a dinâmica da estrutura quaternária da OPH. A forte adesão proteína-superfície do conjunto de conformações FMS_{vdW} resulta no rearranjo entre os dois monômeros, o que produz um decréscimo de 20% e 18% na área de interface do dímero, em relação aos conjuntos de estruturas OPH_{free} e FMS_{Coul}, respectivamente (Tabela 5.2). Estes rearranjos da estrutura quaternária não produziram mudança significativa no conteúdo de estrutura secundária da OPH, concordando com medidas de FTIR para o confinamento da OPH em FMS (Chenghong e Et Al., 2006).

O papel das interações não ligadas para a adsorção da OPH em superfícies de FMS também foi investigado. Embora as interações eletrostáticas sejam suficientes para a ligação da OPH na superfície do poro, o desprezo das contribuições de van der Waals na representação do modelo de superfície de FMS leva à uma redução significativa da adesão proteína-superfície e ao aumento do número de eventos de adsorção (Figura 5.8). Os coeficientes de difusão calculados para as simulações FMS_{Coul} e OPH_{free} são uma ordem de magnitude maiores do que aqueles da simulação FMS_{vdW} (Tabela 5.2). Este último é mais

consistente com as medidas experimentais para coeficientes de difusão da lisozima adsorvida em sílica oxidada e superfícies vítreas, que corresponde a $\sim 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Dubin *et al.*, 1971; Hanasaki *et al.*, 2008).

Os diferentes regimes de adesão para os dois modelos de superfície estão relacionados a padrões distintos de hidratação na região de interface entre as superfícies da OPH e do modelo de FMS (Figura 5.9). A interface proteína-FMS é significativamente menos hidratada no conjunto de estruturas FMS_{vdW} do que nos sistemas OPH_{free} e FMS_{Coul} , nos quais os padrões de hidratação são comparáveis. A hidratação, comparativamente menor para o modelo de superfície FMS_{vdW} , implica em uma menor penalidade de desolvatação, sendo confrontada durante o processo de adsorção. Isso faz com que a adesão de proteínas a superfície de FMS_{vdW} seja mais forte do que na superfície FMS_{Coul} .

Foi demonstrado que a OPH é ótimamente imobilizada em superfícies de FMS funcionalizadas com grupos negativamente carregados e baixa cobertura (Lei *et al.*, 2002). Em sintonia com esta observação, a eficiência de imobilização é muito baixa para superfícies de FMS funcionalizadas com grupos positivamente carregados e alta cobertura (20%) (Lei *et al.*, 2002). Com base nestes achados, um mecanismo predominantemente eletrostático foi proposto como o responsável pela imobilização da OPH em superfícies funcionalizadas de FMS. De forma controversa, em alta cobertura com grupos negativamente carregados ($>20\%$) causa um rápido declínio na eficiência de imobilização do sistema. Além disto foi observado que a OPH é imobilizada, com eficiência significativa, em baixa cobertura de superfície com grupos funcionais positivos. Nossas simulações da OPH adsorvida em modelos de superfície FMS, descrita por diferentes potenciais de interação, mostraram que a adesão na interface é significantemente amplificada pelo incremento nas contribuições de van der Waals e suportam uma interpretação alternativa as medidas macroscópicas anteriormente mencionadas. Portanto, propomos que a adsorção da OPH na superfície de FMS

funcionalizada, tanto com grupos negativamente quanto positivamente carregados, é modulada não apenas pela atração das cargas opostas, mas também pelo incremento na hidrofobicidade devido à presença de grupos metíleno conectando os grupos funcionais com a parede do material mesoporoso. De forma resumida, mesmo que interações carga-carga sejam essenciais para a ligação da OPH com a superfície de FMS, um balanço entre contatos hidrofóbicos e interações eletrostáticas parece ser necessário para facilitar a desolvatação dos grupos funcionais da FMS e da adsorção da OPH à superfície. Enquanto os contatos de vdW aumentam a energia de interação OPH-FMS, as interações eletrostáticas conferem a especificidade.

O sucesso no desenvolvimento de um suporte mesoporoso para imobilização de proteínas requer o conhecimento detalhado das propriedades estruturais e de adsorção das proteínas alvo (Hudson *et al.*, 2008; Hanefeld *et al.*, 2009). Este conhecimento pode fornecer informações valiosas para o aumento da densidade de proteínas adsorvidas ao mesoporo, conjugado ao aumento da atividade específica, bem como para a modulação da hidrofobicidade ou anfifilicidade do suporte para difusão efetiva do substrato e produto através dos poros. Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para a enzima OPH livre em água bem como adsorvida em dois modelos de grupos funcionais do tipo carboxila cobrindo uma superfície de sílica mesoporosa (FMS) visando investigar o papel das interações não ligadas na dinâmica e na adsorção da proteína. No modelo FMS_{Coul} , as interações de van der Waals foram praticamente negligenciadas ao representarmos o grupo funcional como uma partícula que incorporava os parâmetros de van der Waals correspondendo a um oxiânon. Enquanto que, no modelo FMS_{vdW} , as interações de van der Waals foram consideradas através de potenciais de interação representando um grupamento acetato.

Foi visto que o contato estérico com a superfície FMS, bem como a natureza das interações de interface, modulam a dinâmica da estrutura da OPH para um conjunto diferente de estruturas. Rearranjos estruturais dos *loops* na entrada do sítio ativo aumentam sua acessibilidade ao solvente e, possivelmente, aos substratos, facilitando a ligação produtiva entre o substrato e enzima. De fato, a taxa de hidrólise do paraoxon pela OPH aparenta ser limitada por alterações conformacionais, dentre as quais estão as mudanças induzidas pelo substrato, como proposto por Caldwell e cols (Caldwell *et al.*, 1991). Os diferentes modelos para a superfície de FMS também afetam a dinâmica da estrutura quaternária da OPH, com decréscimo significativo da superfície acessível ao solvente para a interface entre do dímero de OPH no conjunto de estruturas da simulação FMS_{vdw} (Tabela 4.2). Estes rearranjos na estrutura quaternária não interferem no conteúdo de estrutura secundária, concordando com experimentos de FTIR (Lei *et al.*, 2006).

Foi visto que, apesar das interações eletrostáticas serem suficientes para a ligação da OPH à superfície da FMS, a negligência das contribuições de van der Waals na representação do modelo de poro da FMS levou a um decrescimo significativo dos eventos de adsorção/deadsorção proteína-superfície. A hidratação, comparativamente menor, do modelo de superfície FMS_{vdw} implica em menor penalidade de dessolvatação durante o processo de adsorção da proteína e melhor adsorção da proteína no modelo de superfície FMS_{vdw} do que no FMS_{coul}. Além disso, o coeficiente de difusão calculado para a simulação FMS_{vdw} é consistente com medidas experimentais de difusão para a enzima lisozima, adsorvida em superfícies vítrias (Hanasaki *et al.*, 2008). Quando completamente adsorvida ao modelo de superfície FMS_{vdw}, a OPH apresenta dinâmica na qual o sítio ativo da enzima é desobstruído pelo *loop* L6. Este achado, sugere que a atividade amplificada observada para a OPH confinada em FMS é um efeito combinado do confinamento e da adsorção de um conjunto de conformações, induzidas pela adsorção. Também argumentamos, com base nas simulações

presentes, que a adsorção de OPH em superfícies de sílica mesoporosa funcionalizada, tanto com grupos $[CH_2]_n-COO^-$ ou $[CH_2]_n-NH_3^+$, é modulada não apenas pela atração entre as cargas opostas, mas também pelo aumento na hidrofobicidade da superfície, devido a presença de grupos metíleno $[-CH_2]$ conectando o grupo funcional ao mesoporo.

6 : Desenvolvimento e aplicações de ferramentas para a modelagem molecular de nano estruturas funcionalizadas de sílica amorfa atomística

A biotecnologia tem o potencial de revolucionar a medicina. Esta ciência explora os processos biológicos para criar soluções tecnológicas, através da manufatura de dispositivos sintéticos, que podem interagir diretamente com a maquinaria celular, ou via alteração do *design* de moléculas biológicas, como as proteínas. Neste contexto, a modelagem computacional pode acelerar, eficientemente, o planejamento de biodispositivos, e permitir o projeto de máquinas biológicas. Contudo, as ferramentas computacionais e os métodos de modelagem ainda estão significantemente aquém do desenvolvimento observado em outras áreas das ciências da vida.

A modelagem computacional pode acelerar o processo de planejamento (*design*) de dispositivos biológicos sintéticos (bodispositivos), entretanto as ferramentas e os métodos de modelagem estão significantemente menos desenvolvidos que os demais métodos disponíveis para a pesquisa de ponta em ciências da vida. Com a experiência anterior, descrita nos últimos capítulos, sentimos a necessidade de suportes funcionalizados mais realistas para estudar a adsorção de biomoléculas. Com esta demanda, passamos então a desenvolver desenvolvemos as ferramentas e métodos descritos neste capítulo e os disponibilizamos como programas de código aberto, que interagem na forma de módulos com os programas *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (Humphrey *et al.*, 1996), *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD) (Phillips *et al.*, 2005), e *GROningen MACHine for Chemical Simulation* (GROMACS) (Hess *et al.*, 2008). Todos estes também disponíveis de forma aberta a comunidade.

6.1 Simulações de dinâmica molecular de dispositivos baseados em silício

A sílica amorfa (SiO_2) é um material inorgânico comumente empregado em circuitos semicondutores para isolar regiões condutoras. Devido à sua resistência mecânica, alta rigidez

dielétrica, e seletividade para modificações químicas, a sílica amorfa tornou-se também um material fundamental na microeletrônica e cromatografia. Devido a estas propriedades únicas, a sílica uma é plataforma ideal para uma grande variedade de aplicações como *microchips*, fibras ópticas, e lentes de telescópio. Na biologia molecular, a sílica é comumente empregada em resinas e pinças ópticas para o estudo das propriedades moleculares de sistemas biológicos (Unger, 1979; Moffitt *et al.*, 2008).

Recentemente, a sinergia entre a biologia molecular e a nanotecnologia possibilitou o desenvolvimento de diversas aplicações envolvendo macromoléculas e sílica, como a nanoeletrônica, estruturas de auto-montagem (*self-assembly*), microfluídica, tecnologia de microarranjos de DNA (*DNA microarray*) e sensores nanoporosos (Yauk e Berndt, 2007; Slowing *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Movileanu, 2009; Nilsson *et al.*, 2009). A Figura 6.1 ilustra um destes nanodispositivos, um nanoporo regular de sílica manufaturado em óxido de silício.

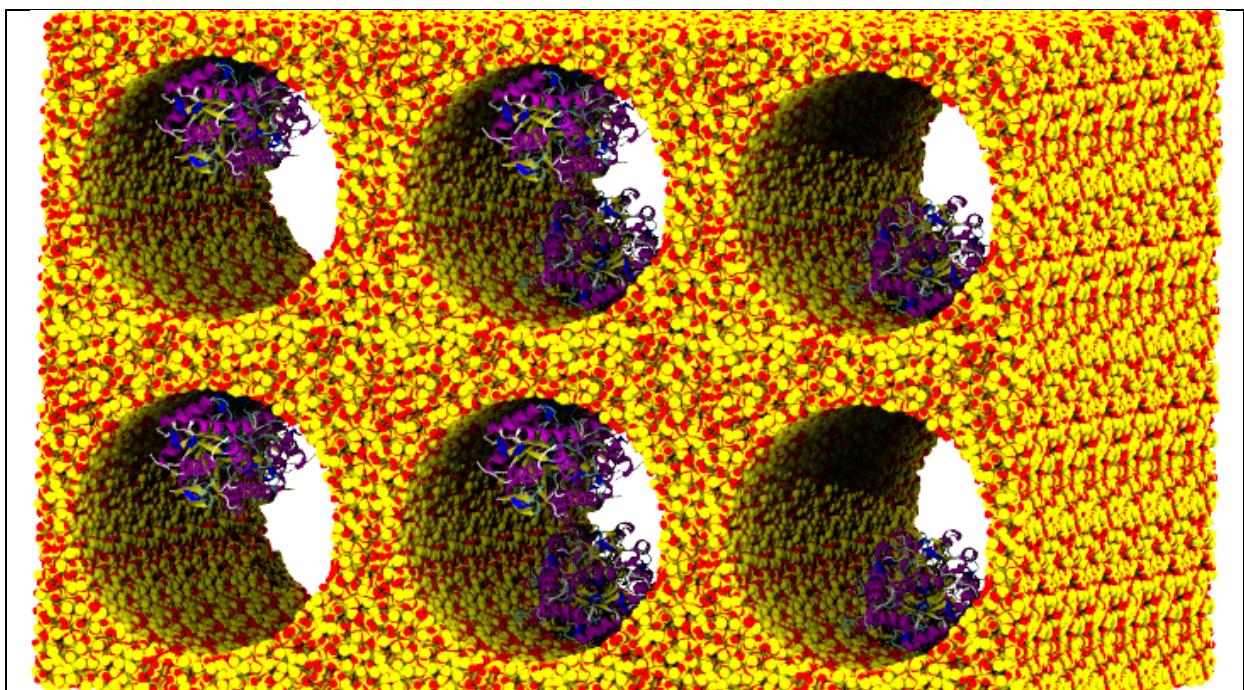


Figura 6.1 Ilustração de um nanoporo de sílica amorfa contendo cópias da enzima organofósforo-hidrolase.

Devido à estrutura irregular da sílica amorfa, não existem, atualmente, tecnologias experimentais suficientemente sensíveis para resolver a estrutura em escala atômica da

interface sílica-macromolécula. Como alternativa promissora, as simulações de dinâmica molecular permitem uma abordagem microscópica destes sistemas, oferecendo uma perspectiva simultânea de escala espaço-temporal para investigar estas interfaces. Sistemas moleculares que combinam sílica amorfa e macromoléculas biológicas (biomacromoléculas) impõem um grande desafio para os especialistas em modelagem pois, até recentemente, a parametrização dos campos de forças para simulações de biomacromoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, e de materiais inorgânicos, como a sílica amorfa, evoluiu de forma independente, o mesmo se aplica às ferramentas de *software*. A união da *expertise* adquirida em ambas as áreas vem sido realizada nos últimos anos por alguns grupos (Huff *et al.*, 1999; Wensink *et al.*, 2000; Guègan *et al.*, 2005; Cruz-Chu *et al.*, 2006; Van Der Spoel *et al.*, 2006; Hassanali, A. e Singer, S., 2007; Hassanali, A. A. e Singer, S. J., 2007; Lorenz *et al.*, 2008; Pedone *et al.*, 2008; Cruz-Chu *et al.*, 2009a; Hassanali *et al.*, 2009).

6.2 Modelagem de sistemas biomoleculares de silício

Historicamente, as metodologias para simulações de DM de sistemas biomoleculares e materiais inorgânicos foram desenvolvidas de forma independente. Como resultado, empregam campos de forças empíricos incompatíveis entre si, para descrever as interações inter-atômicas. Simulações de DM de tais sistemas requerem um campo de forças molecular compatível com campos de forças biomoleculares (Price e Brooks, 2002; Guvench e Mackerell, 2008), tais como AMBER (Cornell *et al.*, 1995), CHARMM (Brooks *et al.*, 2009), GROMOS (Oostenbrink *et al.*, 2004), OPLS (Jorgensen *et al.*, 1996). Outras ferramentas e métodos necessários incluem procedimentos para construir e simular materiais inorgânicos cristalinos ou amorfos, bem como representações não-atômicas de superfícies sintéticas.

6.2.1 Construção dos modelos em escala atômica para nanodispositivos inorgânicos

As nanoestruturas são construídas empregando um conjunto de operações convencionais que incluem replicação da célula unitária, definindo a forma dos nanodispositivos e especificando a conectividade dos átomos inorgânicos. Na literatura, este procedimento foi aplicado para construir nanoporos em membranas cristalinas de Si₃N₄ (Aksimentiev *et al.*, 2004; Rhee e Burns, 2007) e amorfas de SiO₂ (Cruz-Chu *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2008; Cruz-Chu *et al.*, 2009a; Cruz-Chu *et al.*, 2009b), para investigar a permeação mediada por campo elétrico de água, íons e DNA (Aksimentiev e Schulten, 2004; Heng *et al.*, 2004; Heng, Jiunn Benjamin *et al.*, 2005; Heng, Jiunn B. *et al.*, 2005; Maria e Et Al., 2006).

Recentemente, um método para construir estruturas de nanodispositivos foi implementado como extensão (*plugin*) (Aksimentiev *et al.*, 2009) do programa VMD 1.8.7 (Humphrey *et al.*, 1996). O *plugin Inorganic Builder* pode gerar estruturas moleculares para redes cristalinas de materiais relevantes para interfaces com materiais biológicos, como Si, SiO₂, Si₃N₄, Au e grafite. É possível selecionar o material e sua modificação cristalina a partir de uma lista de estruturas em um banco de dados, especificar o tamanho e a forma do sistema, bem como ajustar as condições de contorno desejadas. Para gerar as superfícies amorfas desta Tese, o bloco de SiO₂ utilizado, foi o disponível no banco de dados do *Inorganic Builder*. Este bloco foi produzido originalmente por ciclos de recozimento simulado (*simulated annealing*), partindo da estrutura cristalina de SiO₂, de acordo com o protocolo desenvolvido por Huff (Huff *et al.*, 1999; Cruz-Chu *et al.*, 2006).

6.2.2 Modelagem de superfícies amorfas de SiO₂.

Uma característica dos materiais baseados em silício, incluindo o silício puro, é a presença de uma camada amorfá de SiO₂ na superfície, cobrindo a área mais exposta a água, esta camada é responsável pelas propriedades de superfície do material. Em meio aquoso - ou

em contato com umidade, devido à condensação - grupos funcionais silanol (-SiOH) ou siloxano (-SiO-) são formados na superfície da sílica, com estados de protonação variando com o pH do ambiente (Shchukarev *et al.*, 2004). O estado de protonação e a carga de superfície resultante influenciam a adsorção de biomoléculas e íons na superfície inorgânica, constituindo parâmetros críticos à modelagem do nanodispositivo.

Com base em simulações de Huff (Huff *et al.*, 1999), Cruz-Chu e colaboradores desenvolveram um método para modelar superfícies amorfas de SiO₂, onde um conjunto de passos de DM é realizado (Cruz-Chu *et al.*, 2006), gerando modelos reproduzem corretamente as características estruturais de superfícies amorfas de SiO₂ produzidas experimentalmente (Cruz-Chu *et al.*, 2006; Hassanali, A. e Singer, S., 2007; Lorenz *et al.*, 2008). Uma vantagem do modelo é que as superfícies resultantes podem ser refinadas para produzir outras formas quimicamente modificadas de SiO₂, como, por exemplo, para produzir modelos para nanodispositivos baseados em silício, como nanoporos (Heng *et al.*, 2004), nanofios (Huff *et al.*, 1999), e sistemas nanoflúidos (Wanekaya *et al.*, 2006).

Desenvolvemos algoritmos baseados no método de Cruz-Chu (Cruz-Chu *et al.*, 2006) para introduzir grupos hidroxila na superfície exposta. Seguindo um mecanismo de abertura de anéis envolvendo dois átomos de silício (anel 2M), estudado por diversos grupos (Ceresoli *et al.*, 2000; Bakos *et al.*, 2002; Masini e Bernasconi, 2002; Claus e Et Al., 2005), partimos de uma estrutura modelo, em que grupos hidroxila são gerados por rompimento de anéis 2M, em ligações siloxano (-SiO-), na superfície. Cada ligação -SiO- rompida produz átomos Si e O com valência livre, que são subsequentemente convertidos em um par de grupos hidroxila, permitindo que a concentração destes grupos seja precisamente controlada. Estendemos a aplicação original do método permitindo que, ao invés de apenas prótons ou grupos hidroxila, qualquer tipo de átomo ou molécula seja adicionado na superfície com enfoque em pequenos peptídeos ou moléculas orgânicas; tais superfícies cobertas com moléculas orgânicas são

comuns em aplicações biotecnológicas, como microarranjos de DNA (*DNA microarrays*) e resinas cromatográficas.

6.3 Princípios do desenvolvimento dos programas

A seguir, descrevemos os métodos e algoritmos desenvolvidos para a construção das superfícies funcionalizadas de sílica amorfa. Este esforço gerou o *NanoSurface Tools*, um pacote de ferramentas computacionais para auxiliar a construção de nanodispositivos de sílica amorfa funcionalizada. O pacote *NanoSurface Tools* inclui os programas: **pdb2psf**, **b4_breakbonds**, **breakbonds**, **add_function**, e uma série de scripts na linguagem TCL para serem usados com o programa VMD.

Desenvolvemos o *NanoSurface Tools* com a expectativa de um pacote de softwares livres e amigáveis para atrair usuários de áreas diversas. Nesse sentido, seguimos o modelo de interface de programação de aplicativo (API), que permite grande portabilidade do código e facilita a incorporação de suas rotinas virtualmente em qualquer outro programa. O desenvolvimento do programa foi guiado pelos seguintes princípios:

- ser restrito aos seus objetivos e não incorporar outras funções, por exemplo, construção de modelos moleculares ou funções de análise;
- ser claro, de fácil uso, com manual, tutoriais e código comentado, minimizar erros e emitir mensagens de erro e de atenção sempre que necessário;
- ser modular, flexível e extensível a novas aplicações, possibilitar o uso de rotinas externas, inserção de bibliotecas matemáticas otimizadas e diferentes funções de energia, inserção de rotinas para *hardwares* específicos (GPU's, por exemplo);
- compilar e executar com independência de *hardware* e ter bom desempenho em diferentes arquiteturas.

6.4 Método

6.4.1 Construção da sílica amorfa

A sílica, SiO_2 é encontrada na natureza em diversas formas amorfas e cristalinas. Várias estruturas de sílica cristalina foram resolvidas por difração de raios-X e depositadas em bancos de dados de mineralogia. Para construir a estrutura de sílica amorfa pode se partir de um molde cristalino (ex. α -quartzo), replicado no espaço ou, então, de um bloco de sílica amorfa previamente calculado (Figura 6.2). Caso a estrutura inicial seja um cristal, é necessário submetê-lo a um protocolo de *simulated annealing* para amorfizar a estrutura, usando simulação por Dinâmica Molecular ou Monte Carlo. Se o bloco da sílica amorfa não estiver de acordo com as dimensões requeridas para o uso projetado, este deve ser cortado ou replicado e aplicado um protocolo de amorfização adequado (Cruz-Chu *et al.*, 2006) (Figura 6.2).

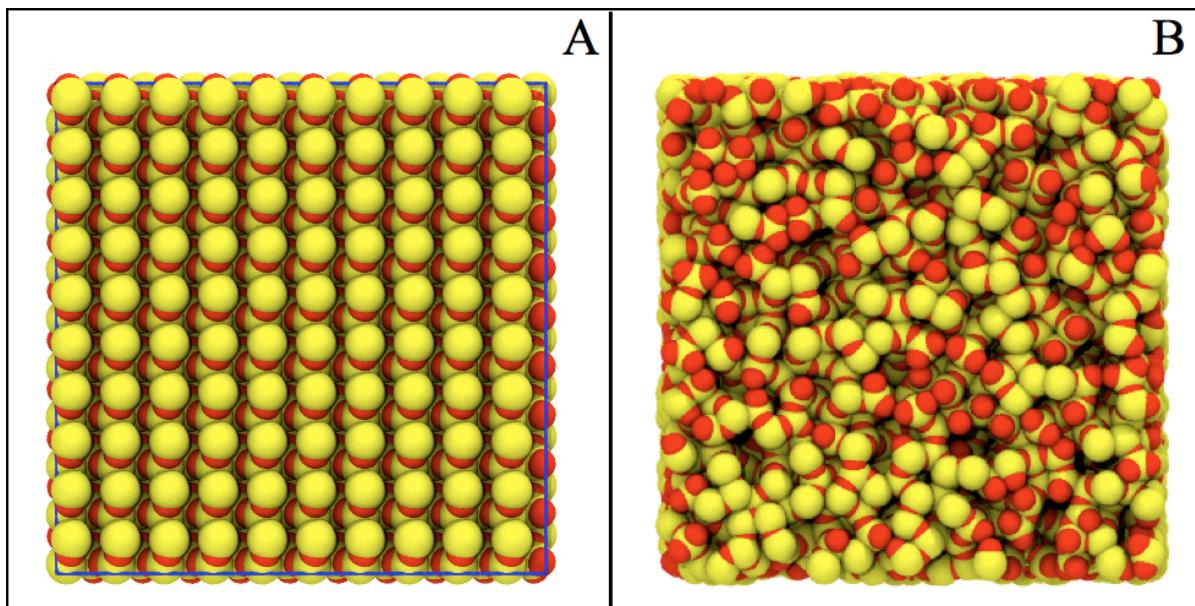


Figura 6.2 Blocos periódicos de sílica construídos usando o *plugin Inorganic Builder* no programa VMD 1.8.7. Os átomos são representados pelo modelo de esferas de van der Waals, em amarelo os átomos de silício, em vermelho os átomos de oxigênio. A) Bloco de sílica cristalina produzido por replicação da célula unitária de α -quartzo. B) Bloco de sílica amorfa produzido por ciclos de *simulated annealing* por dinâmica molecular usando o programa NAMD-Lite

A partir da versão 1.8.7 o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) incorporou o módulo *Inorganic Builder*, um conjunto de rotinas que agiliza o processo de criação de

moléculas inorgânicas, provendo estruturas e funções para manejo de compostos inorgânicos.

Neste trabalho o programa VMD é usado intensamente como plataforma para o manejo da sílica, visualização e análise das simulações. Nesta seção descrevemos a construção da superfície para as simulações de dinâmica molecular (Figuras 6.2-6.8). Ao longo do texto, demonstramos os comandos para a execução das tarefas.

6.4.1.1 Construção da estrutura:

Nesta seção é apresentado um fluxo para a construção de uma superfície de sílica amorfa com 20 Å (Figura 6.3), a partir do molde disponibilizado pelo *Inorganic Builder*. Primeiro, abrir o programa VMD e executar o módulo *Inorganic Builder*. No menu de opções, selecionar *Amorphous SIO* como estrutura molde. Definir o número de replicações em X Y e Z. Finalmente, ajustar o tamanho do sistema utilizando a ferramenta de seleção de exclusões para restringir a construção da estrutura em uma superfície: *Add exclusion*. *VMD Selection: z > 10 or z < -10*. Criar o modelo usando o *Build device*.

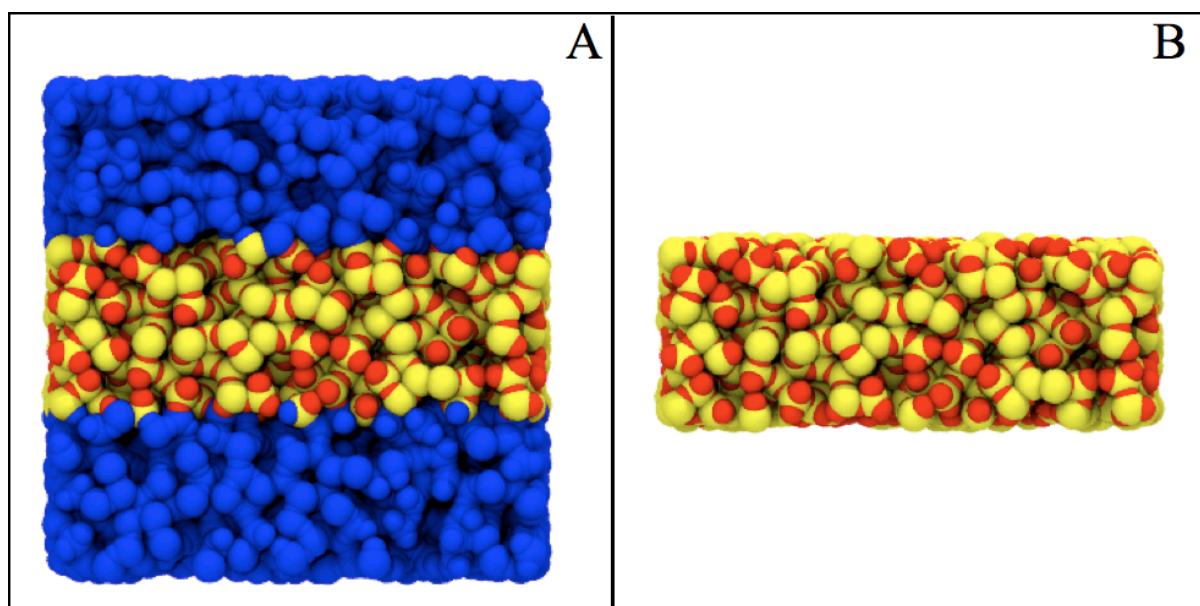


Figura 6.3 Ilustração do processo de criação da superfície a partir do bloco de sílica amorfa (mostrado na Figura 6.2B). O bloco está orientado no eixo Z. Os átomos a 20 Å do plano central da superfície são selecionados (**A** em azul) e removidos (**B**). O bloco originalmente é periódico em X, Y, e Z, e o processo remove a periodicidade no eixo Z deixando um espaço vazio (vácuo) acima e abaixo da superfície.

6.4.1.2 Cobertura da superfície de sílica amorfa

Ao cortar a estrutura cristalina ou amorfa na forma desejada, geralmente são geradas imperfeições na dimensão onde a periodicidade é interrompida (Figura 6.4). Estas imperfeições são: **i.** assimetria de cargas, onde é interrompida a proporção de 2:1 do número de átomos de oxigênio e silício, **ii.** átomos de superfície com número de ligações insuficiente (insaturados), **iii.** frequentemente o corte do bloco para formar a superfície produz átomos livres (sem nenhuma ligação). Para corrigir estas imperfeições, criamos um programa denominado **step1.tcl** na linguagem TCL, nativa do VMD (Comando 6.1). Em resumo, o programa **step1.tcl** realiza as seguintes funções: **i.** Corrige as propriedades atômicas: nome, tipo, carga e massa, **ii.** Encontra os átomos de superfície e do interior, **iii.** Assinala os átomos de interior com o valor 1.0 no campo do fator-B, e **iv.** Neutraliza o sistema removendo aleatoriamente átomos livres, e átomos com número de ligações incompleto: átomos de silício e de oxigênio com menos de três e duas ligações respectivamente; e **v.** Escreve os arquivos de saída. (Comando 6.1)

```
vmd -dispdev text ASiO2.psf ASiO2.pdb < script1.tcl > script1.log
```

Comando 6.1

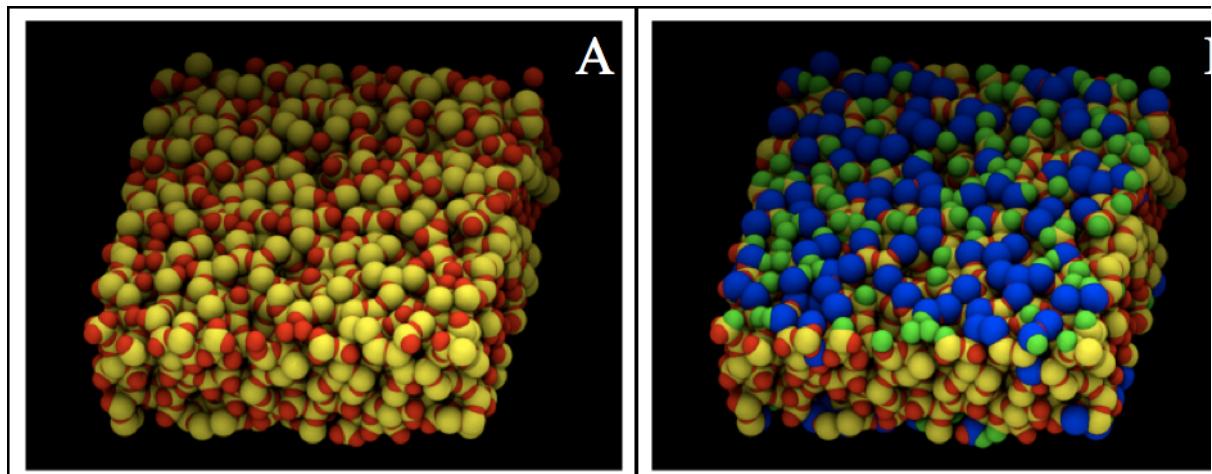


Figura 6.4 Artefatos produzidos pelo corte da superfície de sílica amorfa. A) Superfície da Figura 5.3 B) Assinalamento dos átomos com numero de ligações incompleto. Em azul os átomos de silício com menos de quatro ligações, em verde os átomos de oxigênio com menos de duas ligações.

6.4.1.3 Otimização e amorfização da estrutura

Após construir a estrutura é necessário otimizar o sistema, minimizando a energia. Não se pode, ao certo, especificar todas as conectividades entre os átomos. É necessário dar liberdade para a sílica amorfizar, redistribuindo os átomos e fechando lacunas frequentemente existentes na superfície. Neste ponto utilizamos os parâmetros estabelecidos no modelo BKS (Van Beest *et al.*, 1990), fundamentados no potencial de Buckingham (ao invés do tradicional potencial de Lennard-Jones). Os parâmetros para o modelo proposto por Van Beest e colaboradores para a sílica são apresentados na Tabela 6.1 e aplicados segundo a seguinte formulação:

$$V_{ij} = \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + A_{ij} \exp(-B_{ij} r_{ij}) - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \quad \text{Equação 6.1}$$

Para esta etapa foi utilizada a ferramenta NAMD-Lite (Hardy, 2007), gentilmente cedida pelo Dr. David Hardy. O NAMD-Lite é uma derivação do programa NAMD, desenvolvida com parâmetros de potenciais específicos para a sílica.

Tabela 6.1 Parâmetros do campo de forças BKS

Parâmetros de curto alcance				Carga atômica
Átomos (i-j)	A _{ij} (eV)	B _{ij} (Å ⁻¹)	C _{ij} (eV Å ⁶)	
O – O	1388.7730	2.76000	175.0000	q _O = -1.2
Si – O	18003.7572	4.87318	133.5381	q _{Si} = 2.4

A otimização da estrutura com o método do gradiente conjugado por 1–5 mil passos, variando com o tamanho do sistema, é suficiente para corrigir grande parte dos defeitos produzidos pelo corte do bloco em uma superfície. Este processo minimiza a energia potencial do sistema, eliminando as colisões moleculares e ajustando as distâncias das ligações químicas (não definidas explicitamente). Em seguida a sílica é amorfizada por simulação de dinâmica molecular (partimos de um bloco amorfo, portanto não é necessário

realizar novo ciclo de *annealing*). A estrutura final da DM é finalmente submetida à uma rápida otimização (mil passos).

Constatamos que é fundamental monitorar a estrutura constantemente pois é freqüente que átomos atinjam energias/velocidades muito grandes e desestabilizem rapidamente o sistema. Isto se deve às: **i.** altas temperaturas iniciais do *simulated annealing* (quando realizado), **ii.** característica do campo de forças BKS (apenas interações não ligadas), e **iii.** irregularidade dos átomos (devido ao corte no bloco de sílica). Como trabalhamos com uma superfície não-periódica (no eixo Z, apenas em X e Y), deve-se observar uma peculiaridade do BKS em migrar os átomos de oxigênio para a superfície (interface sílica-vácuo), gerando superfícies polarizadas. Todo o procedimento de otimização pode ser agilizado otimizando-se apenas os átomos da superfície.

Por simplicidade, ao final da otimização e dinâmica molecular, a periodicidade deve ser removida (transladando os átomos de volta a célula original) usando o *script* **fixpbc.tcl**.

6.4.1.4 Preparação da superfície

Nesta etapa foi construída a topologia para a estrutura final da sílica produzida anteriormente. Foram designados os parâmetros atômicos, cargas e topológicos. Até aqui, com exceção dos átomos internos fixos, não existe distinção entre átomos de superfície ou interior. Os programas livremente disponíveis para manipulação de biomoléculas, inclusive o VMD até a versão 1.8.7, têm dificuldade em atuar corretamente na construção de topologias para as estruturas de sílica. Isso se deve, essencialmente, à inexistência de rotinas específicas para lidar com estes materiais, com produto da evolução divergente, discutida previamente. Para simular as superfícies de sílica funcionalizadas identificamos que seria necessário: **i.** Construir topologias para sistemas de milhões de átomos produzindo ligações, ângulos e diedros próprios, **ii.** Ser capaz de lidar com estruturas amorfas de SiO₂ (complexas), **iii.**

Romper ligações químicas para permitir adição de grupos funcionais, e **iv.** Adicionar um grupo funcional qualquer.

6.4.1.5 Criação das ligações químicas

Desenvolvemos o programa **pdb2psf**, que analisa a estrutura e determina as ligações baseado no critério de distância. A distância média das ligações Si-O é de $\sim 1.6 \text{ \AA}$. Na prática, usamos 2.0 \AA , atendendo a variações da estrutura. Em média, o campo de forças BKS gera estruturas com distâncias inter-atômicas compatíveis com quatro ligações para o silício e duas para oxigênio, porém é comum, na distância de 2.0 \AA , surgirem átomos de silício ligados a 5 átomos de oxigênio no interior da estrutura. O programa **pdb2psf** sinaliza estes eventos porém, como os átomos internos estarão fixos, isto não interfere na estrutura. Além disso, é comum a geração de pares oxigênio-oxigênio, silício-silício, compatíveis com o critério de distância. Desenvolvemos o código **pdb2psf** com uma rotina peculiar para a sílica (*fail-safe SIO*) que atua impedindo a formação de ligações silício-silício e oxigênio-oxigênio. (Comando 6.2)

<code>pdb2psf -i stepA.pdb -bonds -d 2.0 -o stepB.psf</code>	Comando 6.2
--	-------------

6.4.1.6 Tratamento dos artefatos de simulação

O modelo BKS, foi desenvolvido para reproduzir propriedades do interior (bulk), com isso é comum que, durante as simulações de MM (EM e DM) para a sílica, surjam artefatos na superfície como: **i.** átomos livres, **ii.** grupos de átomos livres, e **iii.** átomos de silício ligados a apenas um átomo de oxigênio. Para corrigir estes artefatos, desenvolvemos o programa **b4_breakbonds**.

6.4.1.7 Análise e ajuste da densidade de grupos de superfície.

A superfície da sílica (independente de se apresentar originalmente em forma cristalina ou amorfa) tende a ser amorfa. Quando em contato com a umidade a superfície

interage com água e é protonada e hidroxilada (Shchukarev *et al.*, 2004; Hassanali, A. A. e Singer, S. J., 2007). A protonação/hidroxilação da superfície de um cristal de sílica é bem direta, já que os grupos estão dispostos de forma uniforme na superfície. Aplicamos a mesma abordagem que Cruz-Chu (Cruz-Chu *et al.*, 2006) cobrindo inicialmente os átomos de oxigênio e de silício livres da superfície, e, quando necessário ligações siloxano foram rompidas para atingir a densidade desejada. A implementação desta tarefa em superfícies amorfas mostrou-se particularmente complexa, Cruz-Chu, infelizmente, não disponibilizou publicamente o programa.

Implementamos o método da seguinte forma, no script em TCL *count_and_label_2breakbonds.tcl* (itens i-iii) e no programa ***breakbonds*** (item iv): **i.** Assinalar os átomos de superfície, calcular a área de superfície e estimar o número de grupos -H ou -OH necessários para atingir a densidade experimental, **ii.** Calcular o número de átomos de oxigênio e silício insaturados (*dangling atoms*), **iii.** Se a densidade for insuficiente, calcular o número de grupos siloxano e o número de ligações a serem rompidas para formar grupos insaturados, e **iv.** Romper seletivamente ligações siloxano de superfície, que não resultem em átomos de silício com menos de 3 ligações ou grupos de átomos livres. Esse último é um procedimento mais complexo, pois quando se escolhe uma ligação para romper, toda a topologia deve ser vasculhada, seguindo sequencialmente as ligações químicas a partir do ponto de quebra para evitar a formação de grupos livres (Figura 5.5). Este processo se repete a cada ligação rompida. Satisfeitos todos os critérios, as ligações siloxano são rompidas pelo programa (***breakbonds***).

Junto com as ligações os ângulos também são removidos e, portanto, após a quebra das ligações, a estrutura é re-otimizada, adequando-se à nova topologia. A partir de agora, inerente ao protocolo inicial de minimização, dinâmica ou *simulated annealing*, os átomos do interior da sílica serão considerados fixos.

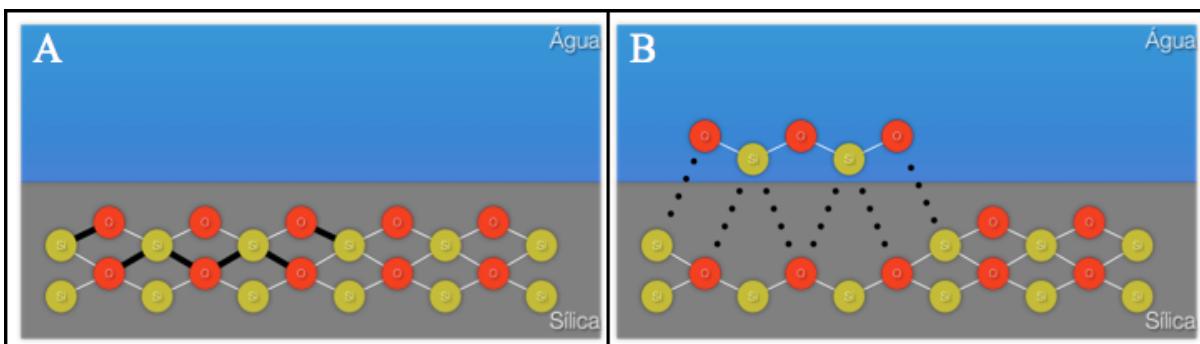


Figura 6.5 (A) Busca das ligações químicas de superfície passíveis de rompimento. É necessário quebrar seletivamente ligações siloxano de superfície, que não resultem em átomos de silício com menos de 3 ligações, ou em grupos de átomos livres. Quando se escolhe uma ligação para romper, toda topologia deve ser vasculhada, seguindo sequencialmente as ligações químicas a partir do ponto de quebra para evitar a formação de grupos livres, este processo se repete a cada ligação rompida. (B) Ilustração de um fragmento de átomos livres gerado quando as condições do algoritmo não são seguidas.

6.4.1.8 Incorporação dos átomos de hidrogênio e da hidroxila.

Uma vez assinalados os átomos passíveis de receber grupos (*dangling atoms*), os átomos de hidrogênio são incorporados aos átomos de oxigênio, e os radicais hidroxila aos átomos de silício livres. Implementamos este processo no programa **silica_protonate** (Figura 5.6). Nas estruturas em que a sílica é simulada na forma de superfície cristalina, ou superfície amorfa, os átomos de hidrogênio e hidroxilas são adicionados à coordenada do átomo receptor, somados de $\pm 1.0\text{\AA}$ e $\pm 1.52\text{\AA}$, de acordo com a orientação, ao eixo Z, com relação ao plano XY central da célula unitária. O átomo de hidrogênio da hidroxila é adicionado formando um ângulo de 115° com o átomo de silício (Si-O-H). A partir destas pequenas medidas otimizamos a construção da estrutura, minimizando as energias iniciais altas nos processos subsequentes de otimização. Por simplificação, não foram considerados os parâmetros adicionais, como o ângulo do grupo adicionado com os demais átomos de oxigênio (interior ou superfície), a estrutura tetraédrica do silício, nem a otimização local de energia para a adição destes grupos. Estes ajustes foram realizados posteriormente pelo programa de simulação NAMD.

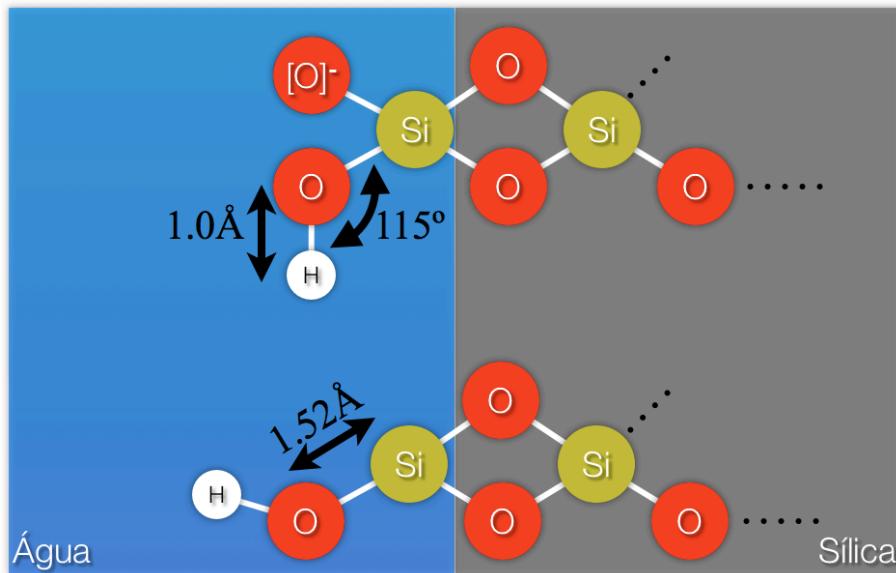


Figura 6.6 Nas estruturas em que a sílica é simulada na forma superfície cristalina ou superfície amorfa, os átomos de hidrogênio e as hidroxilas são adicionados à coordenada do átomo receptor a $\pm 1.0\text{\AA}$ e $\pm 1.52\text{\AA}$, respectivamente, de acordo com a distância no eixo Z em relação ao centro da célula unitária. O átomo de hidrogênio da hidroxila é adicionado formando 115° com o silício.

6.4.1.9 Construção da topologia final.

O programa **sílica_protonate** adiciona as ligações ao arquivo de topologia e o programa **pdb2psf** completa a estrutura calculando os ângulos de ligação e os ângulos diedrais. Por simplicidade, e redução do custo computacional, construímos a rotina específica (*failsafe SIO*) para a sílica no programa **pdb2psf** de forma que a contribuição das vibrações dos átomos do interior da sílica (*bulk*) seja ignorada, fixando os átomos. Na construção da topologia final, o algoritmo do programa foi desenhado para reduzir a complexidade do sistema e evitar cálculos desnecessários, ignorando as ligações químicas, ângulos de ligação e ângulos diedros dos átomos internos, preservando estes parâmetros para os átomos que contribuem com a superfície (Figura 6.7). As cargas são adicionadas de acordo com esquema apresentado na Figura 6.11 e Tabela 6.2.

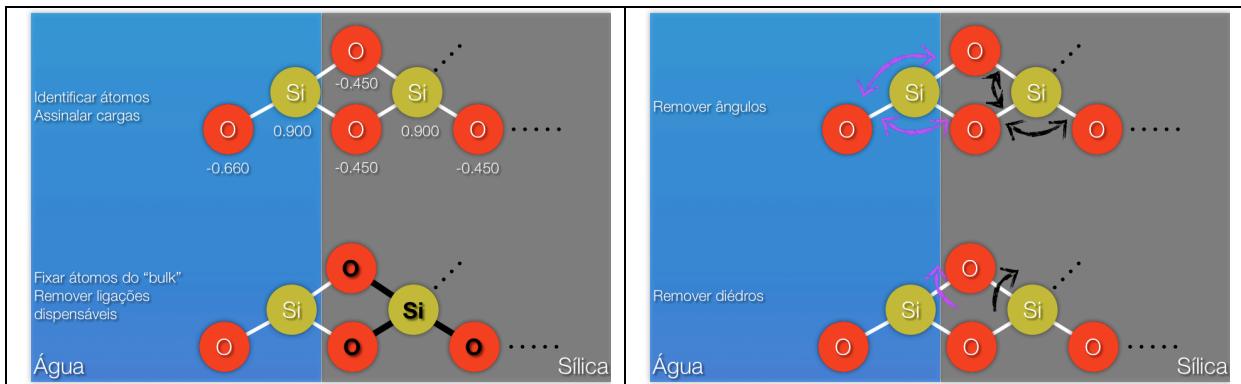


Figura 6.7 Tarefas dos programas *NanoSurface Tools*. (A) A distribuição de cargas parciais para os núcleos atômicos é distinta de acordo com a localização do átomo. O programa deve identificar os átomos de superfície e os de interior (*bulk*) e assinalar as cargas (A e B). Para reduzir o tempo computacional, os átomos do interior são considerados fixos e suas ligações, ângulos e diedros devem ser removidos da topologias desde que não comprometam os átomos de superfície. Os átomos marcados em preto estão fixos. Os traços em preto representam ligações removidas e as setas curvas em preto os ângulos removidos. As linhas pontilhadas significam continuidade das ligações, ângulos etc.

Tabela 6.2 – Parâmetros não ligados para a sílica e água, incluindo coeficientes para o potencial de Lennard-Jones e cargas. (a) silício de grupo silanol isolado ou vicinal; (b) silício de grupo silanol vicinal

Descrição	Tipo do átomo	ϵ (kcal/mol)	$r_{min}(\text{\AA})$	Carga (q)
Silício do interior	Si _b	0.3000	4.2950	0.9000
Oxigênio do interior	O _b	0.1500	3.5000	-0.4500
Silício do silanol	Si _s	0.3000	4.2950	9.050 ^(a) , 9.100 ^(b)
Oxigênio do silanol	O _s	0.1521	3.5400	-0.6600
Hidrogênio do silanol	H _s	0.0460	0.4490	0.4300
Oxigênio da água	O _w	0.1521	3.5364	-0.8340
Hidrogênio da água	H _w	0.0460	0.4490	0.4170

6.4.1.10 Otimização de ligações, ângulos e diedros.

Apesar das medidas anteriormente descritas, a energia inicial das simulações ainda é elevada, fato também relatado por outros autores (Cruz-Chu *et al.*, 2006). Adotamos um protocolo para a otimização final do sistema na sequência. **i.** Otimização das ligações (*bonds*) por minimização de energia (EM), **ii.** Otimização das ligações e ângulos em ciclo de minimização de energia, dinâmica molecular, minimização de energia (EM-MD-EM), **iii.** Otimização das ligações, ângulos e diedros em ciclo EM-MD-EM. Terminado este procedimento é realizado um ciclo final de EM-MD-EM com a etapa de DM com 50 mil passos.

6.5 Simulações da superfície de sílica em água.

Após a otimização da estrutura a superfície é solvatada por moléculas de água. Neste processo empregamos o módulo *solvate* do programa VMD através da interface gráfica. O VMD não consegue lidar com a lista de ângulos da sílica, portanto deve-se manter apenas o essencial no arquivo de topologia (.psf). Somado a isso, precisa-se corrigir o nome do “segmento” para que o programa funcione (Comandos 6.3 e 6.4)

<code>pdb2psf -i step13.coor -p step13.psf -o step14.psf</code>	Comando 6.3
<code>vmd -dispdev text -psf step14.psf -pdb step13.coor <step14.tcl</code>	Comando 6.4

6.6 Simulações da superfície de sílica funcionalizada.

Desenvolvemos um script para o VMD que se encarrega de encontrar os átomos de hidrogênio da superfície e eliminá-los randomicamente na densidade selecionada pelo usuário.

<code>vmd -dispdev text -psf step14.psf -pdb step14.pdb <delete_random_H_v3.tcl</code>	Comando 6.5
---	-------------

6.6.1 Adição dos grupos funcionais.

Desenvolvemos o programa **add_function** como ator deste processo. O programa aceita qualquer tipo de grupo funcional na forma de um arquivo de coordenadas no formato PDB, com as cargas no campo do fator-B e nomes dos átomos seguindo o padrão do campo de forças CHARMM. O único pré-requisito na preparação de um arquivo de coordenadas é que o primeiro átomo seja aquele que se ligará ao átomo de oxigênio livre na superfície da sílica, e que a carga deste átomo (ou grupo de cargas) seja a mesma da carga parcial do núcleo de hidrogênio que foi removido ($+0.430e$). Preparamos uma pequena coleção de grupos funcionais a serem adicionados rapidamente ao SiO_2 , e que sirvam de exemplo para os usuários do pacote de programas.

A partir do arquivo de coordenadas o programa **add_function** calcula a topologia (apenas ligações) adicionando réplicas deste grupo funcional a 1.54Å de um dos átomos de oxigênio livres na superfície e escreve o arquivo de topologia. O programa **pdb2psf** completa a topologia final adicionando os ângulos de ligação e diedros. Finalmente, o sistema passa por uma nova etapa de otimização e está pronto para receber o solvente, e demais moléculas que o usuário desejar. A Figura 6.8 ilustra a funcionalidade do programa **add_function** e a Figura 6.9 mostra uma superfície de sílica amorfa produzida pelo processo descrito acima, e funcionalizada com um grupo $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$. A Figura 6.10 ilustra o produto de uma simulação com a enzima lisozima em superfície de sílica amorfa não-funcionalizada gerada pelo método descrito.

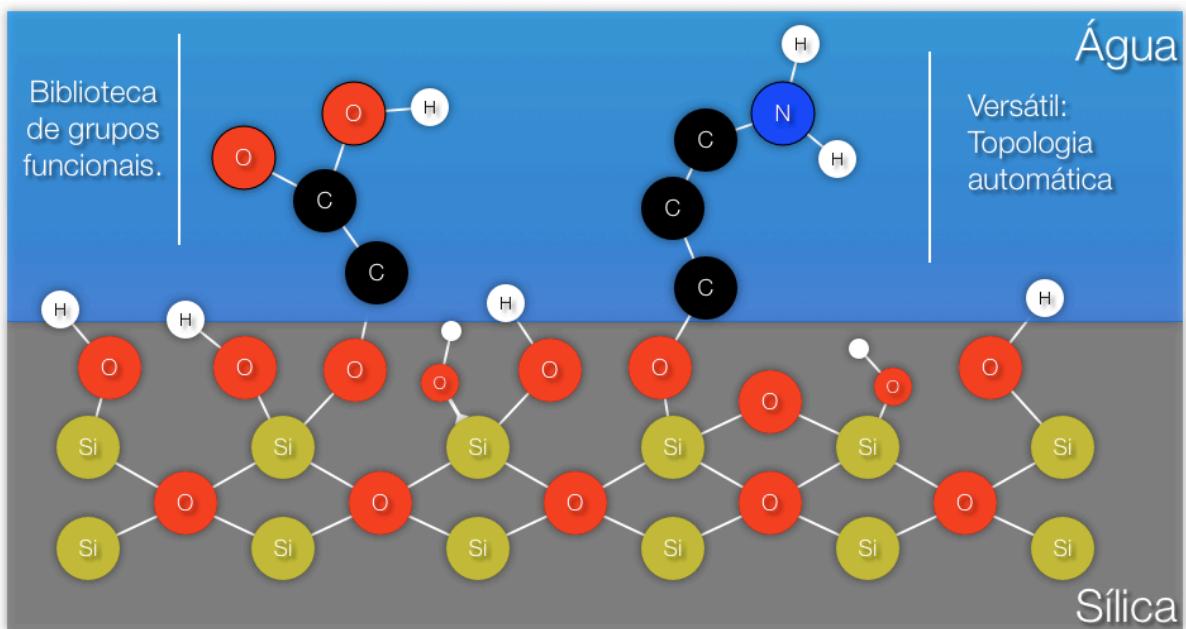


Figura 6.8 O programa **add_function** usa como entrada arquivos no formato PDB onde as cargas ficam na coluna do fator B. As réplicas dos grupos funcionais são adicionadas aos átomos de oxigênio livres na superfície da sílica e a topologia é construída automaticamente. Uma biblioteca de grupos funcionais será distribuída junto com o pacote.

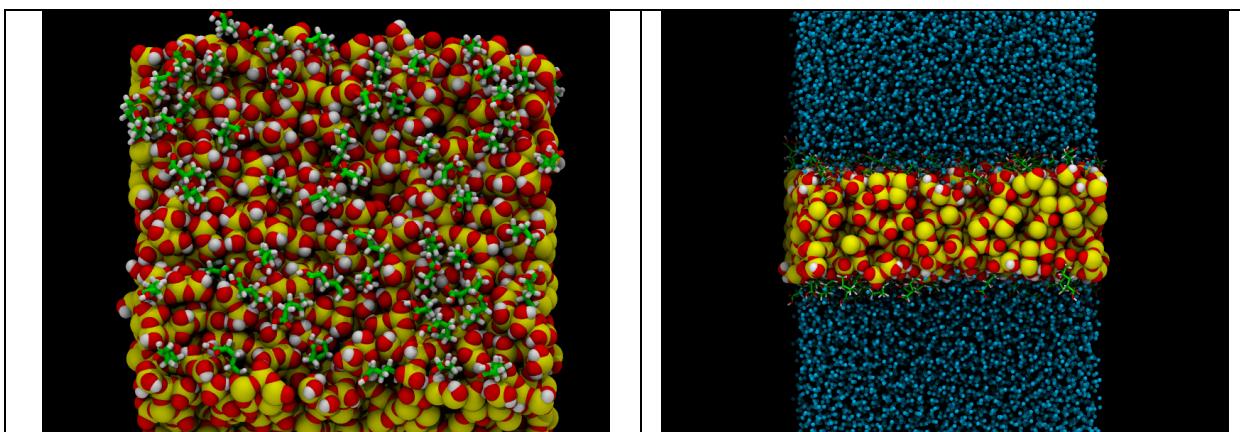


Figura 6.9 Superfície de sílica amorfa funcionalizada randomicamente a 20% do número de átomos de hidrogênio de superfície usando grupos $(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$. Os átomos da sílica estão representados no modelo de esferas de van der Waals, os átomos do grupo funcional estão representados pelo modelo de bastões. O sistema é periódico no plano da superfície. Esquerda: vista superior da superfície. Direita: vista lateral da superfície, as esferas azuis representam as moléculas de água solvatando o sistema.

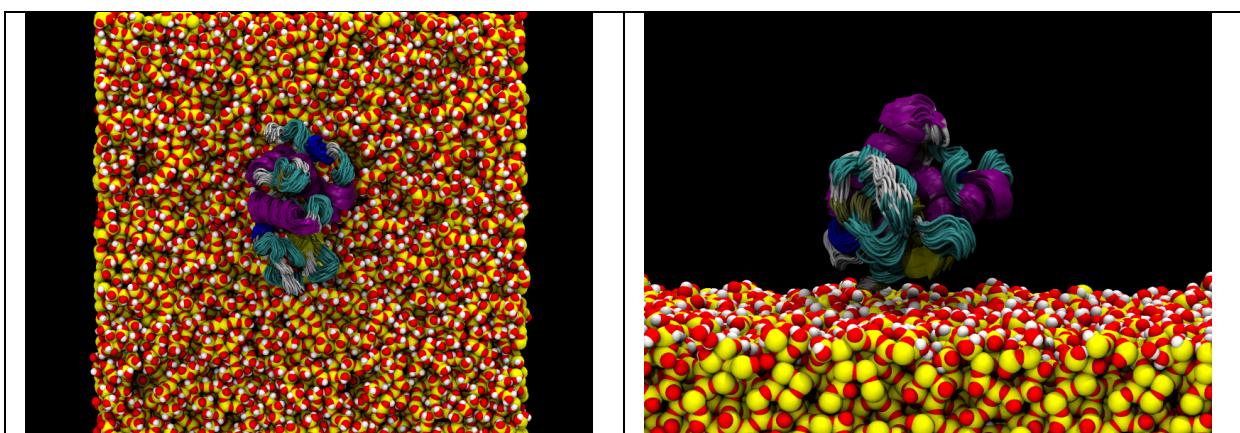


Figura 6.10 Sobreposição das posições atômicas para uma simulação de dinâmica molecular da enzima lisozima na superfície de sílica amorfa não-funcionalizada gerada pelo método descrito. A superfície de sílica representa o último passo da simulação no modelo de esferas de van der Waals. A lisozima é representada pelo modelo *Cartoon* e colorida pelo tipo de estrutura secundária. São sobrepostos 50 quadros da simulação de 10.0 ns sem nenhum tipo de tratamento de translação ou rotação.

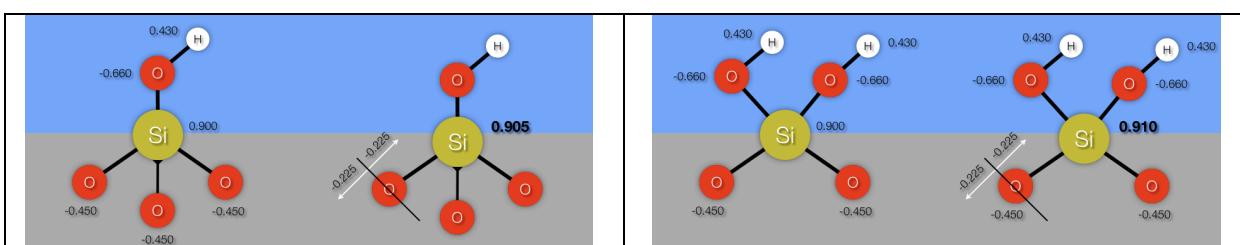


Figura 6.11 Modelo de cargas para os átomos da sílica. A contribuição de carga de cada oxigênio do interior da sílica (*bulk*) para o grupo de átomos apresentado é metade do valor nominal (-0.225) e a outra metade para o outro grupo em que ele se liga. Considerando o esquema de cargas apresentado à esquerda dos quadros A e B, um pequeno ajuste da carga do silício permite zerar a carga do sistema.

7 : Simulações da OPH em água e na superfície de FMS em modelo atomístico

A quantidade de proteínas adsorvidas em uma superfície é fortemente influenciada pela interação entre a superfície e a proteína, e o nível de adsorção é facilmente alterado via manipulação das interações envolvidas: forças eletrostáticas, forças de van der Waals, mudanças na entropia conformacional, e contatos hidrofóbicos. Interações fortes entre proteínas e superfícies geralmente levam a adsorção irreversível, que em muitos casos resulta em perda de estrutura terciária e eventual desnaturação da proteína. A natureza da superfície, incluindo hidrofobicidade, tipo de carga, e densidade, tem efeito dominante na estrutura e conformação das proteínas adsorvidas, porém a adesão à superfície é sensível à carga, estabilidade e superfície hidrofóbica das proteínas.

A sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) é uma plataforma tecnológica promissora para a imobilização de proteínas, em especial enzimas, que em sistemas biológicos, atuam na conversão de materiais com alta eficiência e especificidade, ainda que em condições brandas. A FMS é provida de poros de geometria regular e tamanho controlado, além disso permite a manipulação da densidade e características dos grupos funcionais, favorecendo a manutenção da atividade e do estado nativo das enzimas. Entretanto, o conhecimento da combinação ideal de fatores para a imobilização de enzimas em FMS permanece empírico e muito custoso. Em particular, o desenvolvimento de soluções baseadas na enzima organofósforo hidrolase (OPH), desintoxicadora para compostos organofosforados, de agentes de guerra química, depende de autorização excepcional e custos adicionais com segurança, devido a periculosidade dos compostos. Em todos os casos, o planejamento de experimentos pode beneficiar-se de modelos moleculares e simulações que explicam o comportamento da interface proteína-FMS.

Nesta Tese, modelos de confinamento em FMS tem sido desenvolvidos para a simulação da enzima organofósforo hidrolase (Gomes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009b). Estes modelos sugerem que não apenas as interações eletrostáticas, mas a contribuição das forças de van der Waals são fatores determinantes para a adsorção da enzima à superfície. Além disso sugerem que rearranjos estruturais em *loops* na entrada do sítio ativo, particularmente no *loop* L6 aumentam a exposição aos substratos, servido de base para o argumento de elevação da taxa catalítica. Até então, propomos modelos para a superfície de FMS, são baseados na metodologia *coarse grained*, em que a representação física é gerada por um arranjo uniforme de partículas com propriedades atômicas. Estes modelos funcionaram como alternativa simples à inexistência de uma plataforma computacional para a construção de modelos atomísticos complexos para a sílica amorfa funcionalizada.

No capítulo anterior descrevemos o desenvolvimento do pacote *NanoSurface Tools* e protocolos, como plataforma computacional para construção de superfícies de sílica amorfa funcionalizada, com detalhe atômico. Como aplicação desta ferramenta, produzimos um modelo para a superfície de sílica amorfa, funcionalizada com o grupo $[\text{CH}_2]_4\text{COO}^-$, por substituição aleatória de 20% dos átomos de hidrogênio dos grupos silanol de superfície, resultando em cobertura de aproximadamente 45%. A representação atomística tanto da proteína quanto da superfície fornece uma descrição refinada das interações na interface proteína-FMS. Foram realizadas simulações de DM em dois sistemas: **i.** OPH em água, e **ii.** OPH adsorvida na superfície de FMS; citados a seguir como OPH_{free}, OPH_{fms} respectivamente. Os efeitos desta interface na dinâmica da OPH foram investigados por meio de análises tempo-dependentes de RMSD, RMSF, MSD e distâncias interatômicas da OPH com respeito a superfície e ao grupo funcional.

7.1 Procedimentos

7.1.1 Modelo de enzima OPH

Da mesma forma que nos capítulos anteriores, a estrutura cristalográfica de alta resolução para a OPH de *Brevundimonas diminuta* (PDB 1EZ2) foi usada para as simulações de DM, após remoção do análogo de substrato diisopropilmetil-fosfonato. O estado de protonação dos resíduos de aminoácidos foi definido como previamente descrito (capítulos 4 e 5). A topologia e os parâmetros para o resíduo lisina carboxilada (LCX 169) foram baseados nos resíduos lisina e ácido glutâmico disponíveis no campo de forças CHARMM. O processamento da estrutura da OPH foi realizado com o módulo *psfgen*, módulo do programa VMD. As dimensões finais do sistema OPH_{free} foram definidas em uma caixa de 130x130x130Å com água e íons. Os módulos *solvate* e *auto_ionize* do programa VMD foram usados para solvatar o sistema com moléculas de água do tipo TIP3P adicionar contra-íons e zerar a carga, totalizando 212.115 átomos.

7.1.2 Modelo da superfície de sílica mesoporosa amorfa em detalhe atômico.

A superfície de sílica mesoporosa amorfa foi construída a partir do bloco de sílica amorfa incluído no banco de dados do *plugin Inorganic Builder* do programa VMD versão 1.8.7. Inicialmente o bloco de dimensões 57x57.57Å foi replicado no plano XY para as dimensões 114x114x57Å, seguido de um corte de 20Å a partir do plano XY central, produzindo uma superfície de dimensões 114x114x20Å. Os átomos do interior da sílica foram fixados, e a superfície submetida à simulação de mecânica molecular (MM), utilizando o programa NAMD-Lite, empregando o campo de forças BKS no seguinte esquema:

- i. 10 mil passos de otimização da estrutura pelo método do gradiente conjugado (CG);
- ii. 50 mil passos de simulação de DM a temperatura de 300 K;

iii. 10 mil passos de otimização pelo método CG.

A topologia para o modelo de FMS foi gerada com o programa **pdb2psf**, e a superfície processada com os programas **b4_breakbonds** e **breakbonds**, para gerar a densidade superficial de grupos silanol (SiO^-) 0.046\AA^{-2} (4.6 nm^{-2}). A estrutura foi otimizada por 10 mil passos de simulação de MM no campo de forças CHARMM, utilizando o programa NAMD. Os átomos de hidrogênio e os grupos hidroxilas foram adicionados aos átomos com valência livre (*dangling atoms*), seguidos por nova otimização de 10 mil passos.

7.1.3 Funcionalização da superfície

A funcionalização da superfície de sílica mesoporosa foi alcançada pela substituição aleatória de 20% dos átomos de hidrogênio da superfície pelo grupo $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$, usando o script **delete_random_H.tcl** e o programa **add_function**. O protocolo de construção foi concluído em uma sequência de otimização de estrutura, simulação de DM e nova otimização por 10 mil, 50 mil e 10 mil passos respectivamente, tendo como resultado a cobertura de aproximadamente 45% da superfície.

7.1.4 Grupo funcional

As coordenadas os átomos do grupo funcional $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ foram construídas no plugin *molefactory* do programa VMD. O arquivo de estrutura foi editado manualmente para se adequar ao campo de forças CHARMM e aos programas **pdb2psf** e **add_function**. Os valores das cargas atômicas parciais foram baseados nos átomos do resíduo de aminoácido glutamato, e ajustadas manualmente para o átomo de carbono C1 (tipo CT2), que faz a ligação com o oxigênio da sílica, da maneira que incorporasse a carga parcial do átomo de hidrogênio removido da sílica, para a adição deste grupo (Figura 7.1).

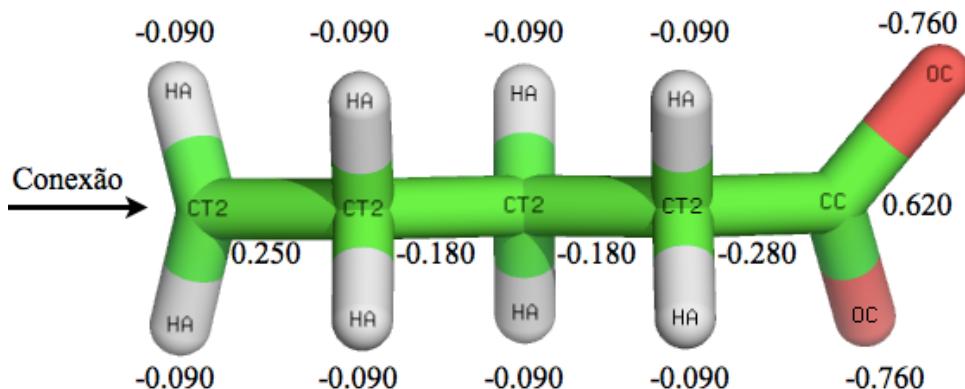


Figura 7.1 Grupo funcional $(\text{CH}_2)_4\text{-COO}^-$ com os átomos identificados para o campo de forças CHARMM. As cargas atômicas parciais são baseadas no resíduo de aminoácido glutamato. O ponto de conexão com o átomo de oxigênio livre da matriz de sílica é indicado pela seta (átomo C1, tipo CT2). O arquivo com as coordenadas se encontra no apêndice.

7.1.5 Modelo da interface OPH – FMS atomística

Um esquema do sistema de simulação da interface OPH-FMS é apresentado na Figura 7.2. A enzima OPH foi posicionada com a face positivamente carregada, porção posterior ao sítio ativo, a 10Å da superfície da sílica, funcionalizada com os grupos $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ negativamente carregados. A menor distância entre a enzima e sua imagem periódica foi ajustada para 14Å. As dimensões finais do sistema foram definidas em 114x114x95Å. Utilizando os módulos *solvate* e *auto_ionize* do programa VMD, o sistema foi solvatado com moléculas de água do tipo TIP3P e contra-íons foram adicionados para zerar a carga, totalizando 131.525 átomos.

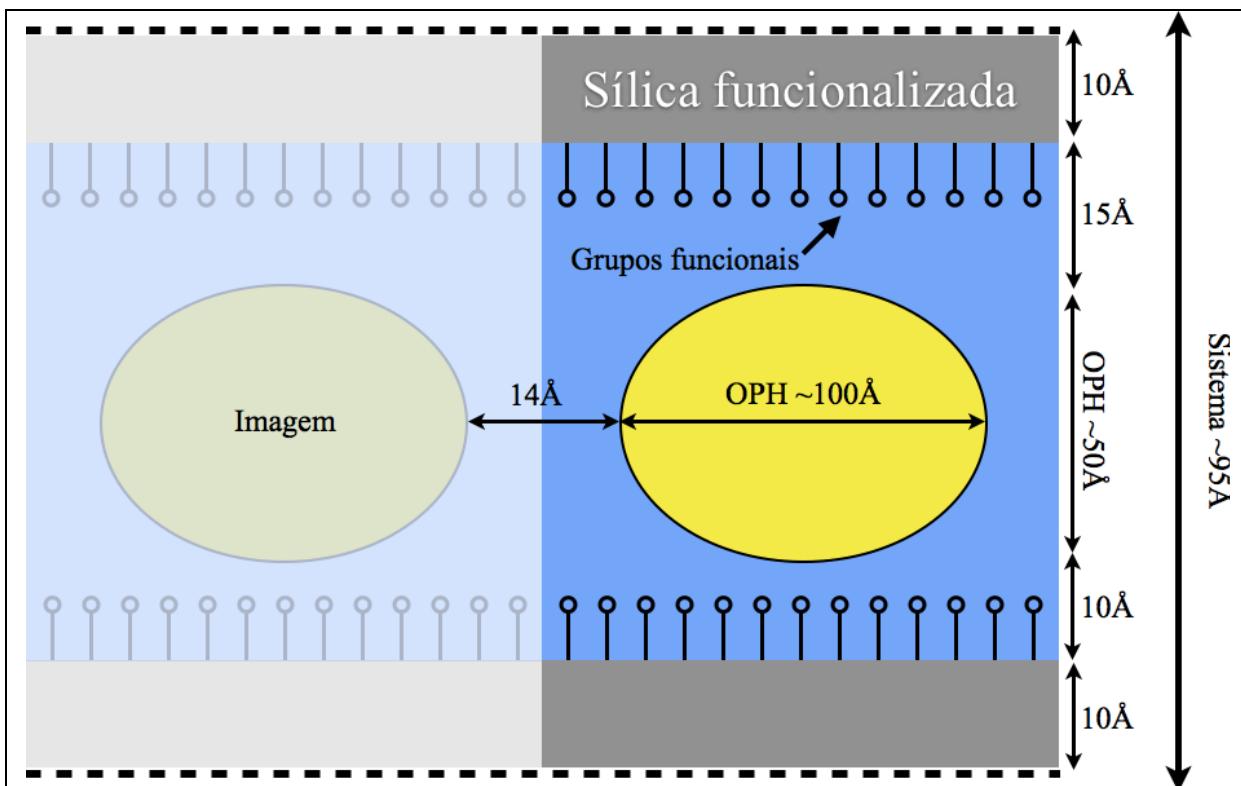


Figura 7.2 Esquema do sistema de simulação da interface OPH-FMS atomística. O sistema é periódico em todas as direções com origem nas linhas pontilhadas. Uma das imagens periódica é mostrada à esquerda. A superfície de sílica tem espessura de 20 Å (2x10 Å), cada grupo funcional ($\text{CH}_2\text{}_4\text{COO}^-$) se estende por até 8 Å. A face positivamente carregada da enzima OPH (inferior) foi disposta a 10 Å da superfície inferior da sílica e o tamanho do sistema foi ajustado para que a face da enzima (onde está o sítio ativo) estivesse a 15 Å de distância da superfície superior da sílica. A menor distância entre a enzima e sua imagem periódica foi ajustada para 14 Å. As dimensões finais do sistema foram definidas em 114x114x95 Å.

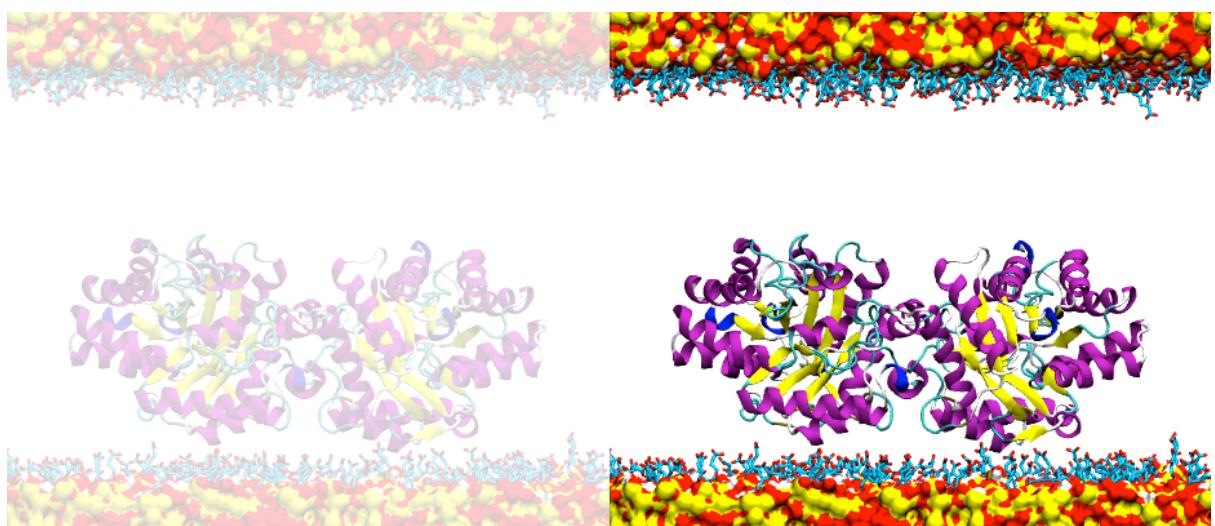


Figura 7.3 Modelo atomístico da simulação OPH_{fms} , ilustrando a esquerda, em opacidade reduzida, uma das imagens periódicas do sistema. A proteína OPH está representada pelo modelo *New Cartoon*, com a estrutura secundária colorida, hélices-alfa em magenta e fitas beta em amarelo. A superfície de SiO_2 está colorida por tipo de átomo: amarelo silício, vermelho oxigênio, branco hidrogênio. O grupo funcional $[\text{CH}_2\text{}_4\text{COO}^-]$ é representado pelo modelo de bastões, omitidos os átomos de hidrogênio.

7.1.6 Protocolo de simulação

Nos sistemas OPH_{free} e OPH_{fms} tiveram seus átomo pesados fixados para otimização da estrutura da água, da posição dos íons, e dos grupos funcionais, no caso da simulação OPH_{fms}. O protocolo consiste de:

- i.** 10 mil passos de otimização de geometria;
- ii.** 50 mil passos de DM com tempo de integração 1 fs à temperatura 298.15 K;
- iii.** 10 mil passos de otimização de geometria;
- iv.** apenas os átomos do esqueleto peptídico da proteínas permanecem fixos repetindo os passos **i**, **ii** e **iii**,
- v.** todos os átomos da enzima livres e repetido-se os passos **i**, e **vi.** o sistema é gradativamente aquecido a 298.15 K e submetido a simulação de dinâmica molecular por 24ns para OPH_{free} e 40ns para OPH_{fms}.

7.2 Resultados

7.2.1 Caracterização estrutural da OPH em água e adsorvida na superfície de FMS atomística.

O RMSD relativo as posições atômicas do esqueleto peptídico foi calculado para as simulações de DM para os sistemas OPH_{free} e OPH_{fms} em relação a estrutura cristalográfica 1EZ2 (Figura 7.4). Para a simulação OPH_{free}, o RMSD evolui para 0.15nm ± 0.25 nos primeiros 10 ns e permanece nesta região ao longo da simulação de 24 ns. Para o sistema OPH_{fms}, é observado um elevado aumento no valor do RMSD, desviando cerca de 0.25 nm, em relação a estrutura cristalográfica.

O deslocamento elevado no RMSD, para o sistema OPH_{fms}, foi resultado de uma rápida aproximação da OPH com a superfície de sílica no primeiro nanosegundo de simulação, resultando em uma pequena modificação na estrutura quaternária na direção indicada na figura 2.5, quadro B. Em seguida, o RMSD descrece, tornando-se praticamente estável em torno de 0.18 nm.

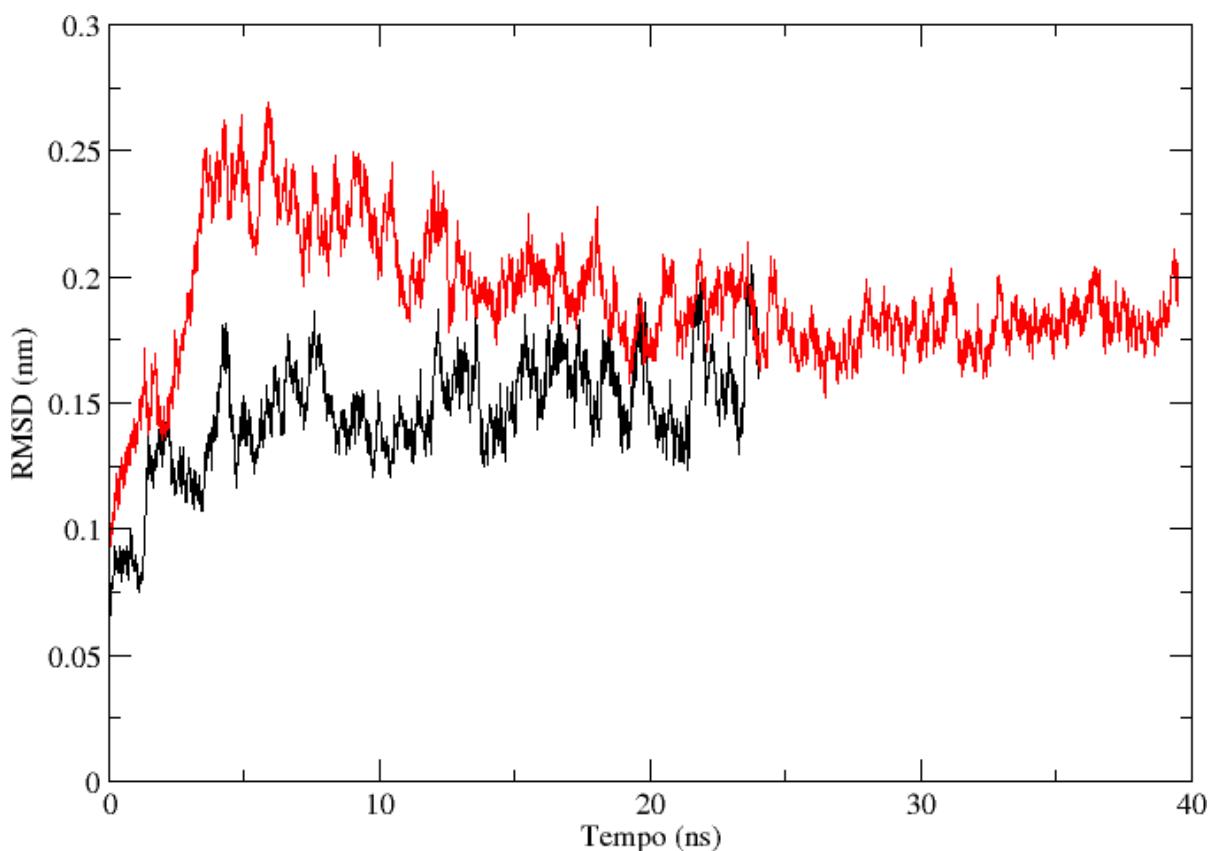


Figura 7.4 RMSD para as posições dos átomos do esqueleto peptídico da OPH em relação a estrutura cristalina (1EZ2). OPH_{free} (preto), OPH_{fms} (vermelho). As trajetórias foram sobrepostas à estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico amostrando os dados a cada 10 ps

Por conta do comportamento apresentado, o período amostrado para os cálculos subsequentes é 5-24 ns para OPH_{free} e 20-40 ns para OPH_{fms}, a não ser que especificado. Em média, neste intervalo, a diferença do RMSD entre os esqueletos peptídicos de OPH_{free} e OPH_{fms} é de 0.05 nm. A sobreposição das estruturas médias à estrutura cristalográfica é apresentada na Figura 7.5. Visualmente é possível notar o sutil deslocamento da estrutura quaternária, indicado pelas setas (Figura 7.5, quadro B).

A flutuação dos resíduos de aminoácido foi analisada por RMSF (Figura 7.6). Os valores para as flutuações atômicas para as duas simulações exibe padrão similar e coerente com o observado nas simulação apresentadas nos capítulos anteriores. Entretanto, na simulação OPH_{fms} é notável uma maior flutuação para o *loop* compreendido entre os átomos 130 e 145 (L7). A maior flutuação deste loop coincide com a maior exposição da

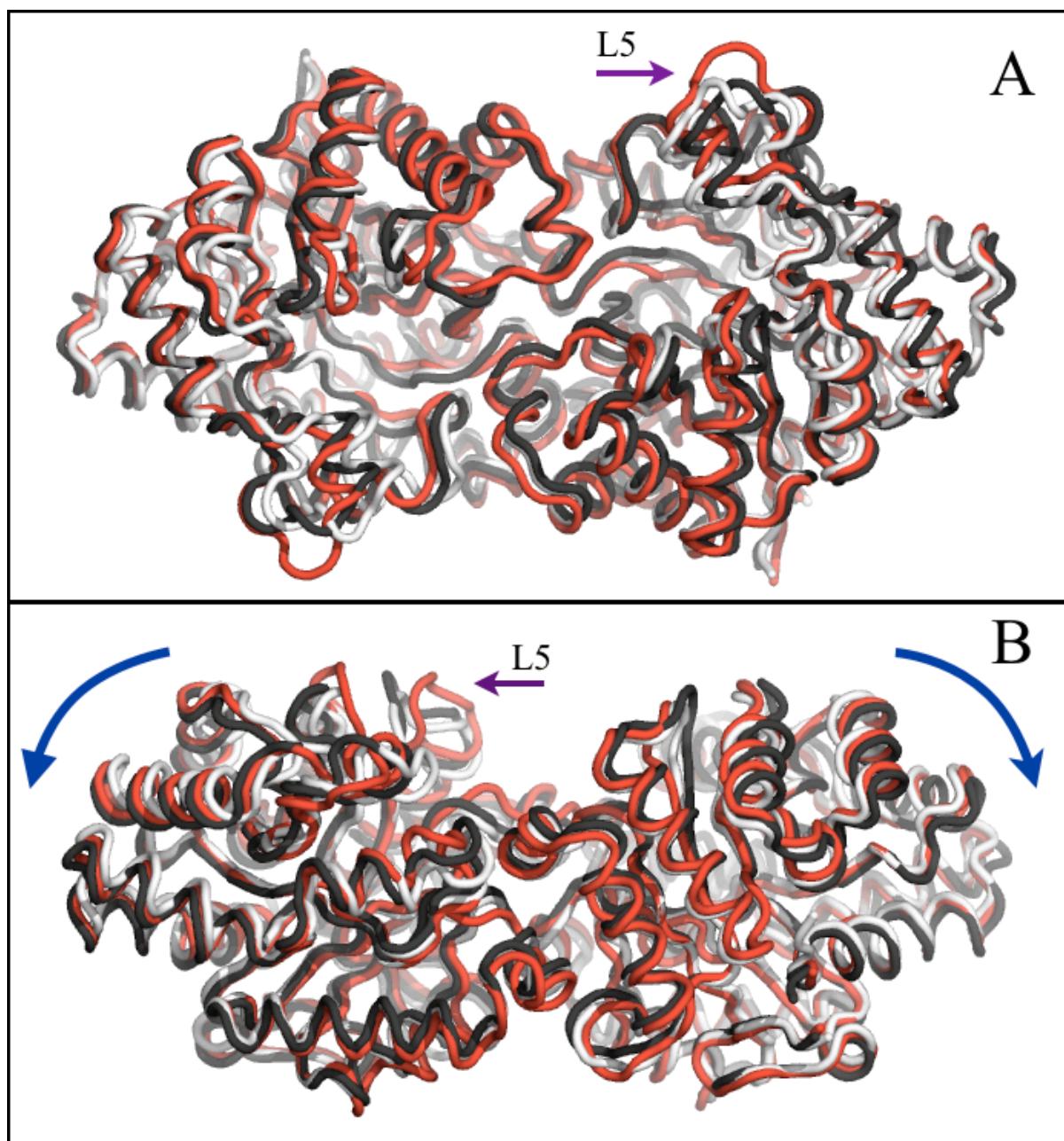


Figura 7.5 Sobreposição das estruturas médias a estrutura 1EZ2.

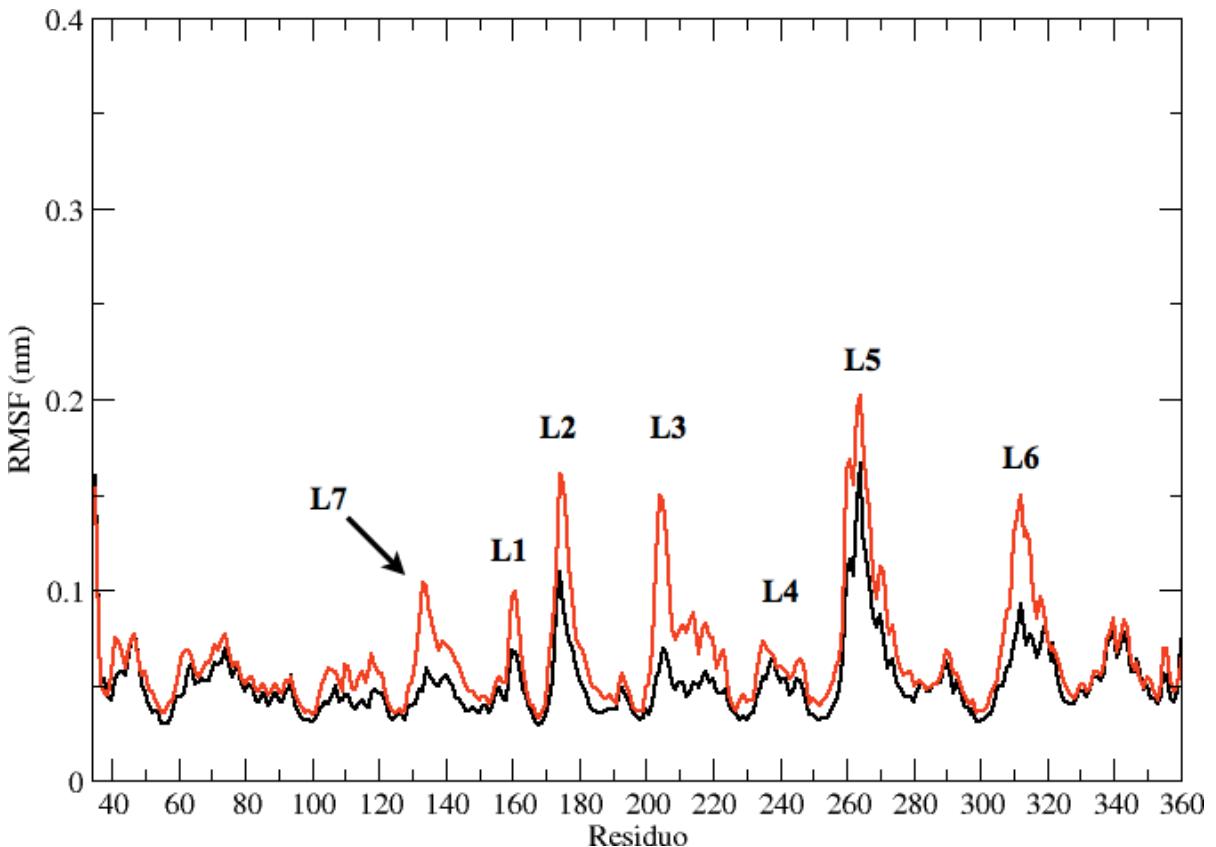


Figura 7.6 Raiz do desvio médio quadrático para a flutuação (RMSF) das posições dos átomos do esqueleto peptídico em função do número do resíduo de aminoácido da sequência. OPH_{free} (preto), OPH_{fms} (vermelho). As trajetórias foram sobrepostas à estrutura cristalográfica por translação e rotação dos átomos do esqueleto peptídico. A amostragem para o cálculo do RMSF é iniciada em 5 ns para OPH_{free} e 20 ns para OPH_{fms} e apresentada como média para os dois monômeros com frequência de coleta de dados de 10 ps. As marcações dos loops segue a proposta do capítulo 05.

7.2.2 Comportamento da OPH e MSD (desvio médio quadrático)

O deslocamento da OPH nos sistemas OPH_{free} e OPH_{fms} foi monitorado ao longo da trajetória a partir da etapa de aquecimento (passo vi) e é ilustrado na Figura 7.8(A-D). O MSD (Figura 7.9) da OPH em água (OPH_{free}) cresce com o tempo, enquanto o para a OPH_{fms} permanece com valores próximos a zero, um perfil similar ao observado previamente (capítulo 5). O deslocamento inicial se concentra no eixo perpendicular ao plano da superfície, a enzima se desloca rapidamente (~10ps) em direção à superfície de sílica atingindo distância mínima OPH-SiO₂ de ~0.35 nm (Figura 7.8 A). Em seguida, no decorrer da simulação OPH_{fms}, a enzima passa a se distanciar da superfície de sílica na simulação, lentamente se estabilizando-se em torno dos 0.65 nm (Figura 7.7 B e Figura 7.10 B),

entretanto são preservadas as interações com grupos funcionais (Figura 7.7 B e Figura 7.10 B e D).

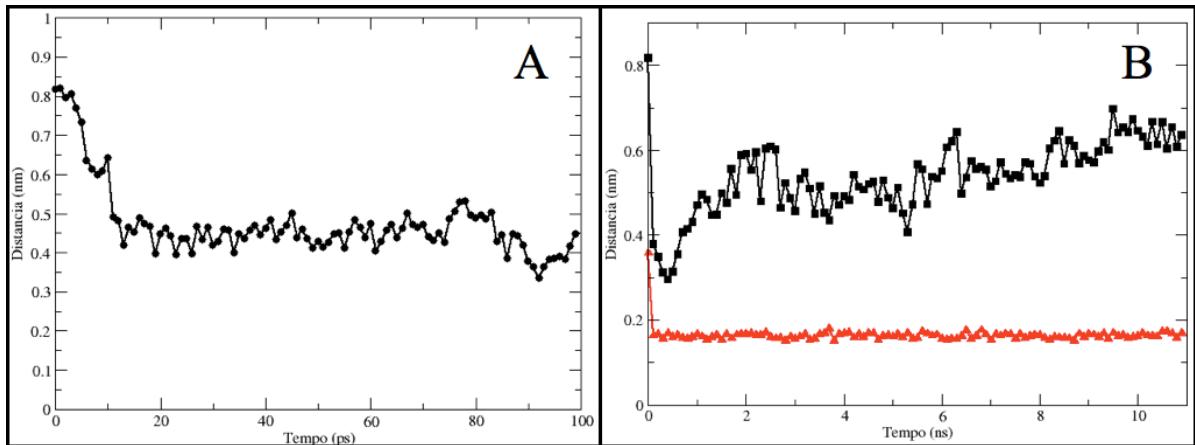


Figura 7.7 Simulação OPH no modelo atomístico de sílica mesoporosa funcionalizada (OPH_{fms}). A superfície está orientada no plano XY. **A)** Distância mínima entre pares de átomos Proteínas-Sílica (excluindo os grupos funcionais) nos primeiros 100 ps, mostrando a aproximação rápida da OPH. **B)** Distância mínima entre pares de átomos OPH-sílica (preto) OPH-grupo funcional (vermelho). Após a rápida aproximação inicial, a OPH se distancia da sílica, preservando os contatos com o grupo funcional.

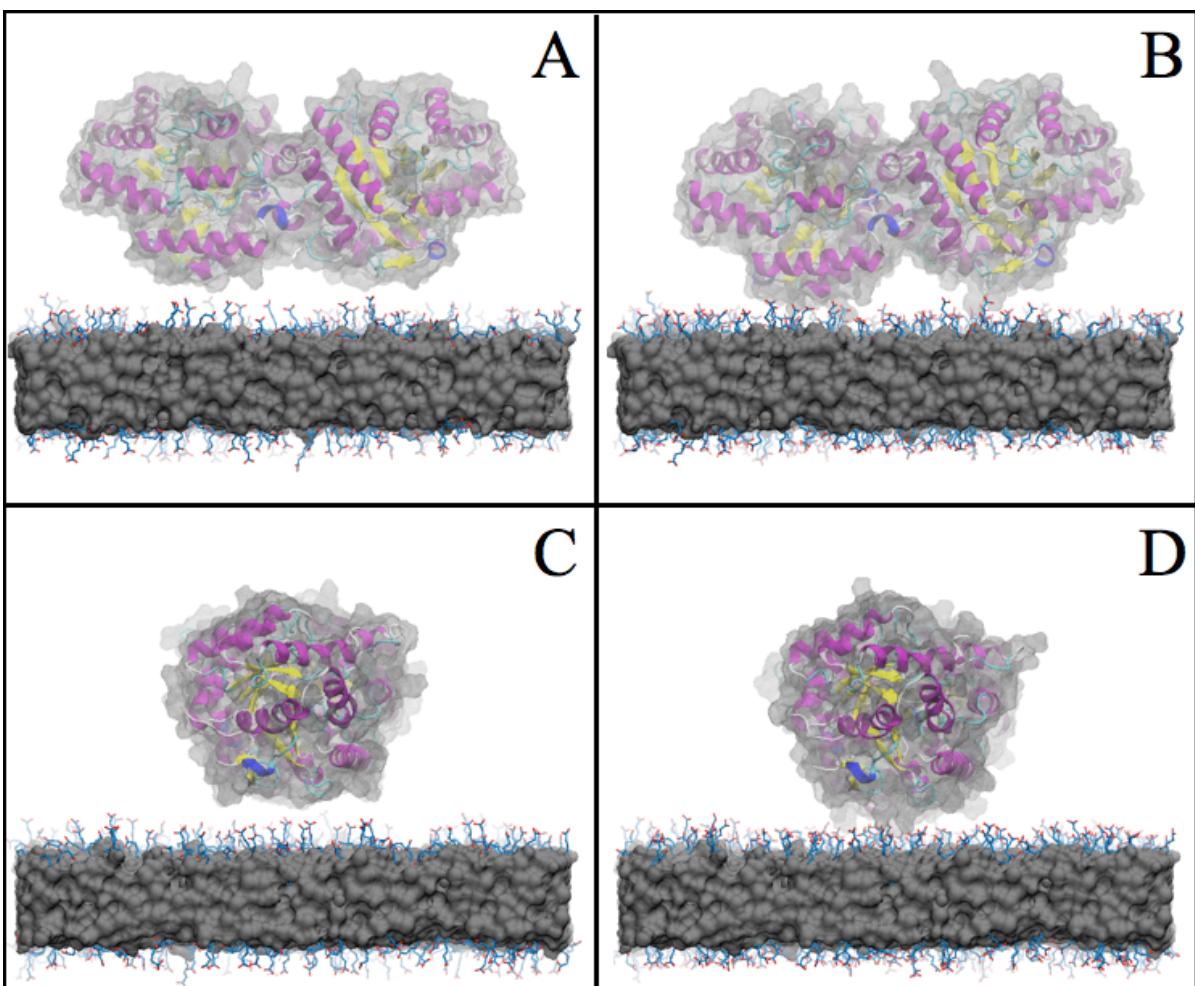


Figura 7.8 Deslocamento da enzima OPH em relação a superfície de sílica funcionalizada. C e D são as figuras A e B respectivamente, após rotação de 90° no eixo perpendicular ao plano da superfície. (A e C) Modelo inicial

com a enzima a 10 Å da superfície de sílica. (B e D) Estado da simulação após 10 ns. A proteína OPH está representada pelo modelo *New Cartoon*, com a estrutura secundária colorida, hélices-alfa em magenta e fitas beta em amarelo. A superfície molecular é representada em cinza porém com 50% de transparência. A superfície molecular da sílica é representada em cinza e os grupos funcionais $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ são representados pelo modelo de bastões, os átomos de carbono estão em azul e de oxigênio em vermelho. Para clareza, os átomos de hidrogênio não são representados.

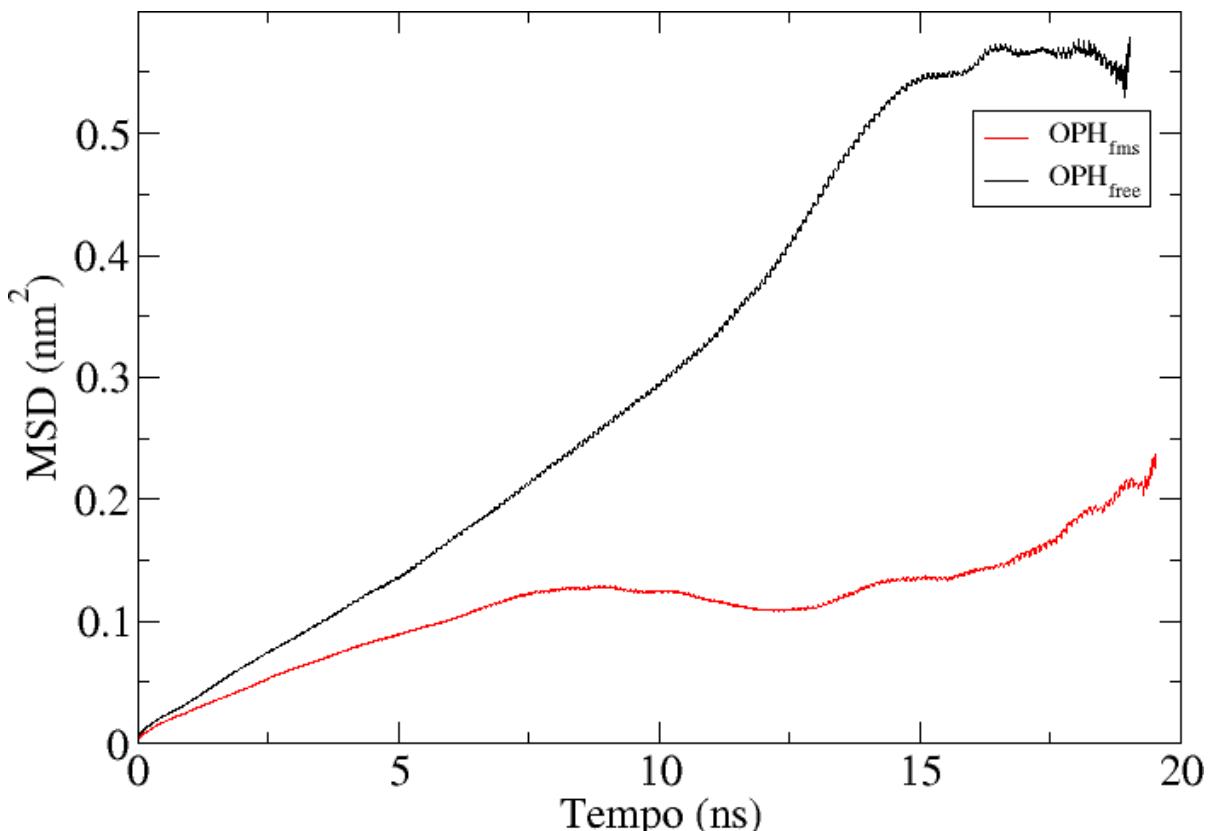


Figura 7.9 Deslocamento médio quadrático para a OPH_{free} (preto) e OPH_{fms} (vermelho).

7.2.3 Interface OPH-FMS atomística

Inicialmente as caudas dos grupos funcionais $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ encontram-se dispostas randomicamente, como resultado do protocolo de preparação da superfície funcionalizada que inclui uma simulação de DM. Na etapa **iv** do protocolo de preparação do sistema com a enzima, quando os grupos funcionais ficam livres para se movimentar, foi observado que suas caudas começam a apresentar orientação na direção da enzima (Figura 7.10 A e C), a partir da etapa **iv** com a enzima livre para transladar na caixa de simulação, ocorre uma rápida aproximação. Com a OPH próxima à superfície foi observada ligação via contatos polares com os resíduos arginina na porção inferior da enzima. (Figura 7.10 B e D).

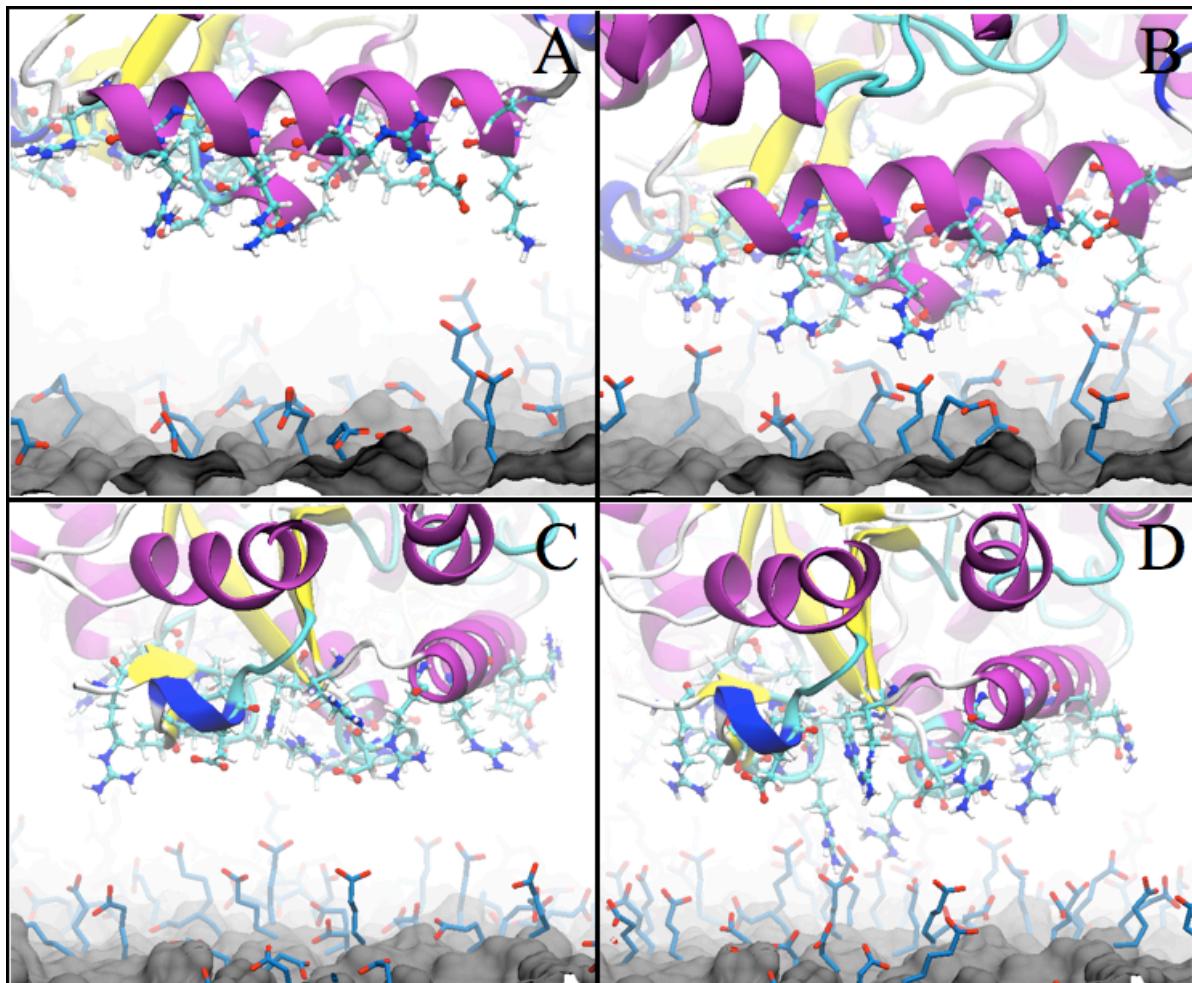


Figura 7.10 Detalhe da interface entre a OPH e a superfície de sílica funcionalizada. A e C representam o tempo de simulação 0 ns, B e D o tempo de simulação 10 ns. A localização das posições detalhadas nesta Figura são indicadas com setas na Figura 5.15A, para A e B, e 5.15C para C e D. A proteína OPH está representada pelo modelo *New Cartoon*, com a estrutura secundária colorida, hélices-alfa em magenta e fitas beta em amarelo. A superfície molecular da sílica é representada em cinza e os grupos funcionais $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ são representados pelo modelo de bastões, os átomos de carbono são estão em azul e oxigênio em vermelho. Para clareza, os átomos de hidrogênio para o grupo funcional não são representados.

7.3 Discussão

Apesar do tempo modesto de simulação 20 ns, os resultados indicam uma tendência da enzima OPH em adsorver na superfície de FMS representada átomo a átomo. Já no inicio da simulação a OPH transita de sua posição original a 10 Å da superfície da sílica para uma média de 5 Å, interagindo, essencialmente via cadeias laterais dos resíduos arginina com as porções carboxil das caudas dos grupos funcionais $[\text{CH}_2]_4\text{-COO}^-$ (Figuras 6.5 e 6.6). Este resultado está em sintonia com as previsões anteriores baseadas no potencial eletrostático mapeado na superfície da OPH (Gomes *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009b),

propondo um modelo de ligação via resíduos carregados na porção oposta ao sitio ativo. Nesta orientação os dos sítios ativos da enzima (um em cada monômero) ficam de face para o lúmen do nanoporo como ilustrado na Figura 7.2 (e Figura 6.1, capítulo anterior), propiciando o acesso direto e melhor movimento de massa do substrato e do produto da reação. A cobertura do nanoporo com enzima resulta em um grande volume excluído que, associado à orientação preferencial dos sítios ativos em direção ao lúmen, amplifica o efeito de confinamento restringindo o volume acessível ao substrato e ao produto da reação.

Os resultados das simulações com modelo atomístico completo suportam as observações apresentadas nos capítulos anteriores, onde modelos *coarse grained* foram aplicados, reforçando o argumento de que superfície de sílica amorfa funcionalizada pode ser representada por um modelo simplificado e confirma os resultados publicados pelo nosso grupo.

A previsão da adsorção de enzimas à matrizes de sílica acelera o planejamento de superfícies eficientes para imobilização de enzimas. Neste trabalho foi construído um pacote de ferramentas computacionais constituindo uma plataforma versátil e extensível. Foi produzida uma superfície de sílica amorfa funcionalizada com o grupo $[CH_2]_4\text{-COO}^-$, mimetizando atomicamente as condições experimentais. Com este modelo, foi possível confirmar em detalhe atômico as previsões dos trabalhos experimentais mostrando que a enzima OPH se liga aos grupos funcionais da sílica em conformação dinamicamente ativa.

Os detalhes atômicos da interação OPH-FMS conduzirão a um melhor desenho da funcionalização da superfície, para melhor atender à especificidade da interação com grupos atômicos da enzima. Um modelo mais realista, do ponto de vista atômico-molecular, da superfície de sílica amorfa possibilita uma melhor distribuição espacial dos grupos funcionais para atender à complementaridade eletrostática e hidrofóbica na interação com enzimas ou

qualquer outra biomolécula que será adsorvida. Isto possibilita, por exemplo, a orientação da enzima em posição ótima para o fluxo de reagentes e produtos e um melhor empacotamento da adorção da macromolécula na superfície.

8 Conclusões gerais

O sucesso no desenvolvimento de um suporte mesoporoso para imobilização de proteínas requer o conhecimento detalhado das propriedades estruturais e de adsorção das mesmas. Este conhecimento pode fornecer informações valiosas para o aumento da densidade de proteínas adsorvidas ao mesoporo, conjugado à indução do aumento da atividade específica, e modulação da hidrofobicidade ou anfifilicidade do suporte para difusão efetiva do substrato e produtos através dos poros.

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para a enzima OPH livre em água bem como adsorvida em modelos, em vários níveis e detalhe, visando reproduzir o efeito de uma superfície de sílica mesoporosa, funcionalizada com grupos químicos carboxil. Em todos os modelos, foi investigado o papel das interações não ligadas na dinâmica e na adsorção da proteína. No modelos *coarse grained*, OPH_{fms} e FMS_{Coul} (Capítulo 4 e 5, respectivamente), as interações de van der Waals foram praticamente negligenciadas ao representarmos os grupos funcionais como um partículas, distribuídas de forma homogênea, e que incorporavam os parâmetros de van der Waals equivalentes a um oxiânon. Enquanto que, no modelo FMS_{vdW} (Capítulo 5), as interações de van der Waals foram consideradas através de potenciais de interação representando um grupamento acetato.

Foi visto que o contato estérico com a superfície FMS, bem como a natureza das interações de interface, modulam a dinâmica da estrutura da OPH para um conjunto estruturas ligeiramente diferente, concentrado em rearranjos estruturais dos *loops* que delimitam a entrada do sítio ativo, aumentando sua acessibilidade ao solvente e, possivelmente, aos substratos. Este efeito facilita a ligação produtiva entre o substrato e enzima. De fato, a taxa de hidrólise do paraoxon pela OPH aparenta ser limitada por alterações conformacionais, dentre as quais estão as mudanças induzidas pelo substrato, como proposto por Caldwell e

cols (Caldwell, Newcomb *et al.*, 1991). Os diferentes modelos para a superfície de FMS também afetam a dinâmica da estrutura quaternária da OPH, com decréscimo significativo da área de interface entre os monômeros da OPH na simulação FMS_{vdw}. Porém, estes rearranjos na estrutura quaternária não interferem no conteúdo de estrutura secundária, concordando com experimentos de FTIR (Lei, Shin *et al.*, 2006).

Foi visto que, apesar das interações eletrostáticas serem suficientes para a ligação da OPH à superfície da FMS, a negligência das contribuições de van der Waals na representação do modelo de poro da FMS levou a um decréscimo significativo dos eventos de adsorção/deadsorção proteína-superfície. A hidratação, comparativamente menor, do modelo de superfície FMS_{vdw} facilita a dessolvatação da superfície, durante o processo de adsorção da proteína, e contribui para a adsorção desta quando comparado ao modelo FMS_{coul}. Além disso, o coeficiente de difusão calculado para a simulação FMS_{vdw} é consistente com medidas experimentais de difusão para a enzima lisozima, adsorvida em superfícies vítrias (Hanasaki, Takahashi *et al.*, 2008). Quando completamente adsorvida ao modelo de superfície FMS_{vdw}, a OPH apresenta dinâmica na qual o sítio ativo da enzima é desobstruído pelo *loop L6*. Este achado, sugere que a atividade amplificada observada para a OPH confinada em FMS é um efeito combinado do confinamento e da adsorção de um conjunto de conformações induzidas no processo, que contribuem para o aumento da atividade. Também argumentamos, com base nas simulações presentes, que a adsorção de OPH em superfícies de sílica mesoporosa funcionalizada, tanto com grupos $[CH_2]_n\text{-COO}^-$ ou $[CH_2]_n\text{-NH}_3^+$, é modulada não apenas pela atração entre as cargas opostas, mas também pelo aumento na hidrofobicidade da superfície, devido a presença de grupos metíleno $[-CH_2]$ conectando o grupo funcional no mesoporo.

Os resultados das simulações com modelo atomístico completo suportam as observações apresentadas pelos modelos *coarse grained*, reforçando o argumento de que

superfície de sílica amorfa funcionalizada pode ser representada por um modelo simplificado e confirma os resultados publicados pelo nosso grupo.

A previsão da adsorção de enzimas à matrizes de sílica acelera o planejamento de superfícies eficientes para imobilização de enzimas. Neste trabalho foi também desenvolvido um pacote de ferramentas computacionais constituindo uma plataforma versátil e extensível. Como aplicação, foi produzida uma superfície de sílica amorfa funcionalizada com o grupo $[CH_2]_4\text{-COO}^-$, mimetizando atomicamente as condições experimentais. Com este modelo, foi possível confirmar em detalhe atômico as previsões dos trabalhos experimentais mostrando que a enzima OPH se liga aos grupos funcionais da sílica em conformação dinamicamente ativa.

Os detalhes atômicos da interação OPH-FMS contribuem no planejamento da funcionalização da superfície, dando subsídios para atender à especificidade da interação com grupos atômicos da enzima. Um modelo mais realista, do ponto de vista atômico-molecular, da superfície de sílica amorfa possibilita uma melhor distribuição espacial dos grupos funcionais para atende à complementaridade eletrostática e hidrofóbica na interação com enzimas ou qualquer outra biomolécula que será adsorvida. Isto possibilita, por exemplo, a orientação da enzima em posição ótima para o fluxo de reagentes e produtos e um melhor empacotamento na adsorção da macromolécula na superfície.

9 Perspectivas

Acreditamos que o produto deste trabalho, combinado com os extensos esforços experimentais contribuirá para uma melhor compreensão da amplificação da atividade e estabilidade enzimática em FMS, otimizando o design da superfície e modificação genética das proteínas, se necessário. Novos princípios vão iluminar o relacionamento hóspede-hospedeiro entre proteínas e nanomateriais nanofuncionalizados; que é como a modificação conformacional favorável e o aumento da atividade enzimática são facilitados bom bionanoconstrutos.

Os resultados vão estabelecer avanços tecnológicos para a produção de proteínas e aplicações médicas enzimáticas. Seremos capazes de desenvolver a metodologia para o planejamento, desenvolvimento e síntese de FMS em nanoescala que podem amplificar a atividade específica e estabilidade de enzimas, e também acelera o desenvolvimento da ciência da bionanotecnologia e suas aplicações médicas.

Ao confinar enzimas em FMS, o impacto em longo prazo deste trabalho será desenvolver e validar metodologias para produção efetiva e aplicações de enzimas de significância estratégica com atividade e estabilidades amplificadas para aplicações relacionadas à detoxificação, tratamento de câncer, biosensoramento, endereçamento e entrega de biofármacos. O método enzimático tem sido uma das abordagens mais excitantes e promissoras para o tratamento do câncer, desintoxificação e biosensoramento. Por exemplo, a terapia enzimática pode não apenas eliminar toxinas do organismo, ela também pode matar células carcinogênicas e mudar um tumor de maligno para benigno; reparar tecidos, órgãos ou ossos depois de um tumor tê-lo destruído.

Para demonstrar a potencial aplicação médica para os bionanoconstrutos desenvolvidos neste projeto, o grupo experimental irá avaliar a eficiência in vivo da OPH em FMS para a

desintoxificação contra neurotoxicidade em ratos. Similarmente, seremos capazes de desenvolver e preparar as enzimas necessárias para câncer e outros tratamentos de doenças.

Bibliografia

- AALTEN, D. M. F. V. et al. A comparison of techniques for calculating protein essential dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 169-181, 1997. doi:
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 1589, 2006. doi:
- AKSIMENTIEV, A. et al. Modeling transport through synthetic nanopores. #IEEE_M_NANO#, v. 3, n. 1, p. 20-28, 2009. doi:
- _____. Microscopic Kinetics of DNA Translocation through synthetic nanopores. **Biophys J**, v. 87, n. 3, p. 2086-97, Sep 2004. doi: 10.1529/biophysj.104.042960
S0006-3495(04)73686-3 [pii]
- AKSIMENTIEV, A.; SCHULTEN, K. Extending molecular modeling methodology to study insertion of membrane nanopores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4337-4338, 2004. doi:
- AMADEI, A.; LINSSEN, A. B.; BERENDSEN, H. J. **Proteins**, v. 17, p. 412, 1993. doi:
- ARKHIPOV, A. et al. Elucidating the mechanism behind irreversible deformation of viral capsids. **Biophys J**, v. 97, n. 7, p. 2061-9, Oct 7 2009. doi: S0006-3495(09)01298-3 [pii]
10.1016/j.bpj.2009.07.039
- AUBERT, S. D.; LI, Y.; RAUSHEL, F. M. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5707-5715, 2004. doi:
- AUBERT, S. D.; LI, Y. C.; RAUSHEL, F. M. **Biochemistry**, v. 43, p. 5707, 1994. doi:
- BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10037-10041, 2001. doi:
- BAKOS, T.; RASHKEEV, S. N.; PANTELIDES, S. T. Reactions and Diffusion of Water and Oxygen Molecules in Amorphous SiO₂. **Physical Review Letters**, v. 88, n. 5, p. 055508, 2002. doi:
- BARCELLOS, G. B. et al. Molecular modeling as a tool for drug discovery. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 91, 2008. doi:
- BAS, D. C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. Very fast prediction and rationalization of p<I>K</I>_{a} values for protein-ligand complexes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 73, n. 3, p. 765-783, 2008. doi:
- BATISTA, P. R. et al. Consensus modes, a robust description of protein collective motions from multiple-minima normal mode analysis--application to the HIV-1 protease. **Phys Chem Chem Phys**, v. 12, n. 12, p. 2850-9, Mar 28 2010. doi: 10.1039/b919148h
- 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. doi: 10.1021/j100142a004
- BENNING, M. M. et al. The Binding of Substrate Analogs to Phosphotriesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 39, p. 30556-30560, 2000. doi:
- _____. Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. **Biochemistry**, v. 33, n. 50, p. 15001-15007, Dec 1994. doi:
- _____. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. **Biochemistry**, v. 34, n. 25, p. 7973-7978, Jun 1995. doi:

_____. High Resolution X-ray Structures of Different Metal-Substituted Forms of Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2712-2722, 2001. doi:

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. doi: citeulike-article-id:1131162

_____. **Intermolecular Forces.** 1981. 331

BHATIA, R. B. et al. Aqueous Sol-gel Process for Protein Encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 8, p. 2434-2441, 2000. doi: 10.1021/cm000260f

BISMUTO, E. et al. Effect of molecular confinement on internal enzyme dynamics: frequency domain fluorometry and molecular dynamics simulation studies. **Biopolymers**, v. 67, n. 2, p. 85-95, 2002. doi: 10.1002/bip.10058

BOEHR, D. D.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. An NMR perspective on enzyme dynamics. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3055-3079, Aug 9 2006. doi: Doi 10.1021/Cr050312q

BRAUN, S. et al. Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. **Materials Letters**, v. 10, n. 1-2, p. 1-5, 1990. doi:

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. **J Comput Chem**, v. 30, n. 10, p. 1545-1614, Jul 2009. doi:

CALDWELL, S. R. et al. Limits of diffusion in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **Biochemistry**, v. 30, n. 30, p. 7438-7444, Jul 1991. doi:

CALDWELL, S. R.; RAUSHEL, F. M. Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 31, n. 1, p. 59-73, Oct 1991. doi:

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Curr Opin Chem Biol**, v. 9, n. 2, p. 217-26, Apr 2005. doi: S1367-5931(05)00029-3 [pii] 10.1016/j.cbpa.2005.02.014

CERESOLI, D. et al. Two-Membered Silicon Rings on the Dehydroxylated Surface of Silica. **Physical Review Letters**, v. 84, n. 17, p. 3887, 2000. doi:

CHANDRASEKHAR, I. et al. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. **European Biophysics Journal**, v. 32, n. 1, p. 67-77, March 2003. doi:

CHEN, B. et al. Probing mechanisms for enzymatic activity enhancement of organophosphorus hydrolase in functionalized mesoporous silica. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 4, p. 81, 2009. doi:

CHEN-GOODSPEED, M. et al. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. **Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1325-1331, Feb 2001a. doi:

_____. Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. **Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1332-1339, Feb 2001b. doi:

CHENGHONG, L.; ET AL. Characterization of functionalized nanoporous supports for protein confinement. **Nanotechnology**, v. 17, n. 22, p. 5531, 2006. doi:

CHO, C. M.-H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Altering the Substrate Specificity of Organophosphorus Hydrolase for Enhanced Hydrolysis of Chlorpyrifos. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 8, p. 4681-4685, 2004. doi:

CHO, C. M. H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. **Protein Eng., Des. Sel.**, v. 19, p. 99, 2006. doi:

- CHONG, A. S. M.; ZHAO, X. S. **Appl. Surf. Sci.**, v. 237, p. 398, 2004. doi: CIEPLAK, P. et al. Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 1357-1377, 1995. doi: citeulike-article-id:1869293
- CLAUS, M.; ET AL. Water adsorption on amorphous silica surfaces: a Car, Parrinello simulation study. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 17, n. 26, p. 4005, 2005. doi:
- CORNELL, W. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 5179-5197, 1995. doi: citeulike-article-id:80546
- CORNELL, W. D. et al. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p. 9620, 1993. doi:
- CRUZ-CHU, E. R.; AKSIMENTIEV, A.; SCHULTEN, K. Water-Silica Force Field for Simulating Nanodevices. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 43, p. 21497-21508, 2006. doi:
- _____. Ionic Current Rectification through Silica Nanopores. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 5, p. 1850-1862, 2009a. doi:
- CRUZ-CHU, E. R. et al. Molecular control of ionic conduction in polymer nanopores. **Faraday Discussions**, v. 143, p. 47-62, 2009b. doi:
- DA ROCHA PITA, S. S. et al. Studies of molecular docking between fibroblast growth factor and heparin using generalized simulated annealing. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 108, n. 13, p. 2608-2614, 2008. doi:
- DE GROOT, B. L. et al. An extended sampling of the configurational space of HPr from *E. coli*. **Proteins**, v. 26, n. 3, p. 314-22, Nov 1996a. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199611)26:3<314::AID-PROT7>3.0.CO;2-D [pii]
10.1002/(SICI)1097-0134(199611)26:3<314::AID-PROT7>3.0.CO;2-D
- _____. The consistency of large concerted motions in proteins in molecular dynamics simulations. **Biophys J**, v. 71, n. 4, p. 1707-13, Oct 1996b. doi: S0006-3495(96)79372-4 [pii]
10.1016/S0006-3495(96)79372-4
- DEERE, J. et al. Mechanistic and Structural Features of Protein Adsorption onto Mesoporous Silicates. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 29, p. 7340-7347, 2002. doi: 10.1021/jp0139484
- _____. **Langmuir**, v. 20, p. 532, 2004. doi:
- DIAZ, J. F.; BALKUS, K. J. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 2, p. 115, 1996. doi:
- DUBIN, S. B.; CLARK, N. A.; BENEDEK, G. B. **J. Chem. Phys.**, v. 54, p. 5158, 1971. doi:
- DUMAS, D. P. et al. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **J Biol Chem**, v. 264, n. 33, p. 19659-19665, Nov 1989. doi:
- DUMAS, D. P.; WILD, J. R.; RAUSHEL, F. M. Expression of *Pseudomonas* phosphotriesterase activity in the fall armyworm confers resistance to insecticides. **Experientia**, v. 46, n. 7, p. 729-731, Jul 1990. doi:
- E. J. BYLASKA, W. A. D. J., N. GOVIND, K. KOWALSKI, T. P. STRAATSMA, M. VALIEV, D. WANG, E. APRA, T. L. WINDUS, J. HAMMOND, P. NICHOLS, S. HIRATA, M. T. HACKLER, Y. ZHAO, P.-D. FAN, R. J. HARRISON, M. DUPUIS, D. M. A. SMITH, J. NIEPLOCHA, V. TIPPARAJU, M. KRISHNAN, Q. WU, T. VAN VOORHIS, A. A. AUER, M. NOOIJEN, E. BROWN, G. CISNEROS, G. I. FANN, H. FRUCHTL, J. GARZA, K. HIRAO, R. KENDALL, J. A. NICHOLS, K. TSEMEKHMAN, K. WOLINSKI, J. ANCHELL, D. BERNHOLDT, P. BOROWSKI, T. CLARK, D. CLERC, H. DACHSEL, M. DEEGAN, K. DYALL, D. ELWOOD, E. GLENDENING, M. GUTOWSKI, A. HESS, J. JAFFE, B. JOHNSON, J. JU, R. KOBAYASHI, R. KUTTEH, Z. LIN, R. LITTLEFIELD, X. LONG, B. MENG, T. NAKAJIMA, S. NIU, L. POLLACK, M. ROSING, G. SANDRONE, M. STAVE, H. TAYLOR, G. THOMAS, J. VAN LENTHE, A. WONG, AND Z.

ZHANG, "NWChem, A Computational Chemistry Package for Parallel Computers, Version 5.1". Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA. A modified version 2006.

EGGERS, D. K.; VALENTINE, J. S. **Protein Sci.**, v. 10, p. 250, 2001. doi:

EINSTEIN, A. **Investigations on the Theory of the Brownian Movement**. 1956. Dover Publications ISBN 0486603040.

ESSA, H. et al. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 49, p. 61, 2007. doi:

ESSMANN, U. et al. **J. Chem. Phys.**, v. 103, p. 8577, 1995. doi:

FENG, X. et al. **Science**, v. 276, p. 923, 1997. doi:

FLOUNDERS, A. W. et al. Development of sensors for direct detection of organophosphates.: Part II: sol-gel modified field effect transistor with immobilized organophosphate hydrolase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 8-9, p. 715-722, 1999. doi:

FREDDOLINO, P. L. et al. Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 437-49, Mar 2006. doi: S0969-2126(06)00060-8 [pii] 10.1016/j.str.2005.11.014

GARCIA, A. E. **Phys. Rev. Lett.**, v. 68, p. 2696, 1992. doi:

GHANEM, E.; RAUSHEL, F. M. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 207, n. 2 Suppl, p. 459-470, Sep 2005. doi:

GLAD, M. et al. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. **Journal of Chromatography A**, v. 347, p. 11-23, 1985. doi:

GOMES, D. et al. Molecular Models to Emulate Confinement Effects on the Internal Dynamics of Organophosphorous Hydrolase. In: (Ed.), 2008. p.68-78.

GOMES, D. E. B. et al. The Role of Nonbonded Interactions in the Conformational Dynamics of Organophosphorous Hydrolase Adsorbed onto Functionalized Mesoporous Silica Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 1, p. American Chemical Society--540, 2009a. doi: 10.1021/jp9083635

_____. The Role of Nonbonded Interactions in the Conformational Dynamics of Organophosphorous Hydrolase Adsorbed onto Functionalized Mesoporous Silica Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 1, p. 531-540, 2009b. doi: 10.1021/jp9083635

GOPAL, S. et al. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, p. 516, 2000. doi:

GORADIA, D. et al. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 32, p. 231, 2005. doi:

GUÈGAN, R.; MORINEAU, D.; ALBA-SIMIONESCO, C. Interfacial structure of an H-bonding liquid confined into silica nanopore with surface silanols. **Chemical Physics**, v. 317, n. 2-3, p. 236-244, October 2005. doi:

GUVENCH, O. et al. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages between Hexopyranoses. **J Chem Theory Comput**, v. 5, n. 9, p. 2370, 2009. doi:

GUVENCH, O.; MACKERELL, A. D. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. **Methods Mol Biol**, v. 443, p. 63-88, 2008. doi:

HANASAKI, I. et al. Single-molecule measurements and dynamical simulations of protein molecules near silicon substrates. **Journal of Physics D: Applied Physics**, n. 9, p. 095301, 2008. doi:

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009. doi:

HARDY, D. J. **NAMD-Lite**: \url{http://www.ks.uiuc.edu/Development/MDTools/namdlite/}, University of Illinois at Urbana-Champaign 2007.

HASSANALI, A.; SINGER, S. Static and dynamic properties of the water/amorphous silica interface: a model for the undissociated surface. **Journal of Computer-Aided Materials Design**, v. 14, n. 1, p. 53-63, April 2007. doi:

HASSANALI, A. et al. A Realistic Model For The Water-amorphous Silica Interface: Insights Into The Electrical Double Layer And Bioengineering Applications. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 3, Supplement 1, p. 52a-52a, February 2009. doi:

HASSANALI, A. A.; SINGER, S. J. Model for the Water-Amorphous Silica Interface: The Undissociated Surface. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 38, p. 11181-11193, 2007. doi:

HAYNES, C. A.; NORDE, W. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 169, p. 313, 1995. doi:

HE, J.; LIU, Z. J.; HAI, C. X. **Aiche J.**, v. 54, p. 2495, 2008. doi:

HELLER, J.; HELLER, A. Loss of Activity or Gain in Stability of Oxidases upon Their Immobilization in Hydrated Silica: Significance of the Electrostatic Interactions of Surface Arginine Residues at the Entrances of the Reaction Channels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 19, p. 4586-4590, 1998. doi: 10.1021/ja973911q

HENG, J. B. et al. Beyond the gene chip. **Bell Labs Technical Journal**, v. 10, n. 3, p. 5-22, 2005. doi:

_____. Stretching DNA Using the Electric Field in a Synthetic Nanopore. **Nano Letters**, v. 5, n. 10, p. 1883-1888, 2005. doi: 10.1021/nl0510816

_____. Sizing DNA Using a Nanometer-Diameter Pore. v. 87, n. 4, p. 2905-2911, 2004. doi:

HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116-122, 2008. doi:

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

_____. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008. doi:

HILL, C. M. et al. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 8990, 2004. doi:

_____. Substrate and stereochemical specificity of the organophosphorus acid anhydrolase from Alteromonas sp. JD6.5 toward p-nitrophenyl phosphotriesters. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 10, n. 11, p. 1285-1288, Jun 2000. doi:

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in Mesoporous Silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582-8594, 2008. doi:

HUFF, N. T. et al. Factors affecting molecular dynamics simulated vitreous silica structures. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 253, n. 1-3, p. 133-142, August 1999. doi:

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD -- Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996. doi:

JACKSON, C. J. et al. In Crystallo Capture of a Michaelis Complex and Product-binding Modes of a Bacterial Phosphotriesterase. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 5, p. 1189-1196, February 2008. doi:

JONES, J. E. On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A**, v. 106, n. 738, p. 463-477, October 1, 1924 1924. doi: 10.1098/rspa.1924.0082

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 1996. doi: 10.1021/ja9621760

KAHN, K.; BRUICE, T. C. Parameterization of OPLS-AA force field for the conformational analysis of macrocyclic polyketides. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 996, 2002. doi:

KANE, R. S.; STROOCK, A. D. **Biotechnol. Prog.**, v. 23, p. 316, 2007. doi:

KATIYAR, A. et al. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. **J Chromatogr A**, v. 1069, n. 1, p. 26, 2005. doi:

_____. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 80, p. 311, 2005. doi:

KIRSCHNER, K. N. et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **J Comput Chem**, v. 29, n. 4, p. 55, 2008. doi:

KLIMOV, D. K.; NEWFIELD, D.; THIRUMALAI, D. Simulations of beta-hairpin folding confined to spherical pores using distributed computing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8019-24, Jun 11 2002. doi: 10.1073/pnas.072220699
99/12/8019 [pii]

KOCA, J. et al. Mobility of the Active Site Bound Paraoxon and Sarin in Zinc-Phosphotriesterase by Molecular Dynamics Simulation and Quantum Chemical Calculation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 5, p. 817-826, 2001. doi:

KRAMER, G. J. et al. Interatomic force fields for silicas, aluminophosphates, and zeolites: Derivation based on ab initio calculations. **Phys. Rev. B**, v. 43, n. 6, p. 5068-, February 1991. doi:

LEI, C. et al. Entrapping Enzyme in a Functionalized Nanoporous Support. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 38, p. 11242-11243, 2002. doi: 10.1021/ja026855o

_____. Synergetic Effects of Nanoporous Support and Urea on Enzyme Activity. **Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 1050-1053, 2007a. doi: 10.1021/nl070255b

_____. Enzyme specific activity in functionalized nanoporous supports. **Nanotechnology**, n. 12, p. 125102, 2008. doi:

_____. Biosensing Paraoxon in Simulated Environmental Samples by Immobilized Organophosphorus Hydrolase in Functionalized Mesoporous Silica. **Journal of Environmental Quality**, v. 36, n. 1, p. 233-238, 2007b. doi:

LEI, C. H. et al. **Nanotechnology**, v. 17, p. 5531, 2006. doi:

LEWIS, V. E. et al. Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1591-1597, March 1988. doi:

LI, W. S. et al. Stereoselective detoxification of chiral sarin and soman analogues by phosphotriesterase. **Bioorg Med Chem**, v. 9, n. 8, p. 2083-2091, Aug 2001. doi:

LI, Y.; AUBERT, S. D.; RAUSHEL, F. M. Operational control of stereoselectivity during the enzymatic hydrolysis of racemic organophosphorus compounds. **J Am Chem Soc**, v. 125, n. 25, p. 7526-7527, Jun 2003. doi:

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, August 2001. doi:

LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 13, p. 1400-1412, 2005. doi:

LIPPERT, R. A. et al. A common, avoidable source of error in molecular dynamics integrators. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 4, p. 046101-2, 2007. doi:

LIU, J. et al. **J. Phys. Chem. A**, v. 104, p. 8328, 2000. doi:

LIU, S. Q.; LIU, C. Q.; FU, Y. X. Molecular motions in HIV-1 gp120 mutants reveal their preferences for different conformations. **J Mol Graph Model**, v. 26, n. 1, p. 306-18, Jul 2007. doi: S1093-3263(06)00150-1 [pii] 10.1016/j.jmgm.2006.12.007

LORENZ, C. D. et al. Molecular Dynamics of Ionic Transport and Electrokinetic Effects in Realistic Silica Channels. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 27, p. 10222-10232, 2008. doi:

LU, D.; LIU, Z.; WU, J. Structural transitions of confined model proteins: molecular dynamics simulation and experimental validation. **Biophys J**, v. 90, n. 9, p. 3224-38, May 1 2006. doi: S0006-3495(06)72505-X [pii] 10.1529/biophysj.105.071761

MACKERELL, J. A. D. Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 604, 2004. doi:

MARIA, E. G.; ET AL. Simulation of the electric response of DNA translocation through a semiconductor nanopore, Åcapacitor. **Nanotechnology**, v. 17, n. 3, p. 622, 2006. doi:

MARRINK, S. J. et al. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812-7824, 2007. doi:

MARTIN, M. G. Comparison of the AMBER, CHARMM, COMPASS, GROMOS, OPLS, TraPPE and UFF force fields for prediction of vapor-liquid coexistence curves and liquid densities. **Fluid Phase Equilibria**, v. 248, n. 1, p. -55, 2006. doi:

MASINI, P.; BERNASCONI, M. Ab initio simulations of hydroxylation and dehydroxylation reactions at surfaces: amorphous silica and brucite. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 14, n. 16, p. 4133, 2002. doi:

MESENTEAN, S. et al. The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor. **J Mol Biol**, v. 367, n. 2, p. 591-602, Mar 23 2007. doi: S0022-2836(06)01748-7 [pii] 10.1016/j.jmb.2006.12.058

MINTON, A. P. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 14, p. 10577-10580, 2001. doi:

_____. How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes? **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 14, p. 2863-2869, 2006. doi:

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952-962, 1992. doi:

MOFFITT, J. R. et al. Recent Advances in Optical Tweezers. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 205-228, 2008. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225

MONTICELLI, L. et al. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 5, p. 819-834, 2008. doi:

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. ISBN 978-85-88352-87-6.

- MOULT, J. Comparative modeling in structural genomics. **Structure**, v. 16, n. 1, p. 6, 2008. doi:
- MOVILEANU, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 333-341, 2009. doi:
- NILSSON, J. et al. Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 2, p. 141-157, 2009. doi:
- OHLSTEIN, E. H.; RUFFOLO, R. R., JR.; ELLIOTT, J. D. Drug discovery in the next millennium. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 40, p. 177-91, 2000. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.177
- OMBURG, G. et al. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 19, p. 13278-13283, 1992. doi:
- OOSTENBRINK, C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **European Biophysics Journal**, v. 34, n. 4, p. 273-284, June 2005a. doi:
- _____. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **Eur Biophys J**, v. 34, n. 4, p. 84, 2005b. doi:
- _____. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 2004. doi:
- PEDONE, A. et al. FFSiOH: a New Force Field for Silica Polymorphs and Their Hydroxylated Surfaces Based on Periodic B3LYP Calculations. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 7, p. 2522-2531, 2008. doi:
- PENN, S. G.; HE, L.; NATAN, M. J. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 7, p. 609, 2003. doi:
- PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **J Comput Chem**, v. 26, n. 16, p. 1781-802, Dec 2005. doi: 10.1002/jcc.20289
- PINEDA, J. R.; CALLENDER, R.; SCHWARTZ, S. D. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. **Biophys J**, v. 93, n. 5, p. 1474-83, Sep 1 2007. doi: S0006-3495(07)71408-X [pii] 10.1529/biophysj.107.106146
- PONDER, J. W. et al. Current Status of the AMOEBA Polarizable Force Field. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 8, p. American Chemical Society--2564, 2010. doi: 10.1021/jp910674d
- PRICE, D. J.; BROOKS, C. L. Modern protein force fields behave comparably in molecular dynamics simulations. **J Comput Chem**, v. 23, n. 11, p. 1045-1057, Aug 2002. doi:
- RATHORE, N.; KNOTTS, T. A. T.; DE PABLO, J. J. Confinement effects on the thermodynamics of protein folding: Monte Carlo simulations. **Biophys J**, v. 90, n. 5, p. 1767-73, Mar 1 2006. doi: S0006-3495(06)72363-3 [pii] 10.1529/biophysj.105.071076
- RAUSHEL, F. M. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 288 - 295, 2002. doi:
- _____. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 288-295, Jun 2002. doi:
- RAUSHEL, F. M.; HOLDEN, H. M. Phosphotriesterase: an enzyme in search of its natural substrate. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 74, p. 51-93, 2000. doi:
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient Heterogeneous Biocatalysts by Entrapment of Lipases in Hydrophobic Sol-Gel Materials. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 3, p. 301-303, 1995. doi:

RHEE, M.; BURNS, M. A. Nanopore sequencing technology: nanopore preparations. **Trends Biotechnol.**, v. 25, n. 4, p. 174-81, Apr 2007. doi: S0167-7799(07)00048-0 [pii] 10.1016/j.tibtech.2007.02.008

ROCHU, D. et al. Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence. **Biochem J.**, v. 380, n. Pt 3, p. 627-33, Jun 15 2004. doi: 10.1042/BJ20031861
BJ20031861 [pii]

RODRIGUEZ, R. et al. **Bioinformatics**, v. 14, p. 523, 1998. doi:

ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. **Protein Eng., Des. Sel.**, v. 18, p. 51, 2005. doi:

RUSMINI, F.; ZHONG, Z. Y.; FEIJEN, J. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1775, 2007. doi:

RUSSELL, R. J. et al. Poly(ethylene glycol) hydrogel-encapsulated fluorophore-enzyme conjugates for direct detection of organophosphorus neurotoxins. **Anal Chem.**, v. 71, n. 21, p. 4909-12, Nov 1 1999. doi:

SAMPLES, C. R.; RAUSHEL, F. M.; DEROSE, V. J. Activation of the Binuclear Metal Center through Formation of Phosphotriesterase Inhibitor Complexes. **Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 3435-3442, 2007. doi:

SCHEEK, R. M. et al. Structure from NMR and molecular dynamics: Distance restraining inhibits motion in the essential subspace. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 1, p. 106-111, 1995. doi:

SCHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation**. Westview, 2002.

SCHMIDT-STEFFEN, A.; STAUDE, E. Ultrafiltration membranes for chemical bonding of urease. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 7, p. 725-731, 1992. doi:

SHCHUKAREV, A.; ROSENQVIST, J.; SJÅBERG, S. XPS study of the silica-water interface. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 137-140, p. 171-176, 2004. doi:

SLOWING, I. I. et al. **Adv. Funct. Mater.**, v. 17, p. 1225, 2007a. doi:

SLOWING, I. I.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S. Y. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 8845, 2007b. doi:

SLOWING, I. I. et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1278-1288, 2008. doi:

SOARES, T. et al. Alpha- and beta-polypeptides show a different stability of helical secondary structure. **Tetrahedron**, v. 60, n. 35, p. 7775-7780, 2004. doi:

SOARES, T. A. et al. Validation of the GROMOS force-field parameter set 45Alpha3 against nuclear magnetic resonance data of hen egg lysozyme. **J Biomol NMR**, v. 30, n. 4, p. 22, 2004. doi:

SOARES, T. A.; FERREIRA, R. Aplicação da equação de Poisson-Boltzmann ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas. **Química Nova**, v. 27, p. 640-647, 2004. doi:

SOARES, T. A. et al. **J. Comput. Chem.**, v. 26, p. 725, 2005. doi:

SOARES, T. A.; OSMAN, M. A.; STRAATSMA, T. P. Molecular Dynamics of Organophosphorous Hydrolases Bound to the Nerve Agent Soman. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 3, n. 4, p. 1569-1579, 2007. doi:

STEPANOVA, M. Dynamics of essential collective motions in proteins: theory. **Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys**, v. 76, n. 5 Pt 1, p. 051918, Nov 2007. doi:

SUARDIAZ, R. et al. Parameterization and validation of Gromos force field to use in conformational analysis of epoxidic systems. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 778, n. 1-3, p. -25, 2006. doi:

TAKAGI, F.; KOGA, N.; TAKADA, S. How protein thermodynamics and folding mechanisms are altered by the chaperonin cage: molecular simulations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11367-72, Sep 30 2003. doi: 10.1073/pnas.1831920100 [pii] 1831920100 [pii]

TREWYN, B. G. et al. **Chem. Commun.**, p. 3236, 2007. doi:

UNGER, K. K. **Porous silica, its properties and use as support in column liquid chromatography**. Amsterdam ; New York New York: Elsevier Scientific Pub. Co. ; distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier/North-Holland, 1979. xi, 336 p. ISBN 0444416838.

VAN AALTEN, D. M. et al. Protein dynamics derived from clusters of crystal structures. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 6, p. 2891-2896, December 1997. doi:

VAN BEEST, B. W. H.; KRAMER, G. J.; VAN SANTEN, R. A. Force fields for silicas and aluminophosphates based on ab initio calculations. **Phys. Rev. Lett.**, v. 64, n. 16, p. 1955-1958, April 1990. doi:

VAN DER SPOEL, D.; WENSINK, E. J. W.; HOFFMANN, A. C. Lifting a Wet Glass from a Table: A Microscopic Picture. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5666-5672, 2006. doi:

VAN GUNSTEREN, W.; BERENDSEN, H. 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. doi: citeulike-article-id:2151715

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 45, p. 4064, 2006. doi:

_____. **Chimia**, v. 55, p. 856, 2001. doi:

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

VAN GUNSTEREN, W. F.; DOLENC, J. Biomolecular simulation: historical picture and future perspectives. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 1, p. 11-5, 2008. doi:

VAN GUNSTEREN, W. F.; DOLENC, J.; MARK, A. E. Molecular simulation as an aid to experimentalists. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 2, p. 149-153, 2008. doi:

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **J Comput Chem**, v. 31, n. 4, p. 90, 2010. doi:

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98, 1967. doi:

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 6436, 2005. doi:

VINU, A. et al. **Chem. Mater.**, v. 16, p. 3056, 2004. doi:

_____. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, p. 8297, 2003. doi:

WANEKAYA, A. K. et al. Nanowire-Based Electrochemical Biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 533-550, 2006. doi:

WANG, J.; CIEPLAK, P.; KOLLMAN, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 12, p. -1074, 2000. doi:

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004. doi:

- WANG, W. et al. BIOMOLECULAR SIMULATIONS: Recent Developments in Force Fields, Simulations of Enzyme Catalysis, Protein-Ligand, Protein-Protein, and Protein-Nucleic Acid Noncovalent Interactions. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 30, n. 1, p. Annual Reviews--243, 2003. doi: 10.1146/annurev.biophys.30.1.211
- WEI, Y. et al. Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process. **Materials Letters**, v. 44, n. 1, p. 6-11, 2000. doi:
- WEITKAMP, J.; HUNGER, M.; RYMSA, U. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 48, p. 255, 2001. doi:
- WENSINK, E. J. W. et al. Properties of Adsorbed Water Layers and the Effect of Adsorbed Layers on Intermolecular Forces by Liquid Bridging. **Langmuir**, v. 16, n. 19, p. 7392-7400, 2000. doi:
- WHITTEN, S. T.; GARCIA-MORENO, E. B.; HILSER, V. J. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 12, p. 4282-7, Mar 22 2005. doi: 0407499102 [pii] 10.1073/pnas.0407499102
- WIECZOREK, G.; ZIELENKIEWICZ, P. Influence of macromolecular crowding on protein-protein association rates--a Brownian dynamics study. **Biophys J**, v. 95, n. 11, p. 5030-6, Dec 2008. doi: S0006-3495(08)78930-6 [pii] 10.1529/biophysj.108.136291
- WONG, K.-Y.; GAO, J. The Reaction Mechanism of Paraoxon Hydrolysis by Phosphotriesterase from Combined QM/MM Simulations. **Biochemistry**, v. 46, n. 46, p. 13352-13369, 2007. doi:
- WU, P.; CASTNER, D. G.; GRAINGER, D. W. Diagnostic devices as biomaterials: a review of nucleic acid and protein microarray surface performance issues. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 19, n. 6, p. 725-53, 2008. doi: 10.1163/156856208784522092
- YAUK, C. L.; BERNDT, M. L. Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. **Environ Mol Mutagen**, v. 48, n. 5, p. 380-94, Jun 2007. doi: 10.1002/em.20290
- ZHANG, L.; ZHAO, G.; SUN, Y. Molecular Insight into Protein Conformational Transition in Hydrophobic Charge Induction Chromatography: A Molecular Dynamics Simulation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 19, p. 6873-6880, 2009. doi:
- ZHANG, Z. et al. Entropic folding pathway of human epidermal growth factor explored by disulfide scrambling and amplified collective motion simulations. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15269-78, Dec 26 2006. doi: 10.1021/bi0615083
- ZHAO, Y. N. et al. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 8398, 2009. doi:
- ZHOU, H.-X.; RIVAS, G.; MINTON, A. P. Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences*. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, n. 1, p. 375-397, 2008. doi:
- ZHOU, H. X.; DILL, K. A. Stabilization of proteins in confined spaces. **Biochemistry**, v. 40, n. 38, p. 11289-93, Sep 25 2001. doi: bi0155504 [pii]

Apêndice

Ferramentas para modelagem molecular e parâmetros de simulação

Porcupine

Diego Enry Barreto Gomes¹; Roberto D. Lins^{2,3}; Thereza A. Soares^{2,3}; Pedro G. Pascutti¹

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil (3) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

Descrição

O programa **porcupine** foi desenvolvido para auxiliar a visualização dos componentes principais de uma simulação de dinâmica molecular (dinâmica essencial) ao projetar no espaço, os autovetores de movimento de acordo com a amplitude calculada por PCA. O programa lê um arquivo no formato PDB contendo os pontos extremos do modo de vibração calculado, opcionalmente filtra vetores de baixa amplitude, e escreve um arquivo de saída no formato VMD contendo setas com direção e tamanho proporcionais à direção e amplitude do modo de vibração.

Exemplo de uso.

1) Realizando o cálculo de dinâmica essencial com o GROMACS

```
g_covar -f trajetoria.xtc -s topologia.tpr -o autovalores.xvg -v autovetores.trr
```

2) Projeção dos pontos extremos do movimento em uma trajetória no formato PDB, usando o GROMACS

```
g_anaeig -v eigenvec.trr -f trajetoria.xtc -first 1 -last 1 -extr extremos.pdb -nframes 2
```

3) Geração das setas para visualização dos autovetores usando o programa **porcupine**

```
porcupine -i extremos.pdb -o setas.vmd -f 1.0 -c
```

4) Visualização no programa VMD

```
vmd -e setas.vmd
```

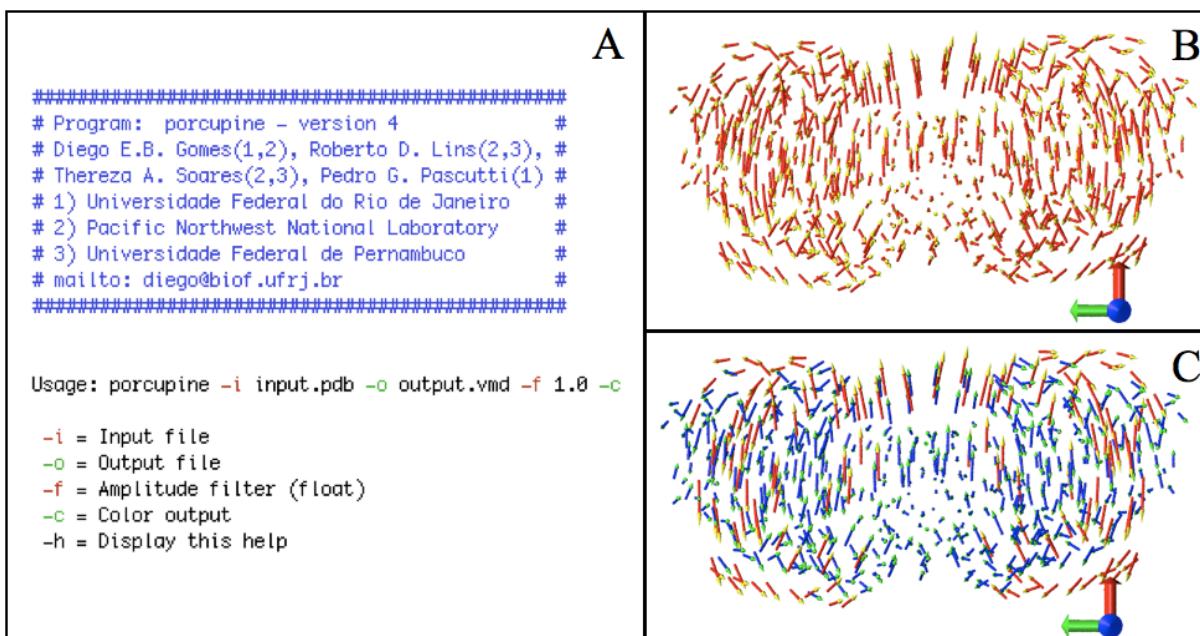


Ilustração de uso do programa porcupine. (A) Interface de comando. (B) Exemplo de saída no renderizada no programa VMD, as setas indicam a direção e amplitude do autovetor. (C) O uso avançado do programa permite distinguir vetores de diferentes amplitudes em cores diferentes, ex em vermelho os vetores com grande amplitude e em azul os vetores de menor amplitude.

Trj2pdb

Diego Enry Barreto Gomes¹; Thereza A. Soares^{2,3}; Pedro G. Pascutti¹; Tjerk P. Straatma³

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil (3) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

Descrição

O **trj2pdb** é um programa desenvolvido para converter trajetórias de simulação de dinâmica molecular no formato TRJ, adotado pelo programa NWChem, para trajetórias no formato PDB, universalmente aceito pelos programas de análise de simulação. Além da função de conversão, o **trj2pdb** permite ajustar a freqüência de escrita da trajetória e remover moléculas do solvente.

Exemplo de uso

```
#####
# Program: NWChem trj2pdb - version 15.2      #
# Diego E.B. Gomes(1,2), Pedro G. Pascutti(1), #
# Thereza A. Soares(2,3), Tjerk P. Straatsma(2)#
# 1) Universidade Federal do Rio de Janeiro    #
# 2) Pacific Northwest National Laboratory     #
# 3) Universidade Federal de Pernambuco       #
# mailto: diego@biof.ufrj.br                  #
#####
```

Usage: trj2pdb **-i** input.trj **-o** output.pdb

-i = Input file
-o = Output file
-b = First frame to read
-skip = Read every 'skip' frames
-h = Display this help

Tela de execução do programa **trj2pdb** apresentando a instrução de uso.

Nanopore

Diego Enry Barreto Gomes¹; Thereza A. Soares^{2,3}; Pedro G. Pascutti¹; Tjerk P. Straatma³

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil (3) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

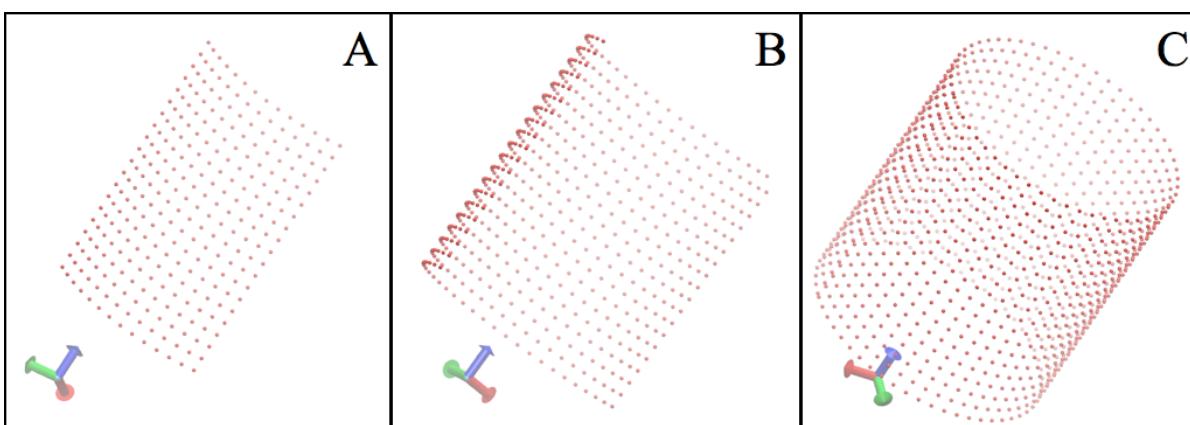
Descrição

O programa **nanopore** escreve um arranjo de átomos no formato PDB, orientado no eixo Z, em diferentes condições e formas. O programa pode desenhar cubos ou cilindros de dimensões e espaço entre os pontos definidos pelo usuário. Além disso podem ser produzidas frações de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de cilindro. Os arranjos produzidos podem ser usados em simulações de mecânica molecular ao incorporar atributos atômicos aos pontos (GOMES, 2008; GOMES, 2010).

Exemplo de uso

#Execute nanopore % ./nanopore #Selecionar entre as formas disponíveis Select the shape “ 1 - cubic box “ 2 - generic XYZ box “ 3 - cylinder” 4 - tube + half tube + quarter tube “ % 4	#Indicar espaçojamento entre dois pontos. #Esta distância pode determinar o raio do arranjo circular. Please enter the distance between groups (Angstron) % 10 # Indicar a extensão da rede de pontos. Se “cubic box” for # selecionada, apenas uma dimensão é #requerida. Se “generic # XYZ” é selecionado, as três dimensões serão necessárias. Neste # exemplo X e Y são escalonados para o raio selecionado e suas # dimensões definidas pela distância entre os #pontos. Enter the Z dimension in Angstrons (integer value) % 200
---	--

Demonstração da execução do **nanopore**.



Arranjos produzidos pelo programa **nanopore** com espaçojamento entre os pontos de 10 Å. (A) $\frac{1}{4}$ de cilindro; (B) $\frac{1}{2}$ cilindro; (C) cilindro.

Hbmap2grace

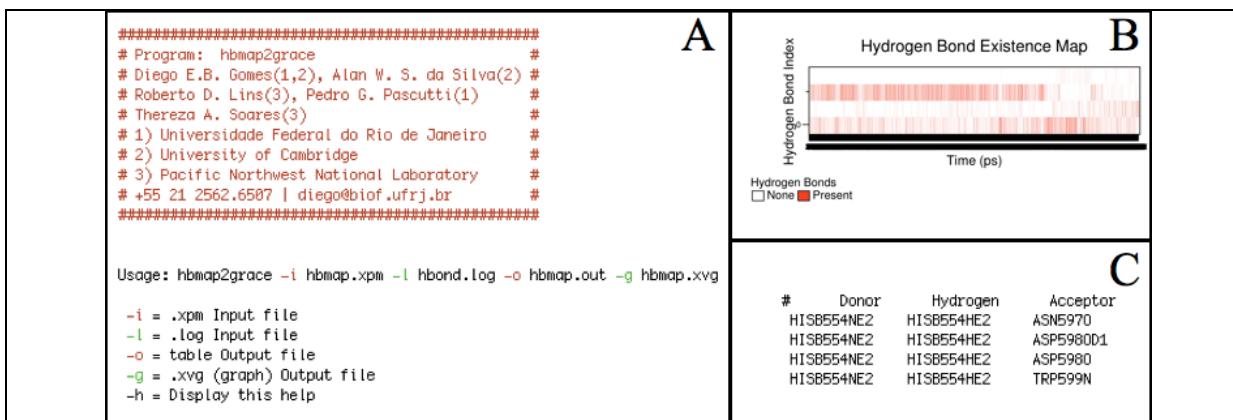
Diego Enry B. Gomes¹, Alan Wilter da Silva², Roberto D. Lins³, Pedro G. Pascutti¹, Thereza A. Soares³

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) EMBL - EBI, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge - Inglaterra. (3) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

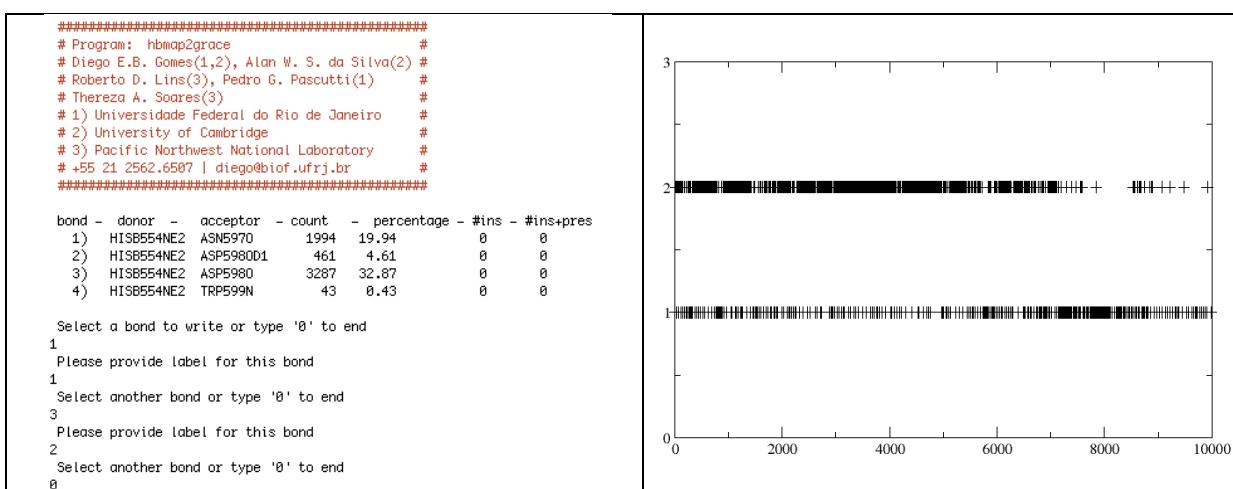
Descrição

O programa hbmap2grace calcula a frequência das ligações hidrogênio dos arquivo **hbmap.xpm** e relaciona com a tabela de pares contida no arquivo **hbond.log**, ambos gerados pelo programa **g_hbond** do GROMACS. O programa também permite selecionar conjuntos de ligações interessantes, agrregar ligações, uma mesma marcação (*label*) para um aceitador com todos doadores, e reapresentar em escala temporal as ligações selecionadas.

Exemplo de uso



Tela de ajuda do programa **hbmap2grace** (A) e arquivos de teste, distribuídos com o programa. (B) Mapa de ligações hidrogênio gerado a partir do arquivo **hbmap.xpm**, convertida em imagem pelo programa **xpm2ps** (GROMACS). C) Lista de ligações hidrogênio derivada de um arquivo **hbond.log**.



Resultado do programa **hbmap2grace**. À esquerda o programa em execução usando os arquivos de entrada mostrados na figura anterior. Logo que o programa inicia já são apresentadas as frequências das ligações hidrogênio, indexadas para seleção pelo usuário. As ligações podem ser agregadas numa mesma representação se for usada a mesma marcação (*label*). À direita o produto do programa apresentado como gráfico no programa **xmgrace**, os símbolos “+” representam a ocorrência de ligação na escala de tempo do eixo horizontal. No eixo vertical estão os números indicando as ligações selecionadas no exemplo a esquerda.

SurfinMD

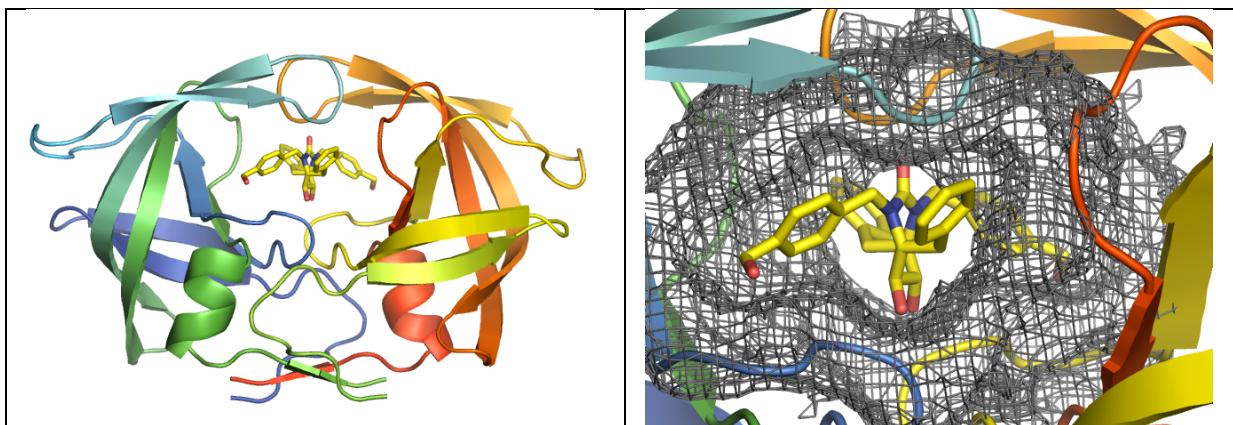
Diego Enry Barreto Gomes¹, Gabriel Limaverde Soares Costa Sousa^{1,3}, Alan Wilter Sousa da Silva², Pedro Geraldo Pascutti¹

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) EMBL - EBI, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge - Inglaterra (3) Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

Descrição

O programa **SurfinMD** usa o algoritmo de Connolly¹ para calcular a superfície molecular. Como padrão, o programa calcula a superfície acessível ao solvente, utilizando uma esfera de prova com raio de 1.4Å, compatível com o diâmetro do solvente água. O programa é capaz de identificar a região excluída do solvente na interface entre duas moléculas (ex. enzima-inibidor). A área da superfície pode ser calculada para arquivos no formato PDB, como trajetórias de simulações de dinâmica molecular ou estruturas de Ressonância Magnética Nuclear de proteínas. A área total calculada é dividida em hidrofóbica e hidrofílica, de acordo com a característica em pH 7.0 do resíduo de aminoácido, quando presente (arquivo **surf.dat**). Outros resíduos que não aminoácidos presentes no banco de dados do programa são excluídos desta definição. Além disso o programa discrimina a área média para cada resíduo acompanhada do desvio padrão (arquivo **rsurf.dat**). Os arquivos de saída são simples e compatíveis com o programa **xmgrace**.

Exemplo de uso



Sistema de teste distribuído junto ao programa **SurfinMD**. Protease do vírus HIV-1 complexada com o ligante DMP (PDB 1BVE, estrutura número 1). À esquerda a proteína é apresentada no modelo *Cartoon* e colorida de acordo com a sequência. O ligante DMP, posicionado no sítio ativo da enzima é apresentado pelo modelo de bastões. À direita uma aproximação do sítio ativo onde a superfície molecular dos átomos a 4.0Å do DMP é apresentada como uma rede de pontos conectados (modelo *Mesh*).

¹ Connolly,M.L. "solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic-acids" (1983) Science, 221, 709–713

```

#####
# Program: SurfinMD - version 1.05r2 #
# Diego E.B. Gomes(1), Gabriel Limaverde SCS(1,3) #
# Alan Wilter SS (2), Pedro G. Pascutti(1) #
# 1) Universidade Federal do Rio de Janeiro #
# 2) EMBL - EBI, Wellcome Trust Genome Campus #
# 3) Instituto Nacional do Cancer #
# mailto: diego@biof.ufrj.br #
#####

Usage:
surfinmd -r ref.pdb -i in.pdb -o surf.dat -or rsurf.dat -p 1.4 -d 1.0 -a 6

Please review all usage options [default]

-h = Display this help
-r = Reference Structure [ref.pdb]
-i = Input file [traj.pdb]
-o = Output surface [surf.dat]
-or = Output surface/residue [rsurf.dat]
-p = probe radius [1.4]
-d = probe density [1.0 A^2]
-a = attention number [6]
-ext = (Rvdw + ext) [n]
-scal = (Rvdw * scal) [n]

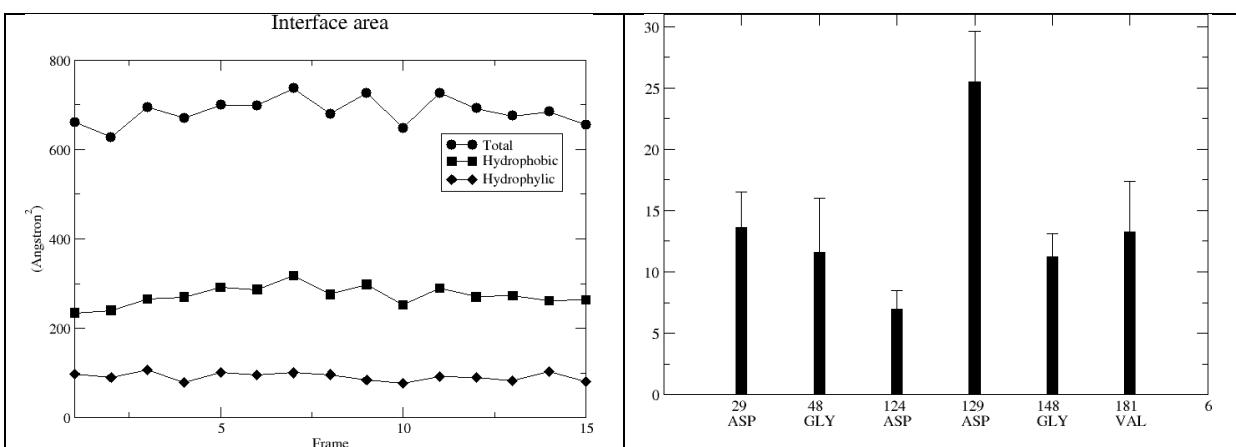
#####
# Program: SurfinMD - version 1.05r2 #
# Diego E.B. Gomes(1), Gabriel Limaverde SCS(1,3) #
# Alan Wilter SS (2), Pedro G. Pascutti(1) #
# 1) Universidade Federal do Rio de Janeiro #
# 2) EMBL - EBI, Wellcome Trust Genome Campus #
# 3) Instituto Nacional do Cancer #
# mailto: diego@biof.ufrj.br #
#####

model      1 Total = 661.14362   Hydrophobic = 234.44025   Hydrophilic = 96.992592
model      2 Total = 628.13232   Hydrophobic = 248.05519   Hydrophilic = 98.353325
model      3 Total = 694.43530   Hydrophobic = 265.93298   Hydrophilic = 106.72389
model      4 Total = 670.68768   Hydrophobic = 269.95331   Hydrophilic = 79.265175
model      5 Total = 699.53461   Hydrophobic = 291.40411   Hydrophilic = 100.73895
model      6 Total = 698.33350   Hydrophobic = 287.01297   Hydrophilic = 95.645233
model      7 Total = 736.87122   Hydrophobic = 317.93936   Hydrophilic = 100.39583
model      8 Total = 680.43219   Hydrophobic = 276.11438   Hydrophilic = 96.479385
model      9 Total = 727.37067   Hydrophobic = 296.02753   Hydrophilic = 84.102051
model     10 Total = 648.99814   Hydrophobic = 252.24219   Hydrophilic = 76.719124
model     11 Total = 726.03766   Hydrophobic = 289.67581   Hydrophilic = 91.279815
model     12 Total = 692.09980   Hydrophobic = 278.38342   Hydrophilic = 98.178917
model     13 Total = 675.29828   Hydrophobic = 272.61984   Hydrophilic = 83.015648
model     14 Total = 684.70221   Hydrophobic = 261.58954   Hydrophilic = 103.58489
model     15 Total = 656.32068   Hydrophobic = 263.88284   Hydrophilic = 80.889679

Tempo de execução = 5.6638050 segundos
Tempo por frame = 0.37892035 segundos

```

Telas de execução do **SurfinMD**. À esquerda o exemplo de uso do programa. À direita uma demonstração de execução para o sistema 1BVE.



Resultado do programa **SurfinMD**. A saída do programa consiste em dois arquivos. À esquerda um gráfico produzido com o arquivo **surf.dat**, contém a área total, hidrofóbica e hidrofílica para cada quadro apresentado. À direita, o resultado do arquivo **rsurf.dat**, contendo a área média e o desvio padrão discriminada por resíduo. Pela clareza, apenas algumas áreas são apresentadas no gráfico.

Rsurf2grace

Diego Enry Barreto Gomes¹, Priscila da Silva Figueiredo Celestino¹, Pedro Geraldo Pascutti¹

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

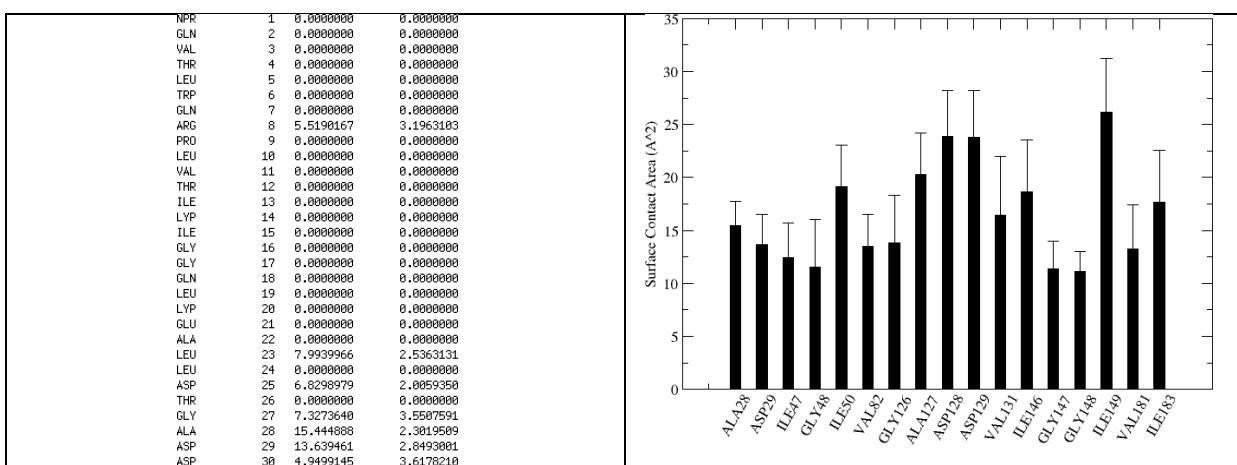
Descrição

A informação de área de interface molecular produzida pelo programa **SurfinMD** é de grande valia para interpretação de interações moleculares e planejamento de fármacos, sendo usada amplamente em Teses e trabalhos do nosso grupo e colaboradores. O processamento dos dados da área de interface molecular, entretanto, tem sido um processo lento e tedioso. Para eliminar estes fatores limitantes o programa **rsurf2grace** foi desenvolvido como complemento ao **SurfinMD**, automatizando o pós-processamento do arquivo de interfaces intermoleculares (**rsurf.dat**) e produzindo gráficos apenas com as informações de área consideradas relevantes pelo usuário.

```
#####
# Program: rsurf2grace
# Diego E.B. Gomes, Priscila S.F. Celestino
# & Pedro G. Pascutti
# Universidade Federal do Rio de Janeiro
# +55 21 2562.6507 | diego@biof.ufrj.br
#####

Usage: rsurf2grace -i rsurf.dat -o rsurf.grc -c 10.0
-i = .dat Input file (output from SurfinMD)
-o = .grc Output file (Xmgrace compatible)
-c = Cut-off in Å² to consider Surface Area
-h = Display this help
```

Tela de execução do programa **rsurf2grace** apresentando a instrução de uso.



À esquerda o conteúdo parcial do arquivo **rsurf.dat** produzido pelo programa **SurfinMD**, contendo a média e o desvio padrão da área de contato proteína-ligante, discriminada por resíduo. O programa **rsurf2grace** processa os dados apresentando graficamente (por arquivo compatível com o **Xmgrace**) apenas a informação comumente procurada pelos usuários: resíduos com área de interação acima de um critério de corte. À direita, o gráfico automaticamente gerado, contendo apenas as áreas de interação maiores que 10.0 Å^2 , entre a protease do HIV e o ligante DMP (PDB 1BVE, estruturas 1 à 20).

Protocolo para construção de silica amorfa funcionalizada.

Diego E.B. Gomes¹, Roberto D. Lins², Thereza A. Soares², Pedro G. Pascutti¹

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA.
Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br – Brasil. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

```
# Requisitos para completar o protocolo com sucesso
```

- 1) Programas externos
 - a) VMD 1.8.7 (Visual Molecular Dynamics)
 - b) NAMD-Lite
 - c) NAMD
- 2) Run input file for NAMD-Lite
 - a) opt.namdlite
 - b) md.namdlite
 - c) quick.opt.namdlite
 - d) sio.buckingham.inp
- 2) Nossos programas
 - a) pdb2psf
- 3) Nossos scripts para o VMD
 - a) step1.tcl
 - b) count_and_label_2breakbonds.tcl

```
# Tipos de átomos
```

SI = Silício

Ob = Oxigênio "bulk"

Os = Oxigênio de superfície

Hs = Hidrogênio de superfície

```
# Cargas. Note a carga do SI.
```

SI = 0.900 "bulk"; superfície ligado a silanol isolado ou vicinal

SI = 0.910 superfície ligado a silanol geminal (dois OH)

Ob = -0.450 "bulk"

Os = -0.660 superfície, ligado a hidrogênio

Hs = 0.430 superfície, ligado ao oxigênio

```
# Step 1: building de first structure
```

```
# Open VMD : inorganic builder: Amorphous SIO
```

```
# Add exclusion: VMD Selection: z > 10.0 or z < -10.0 : Build device
```

```
# close VMD
```

```
# Set unit cell dimensions on "script1.tcl" then run the script
```

```
vmd -dispdev text ASiO2.psf ASiO2.pdb -e script1.tcl >script1.log
```

```
# NOTA: O espaço entre as superfícies pode ser facilmente modificado  
aumentando o vetor Z.
```

```
export PATH=$PATH:/var/lmdm/dgomes/silica/programas/bin/
```

```
export vmdscripts=/var/lmdm/dgomes/silica/programas/vmdscripts/
```

```
# Podemos usar as cargas de Wensink2000.pdf
```

```
#Properties of Adsorbed Water Layers and the Effect of Adsorbed Layers on  
Interparticle Forces by Liquid Bridging
```

```
#E. J. W. Wensink, A. C. Hoffmann, M. E. F. Apol, and H. J. C. Berendsen
```

```
#Langmuir, 2000, 16 (19), 7392-7400
```

```
#DOI: 10.1021/la000009e
```

```
# Os = -0.71
```

```

# Hs = 0.40
# SIs = 0.31

# So que esse paper eh para silica cristalina e nao conta os efeitos de
# usar grupos geminais nem vicinais
# Eu proponho fazer assim:
# 1) Isolada
# Os = -0.71
# Hs = 0.40
# SIs = 0.31
# 2) Geminal
# Os = -0.71 duas vezes
# Hs = 0.40 duas vezes
# SIs = 0.62

Outro metodo eh fazer como Cruz-Chu, mas vai dar muito trabalho e eu nao
tenho o menor tempo agora.
qnet = qcio + qneighbour

*****
Enquanto eu nao faco isso, na minimizacao vamos considerar
SI = 0.9
Ob = 0.45
Os = -0.24
Hs = 0.24
*****
e a carga do grupo funcional, atomo = 1 vai ser 0.24

# As cargas para o 4C_COOH.pdb foram tiradas do GLU

# Step 1: building de first structure
# Open VMD : inorganic builder: Amorphous SIO
# Add exclusion: VMD Selection: z > 10 or z < -10 : Build device
#execute the step1.tcl script then close vmd.
#NOTE
# BEFORE executing the script, remember to correctly set the unit cell
dimensions
#/NOTE
source script1_v5.tcl

# Functions of step1.tcl
# 1) Fix atom properties: names,type,charge,mass.
# 2) Find shell/interior atoms
# 3) Assign "beta 1" to fix interior atoms
# 4) Neutralize the system by randomly removing Dangling atoms ( Silicon <
numbonds 3 or Oxygen numbonds < 2)
# 5) Write output files

# quick and dirty:
# vmd -dispdev text ASiO2.psf ASiO2.pdb < script1_v6beta.tcl >
script1_v6.log

#Step 2: Optimization the structure using NAMD-Lite
# TIP: open the previous log to get the cellBasisVectors :)
mdsim opt.namdlite
mdsim md.namdlite
mdsim quick.opt.namdlite

# Open in VMD and check for periodic disasters ! Manually fix then.
vmd -dispdev text step1.psf step3.coor < fixpbc.tcl > fixpbc.log

```

```

# step3.pdb will be created.

# !! Check if any atom has escaped the surface or whatever weird stuff may
have happened.
# Move step3.pdb to step3.b4.fix.pdb
# Save fixed file as step3.pdb

# PART 2: PREPARE THE SURFACE
# b4_breakbonds
!pdb2psf -i step3.pdb -bonds -d 2.0 -o step4.psf
pdb2psf -i step3.pdb -bonds -d 2.0 -o step4.psf
b4_breakbonds -i step3.pdb -p step4.psf -o step4.pdb

# Execute VMD to measure exposed surface, estimate number of bonds to
delete, and label atoms on the VERY surface.
vmd -dispdev text -pdb step4.pdb -e count_and_label_2breakbonds.tcl >
count_and_label_2breakbonds.log

cp ok2breakbonds.pdb step5.pdb
pdb2psf -i step5.pdb -bonds -d 2.0 -o step5.psf

#check count_and_label_2breakbonds.log for number of bonds to delete.
breakbonds -i step5.pdb -p step5.psf -o step6.psf <<EOF
928
EOF

# POR FAVOR USAR A VERSAO pdb2psf_v9beta2 BETA DOIIS!!!
# Eu coloquei a opcao de ler os ATOMTYPES a partir do .psf e esqueci de
criar uma condicao para o caso do arquivo .psf so conter as BONDS
pdb2psf -i step5.pdb -p step6.psf -o step7.psf -angles

#Attention here, it's really 5 to 7.
cp step5.pdb step7.pdb

./programas/fixcharges.part2.sh step7.psf step8.psf
cp step7.pdb step8.pdb
cp step8.pdb step8_fixed.pdb

# Optimize to remove bad contacts.
/usr/local/bin/charmrn +local /usr/local/bin/namd2 +p2 step8.em.namd
&>step8.em.log&

*** Adicionar os hidrogenios com o silica protonate
# Olhe o /DATA1/doutorado/programas/2009/silica/add_group_v3/test2

*****
* Vâ necessário colocar o campo CRYST no arquivo de entrada. *
* Copie de algum .pdb anterior, pode ser até o step1.pdb      *
* os vetores da caixa peri\gica não se alteram.             *
*****


# Adicionar H ou OH na silica, e manter não-fixos os átomos adicionados.
silica_protonate -i step8.coor -p step8.psf -o step9.pdb -op tmp.step9.psf
## POR FAVOR USAR A VERSAO pdb2psf_v9beta2 BETA DOIIS!!!
## Eu coloquei a opcao de ler os ATOMTYPES a partir do .psf e esqueci de
criar uma condicao para o caso do arquivo .psf so conter as BONDS

# quickly use gromacs to fix residue number.
editconf -f step9.pdb -o step9.pdb
pdb2psf -i step9.pdb -p tmp.step9.psf -o step9.psf

```

```

#corrigir as cargas para o forcefield.
silica_fix_charges -i step9.psf -o step10.psf
cp step9.pdb step10.pdb
cp step10.pdb step10_fixed.pdb

[PARTE 3]
a) Otimizar bonds
/usr/local/bin/charmrn /usr/local/bin/namd2 step10.em.namd ++local +p4 &>
step10.em.log &

b) Otimizar angulos
pdb2psf -i step10.coor -p step10.psf -o step11.psf -angles -psftype
/usr/local/bin/charmrn /usr/local/bin/namd2 step11.em.namd +p4 ++local &>
step11.em.log &

c) Otimizar diedros
# nao precisa mais fazer o fix.charges, o pdb2psf preserva as cargas do psf
anterior com a opcao -psftype
pdb2psf -i step11.coor -p step11.psf -o step12.psf -dihedrals -psftype
/usr/local/bin/charmrn ++local /usr/local/bin/namd2 step12.em.namd +p4 &>
step12.em.log &

d) Pequena simula&tilde;o de DM para conferir:
/usr/local/bin/charmrn ++local /usr/local/bin/namd2 step13.em.namd +p4 &>
step13.em.log &

[PARTE 4]
#Adicionar &aacute;gua. O VMD n&atilde;o consegue lidar com a lista de angulos da silica,
portanto vamos ajuda-lo mantendo apenas as "bonds"
cp step12.psf step13.psf
pdb2psf -i step13.coor -p step13.psf -o step14.psf -psftype

#abra o VMD e salve um .pdb. Isso &eacute; necess&atilde;rio para assinalar o numero do
segmento em todos os atomos. Caso contrario a solvatacao falha.
vmd -dispdev text -psf step14.psf -pdb step13.coor <step14.tcl

#execute o programa silica_charges (NAO &eacute; o silica_fix_charges !!!!!)
silica_charges (nas simulacoes em "oph.silica" eu esqueci de fazer isso
aqui e fiz no "step15"
#ele usa o arquivo step14.psf e produz o arquivo "saida.psf". Copie o
saida.psf de volta para step14.psf

# NOTA
# Mais a frente este numero de segmento vai nos criar um problema.

[Simulacoes da superficie SEM GRUPO FUNCIONAL]
Para ficar facil o copy&paste dos comandos:
silica_charges (step14.psf)
ln -s saida.psf step15.psf
ln -s step14.pdb step15.pdb
#Continue do va at&eacute; [Simula&tilde;oes FMS] e prossiga a partir de:
pdb2psf -i step15.pdb -p step15.psf -o step16.psf -dihedrals -psftype
# poderia ate pular o passo step17 mas j&atilde;a que mudamos um pouquinho as
cargas melhor faze-lo for the sake of conciseness
[FIM - Simulacoes da superficie SEM GRUPO FUNCIONAL]

[Simula&tilde;oes FMS]
#Preparamos uma s&eacute;rie de grupos funcionais para serem adicionados
rapidamente a SIO. Processamos os arquivos para que o Carbono 1 seja aquele
que se ligar ao Oxigenio livre na superficie da sili&tilde;a.

```

```

$HOME/silica/grupos_funcionais/
# NOTA por enquanto so o 4CCOO.charmm.pdb, 4CCOOH.charmm.pdb e o
4CNH3.charmm.pdb estao prontinhos.
# As cargas na penultima coluna e os nomes atomos certinhos.
Antes de solvatar precisamos adicionar o grupo funcional passar por uma
nova etapa de otimização.
vmd -dispdev text -psf step14.psf -pdb step14.pdb <delete_random_H_v3.tcl
add_function -i h.pdb -p h.psf -o step15.pdb -op step15.psf -fgroup
4CCOO.charmm.pdb

# NOTA
# As vezes os hidrogenios deletados estao em átomos de oxigênio na
superfície porém virados para baixo, em cavidades.
# Nesses casos (raros) use o VMD para mover tanto o grupo funcional quanto
o oxigênio ligado para longe dessa cavidade.
# Depois disso o vai conseguir minimizar e simular a dinamica sem dar erro.
#produce a .psf with angles and dihedrals (ja vai dar para pular o passo
16, as cargas já foram incluídas.
pdb2psf -i step15.pdb -p step15.psf -o step16.psf -dihedrals -psftype
ln -s step16.psf step17.psf
cp step15.pdb step17.pdb
# optimize
/usr/local/bin/charmrn ++local /usr/local/bin/namd2 +tp4 step17.em.namd
&>step17.em.log&

```

[Simulacoes FMS - passo 2]

O VMD (mais especificamente o modulo "psfgen" usado pelo SOLVATE) nao lida direito com os nomes de atomos estranhos que colocamos para a silica, alem disso ele se complica se o "segid" nao esta corretamente escrito no arquivo.

No passo a seguir vamos zerar a configuracao do "numero dos atomos". Eu nao sei usar o VMD para reiniciar a numeracao dos atomos, portanto sem mais demoras, vamos usar o gromacs para nos ajudar aqui e depois o vmd para gerar um novo .psf.

Aqui acontece o seguinte:

- 1) O editconf renomea os atomos e "ResID"
- 2) O VMD designa o "segid" e escreve novos arquivos .psf e .pdb contendo essa informacao.

```

cp step17.coor step18.pdb
editconf -f step18.pdb -o step19.pdb
vmd -dispdev text -e step19.tcl
vmd -dispdev text -e step20.tcl

```

```

../../../../programas/silica_readpsfinfo/readpsfinfo <<EOF
step16.psf
step21.psf
EOF

```

```

cp step21.pdb mergedstructure.pdb
ln -s mergedstructure.psf min.nvt.psf
ln -s mergedstructure.pdb min.nvt.pdb
ln -s mergedstructure.pdb fixed.pdb

```

Edite o tamanho da celula no eixo Z e de uma folga para as aguas.

```

cellBasisVector1      57.306999 -0.100018 0.000000
cellBasisVector2      0.000000 57.306912 0.101530
#cellBasisVector3     0.000000 0.000000 58.172912
cellBasisVector3     0.000000 0.000000 93.537

```

agora e partir para o abraco

```
/usr/local/bin/charmrun ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 min.nvt.namd >min.nvt.log &&
/usr/local/bin/charmrun ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 heat.nvt.namd >heat.nvt.log &&
/usr/local/bin/charmrun ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 md.npt.namd >md.npt.log &&
/usr/local/bin/charmrun ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 md.npt.part0002.namd > md.npt.part0002.log &&
/usr/local/bin/charmrun ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 md.npt.part0003.namd > md.npt.part0003.log &&
exit 0

*****
[Simulacao com a OPH E grupo funcional]
*****
# Preparando o sistema SEM ions. A idéia é abusar do efeito eletrostático
# Mentirinha tá, sobraram oxigênios e a gente arranjou uma desculpa p n ter
que inventar um jeito do annealing não fazer "cagada" ex. SI-ligadoa 5
oxigênios.
# As coisas em .tcl que aparecem aqui são para fazer PARA FAZER NA MAO !!!
# abre os arquivos
mol new step17.psf
mol addfile step17.pdb
mol new system.psf
mol addfile center.pdb
set sel [atomselect top all]
# Orienta a OPH com o sitio virado para cima em Z>0
set M [transaxis x -90]
$sel move $M
set M [transaxis y -90]
$sel move $M
# Agora anote o minmax da OPH. E mova a enzima para que o mínimo fique a
20A da ORIGEM (0.0 0.0 0.0)
measure minmax $sel
{-26.968000411987305 -48.54399871826172 -22.760000228881836}
{27.618000030517578 48.37799835205078 24.302000045776367}
#aqui é s\ge somar o mínimo em Z (-22.76) com + 20.
$sel moveby {0.0 0.0 42.76}

#escreve o arquivo final.
source set_unitcell.tcl
set_unitcell 114.613 114.613 58.173 top 90.00 90.00 90.00
$sel writepdb oph.over.silica.pdb
# fim do .tcl

cp step17.coor step18.pdb
editconf -f step18.pdb -o step19.pdb
vmd -dispdev text -e step19.tcl

# Abra o vmd
vmd -f step20.psf step20.pdb -f system.psf oph.over.silica.pdb

set all [atomselect 0 all]
```

```

set sio [atomselect 0 "resname SIO"]
$olio set segid U0
set fms [atomselect 0 "resname FMS"]
$olio set segid F1
$all writepsf step20.fixed.psf
$all writepdb step20.fixed.pdb

vmd -f step20.fixed.psf step20.fixed.pdb -f system.psf oph.over.silica.pdb
1) use o modulo Merge structures e junte no arquivo "tudo.psf , tudo.pdb"
Ok, o VMD estraga com as coordenadas de tudo que eu adicionei p silica.
ignora o "tudo.pdb" e faz isso:

cat step20.fixed.pdb oph.over.silica.pdb > merged.pdb

2) Abra o merged e junte direito os atomos, removendo END e colocando CRYST
apenas no inicio

3) Solvate
vmd -dispdev text -e step20.FMS.tcl

4) Agora preciso das ligacoes e dos nomes e cargas originais.

##### Abra o "step19.pdb" e copie o numero dos RESIDUOS em cima do
"step17.psf"
##### Salve como "step17.fixed.psf"
readpsfinfo <<EOF
step17.fixed.psf
step21.psf
EOF

# Faltam algumas coisinhas que o VMD estraga.
cat mergedstructure.psf | sed s/"HSD CG CPH "/"HSD CG CPH1"/ | sed
s/"HSD CE1 CPH "/"HSD CE1 CPH2"/ | sed s/"HSD CD2 CPH "/"HSD CD2
CPH1"/ > mergedstructure.fixed.psf

# fixe todo mundo menos o solvente
vmd -dispdev text fixnonwater.tcl

# Otimiza !!!
namd2 +p2 silica.oph.em.namd

# Agora é s\z alegria !
cp step21.pdb mergedstructure.pdb
ln -s mergedstructure.psf min.nvt.psf
ln -s mergedstructure.pdb min.nvt.pdb
#ln -s mergedstructure.pdb fixed.pdb
/usr/local/bin/charmrn ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 min.nvt.namd
>min.nvt.log &&
/usr/local/bin/charmrn ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 heat.nvt.namd >
heat.nvt.log &&
/usr/local/bin/charmrn ++local +p4 /usr/local/bin/namd2 md.npt.namd >
md.npt.log &&
/usr/local/bin/charmrn ++local +p4 /usr/local/bin/namd2
md.npt.part0002.namd > md.npt.part0002.log &&
/usr/local/bin/charmrn ++local +p4 /usr/local/bin/namd2
md.npt.part0003.namd > md.npt.part0003.log &&

# DONE !

```

Parâmetros de simulação para construção de silica amorfa funcionalizada.

Diego E.B. Gomes¹, Roberto D. Lins², Thereza A. Soares², Pedro G. Pascutti¹

(1) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil. (2) Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA – EUA.
Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br – Brasil. Distribuído via requisição por e-mail: diego@biof.ufrj.br

```
#####
# Arquivo step1.tcl
#####

#just in case
source /home/dgomes/vmdscripts/set_unitcell.tcl
#surface
set_unitcell 57.307 57.307 58.173 top 89.90 90.00 90.10
#pore
;set_unitcell 171.920 171.920 58.173 top 89.90 90.00 90.10

#create selections
set all [atomselect top all]
set oxygen [atomselect top "name O or type O or element O"]
set silicon [atomselect top "name SI or name Si or type SI or type Si or element Si"]
set num_oxygen [$oxygen num]
set num_silicon [$silicon num]
#correcting name
$oxygene set type O
$silicon set type SI
#setting charge for the BKS force field
$oxygene set charge -1.2
$silicon set charge 2.4
#correcting mass
$oxygene set mass 15.9994
$silicon set mass 28.0855
#find shell atoms
set gridsz 1 ;# grid spacing
set radius 6 ;# sphere radius
set dist 6 ;# distance from surface
set shellatoms [measure surface $all $gridsz $radius $dist]
set shell [atomselect top [concat "index" $shellatoms]]
set interior [atomselect top [concat "not index" $shellatoms]]
set num_shell [$shell num]
set num_interior [$interior num]
#create the shell and interior selections
puts "Found $num_shell shell atoms"
puts "Found $num_interior interior atoms"
#fixing selection !keep this order !
set fix $interior
set free $shell
$fix set beta 1
$free set beta 0

#create list of the dangling atoms on the surface
set dsi [atomselect top "numbonds < 3 and beta 0 and (name SI or name Si or type SI or type Si or element Si)"]
set dox [atomselect top "numbonds < 2 and beta 0 and (name O or type O or element O)"]

#check electroneutrality
set evenodd [expr $num_oxygen %2]
if { $evenodd == 1 } { set num_oxygen [expr $num_oxygen -1] }
set difference [ expr $num_silicon - ($num_oxygen/2) ] ;# TCL rounds up the difference

#adds set selections to exclude from output file.
if { $difference > 0} {
    puts "Delete $difference Si"
    set list_to_delete [$dsi get index]
    for {set i 0} {$i < $difference} {incr i} {
        set random [expr int(rand()*[$dsi num])] ;# generate random number within number of dangling silicon atoms
        set deletethis [atomselect top "index [lindex $list_to_delete $random]" ] ;# get the index number of the atom to be deleted
        puts "Deleting atom index [$deletethis list]"
        $deletethis set beta 9 ;# we assign "9" to bfactor, so latter we won't write this kind of atom to output file.
    }
    if { $evenodd == 1 } {
        set list_to_delete [$dox get index] ;#list of dox
        set random [expr int(rand()*[$dox num])] ;#random number within number of dangling silicon atoms
        set deletethis [atomselect top "index [lindex $list_to_delete $random]" ] ;# get the index number of the atom to be deleted
        puts "Deleting atom index [$deletethis list] (one extra Oxygen to make it even)"
        $deletethis set beta 9 ;# we assign "9" to bfactor, so latter we won't write this kind of atom to output file.
    }
}
```

```

        }

}

if { $difference < 0} {
    puts "Delete [expr (-1)*($difference)*2] O"
    set difference [expr ((-1)*($difference)*2) ] ; #remove double the of atoms just for oxygen
    set list_to_delete [$dox get index] ; #list of dox
    for {set i 0} {$i < $difference} {incr i} {
        set random [expr int(rand()*[$dox num])] ; #random number within number of dangling silicon atoms
        set deletethis [atomselect top "index [lindex $list_to_delete $random]" ] ; # get the index number of the atom to be deleted
        puts "Deleting atom index [$deletethis list]"
        $deletethis set beta 9 ;# we assign "9" to bfactor, so latter we won't write this kind of atom to output file.
    }
}

if { $sevenodd == 1 } {
    set list_to_delete [$dox get index] ; #list of dox
    set random [expr int(rand()*[$dox num])] ; #random number within number of dangling silicon atoms
    set deletethis [atomselect top "index [lindex $list_to_delete $random]" ] ; # get the index number of the atom to be deleted
    puts "Deleting atom index [$deletethis list] (one extra Oxygen to make it even)"
    $deletethis set beta 9 ;# we assign "9" to bfactor, so latter we won't write this kind of atom to output file.
}

if { $difference == 0} {
    puts "Great cut ! Your molecule is neutral"
}

# create output selection, excluding atoms labeled with beta 9
set output [atomselect top "not beta 9"]

#writing output
$output writepsf step1.psf
$output writepdb step1.pdb
$output writepdb step1_fixed.pdb
#####
# Fim do step1.tcl #####
#####

#####
# Arquivo sio.buckingham.inp, para simulação com NAMD-Lite
#####
set echo=false end
!           eps   sigma   eps(1:4) sigma(1:4)
!           (kcal/mol) (A)
!
! I got this values from Table 2
! Cruz-Chu et al
! Water-Silica Force Field for Simulating Nanodevices
! J.Phys. Chem. B, Vol 110, No. 43, 2006
NONBonded O    0.15  4.295  0.15  4.295
NONBonded SI   0.30  3.5    0.30  3.5
set echo=true end

#####

# Arquivo sio.h.inp, para simulação com NAMD
#####
! from supplementary material of:
! Lorenz, C. D.; Crozier, P. S.; Anderson, J. A. & Travesset, A.
! Molecular Dynamics of Ionic Transport and Electrokinetic Effects in Realistic Silica Channels
! The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112, 10222-10232
! and inorganic builder:
!silicon section (experimental alek@ks.uiuc.edu)

! ATOMS
! Bulk silicon  SI
! Bulk oxygen   Ob
! Silanol silicon SI
! Silanol oxygen Os
! Silanol Hydrogen Hs
! Water oxygen   Ow
! Water hydrogen Hw

BONDS
SI Ob  885.10 1.61
SI Os  428.00 1.42

```

Os Hs 545.00 0.96
SI O 885.10 1.61

ANGLES

SI	Ob	SI	4.66	174.22
Ob	SI	Ob	159.57	110.93
Ob	SI	Os	153.26	111.09
Os	SI	Os	89.62	116.26
SI	Os	Hs	57.50	106.00
SI	O	SI	4.66	174.22
O	SI	O	159.57	110.93
Ob	SI	SI	0.0	0.0
SI	SI	SI	0.0	0.0

DIHEDRALS

!H	O	SI	O	1.3300	1	180.00	! ALLOW ALC
!H	O	SI	O	0.1800	2	180.00	! ALLOW ALC
!H	O	SI	O	0.3200	3	180.00	! ALLOW ALC
Hs	Os	SI	Ob	1.3300	1	180.00	! ALLOW ALC
Hs	Os	SI	Ob	0.1800	2	180.00	! ALLOW ALC
Hs	Os	SI	Ob	0.3200	3	180.00	! ALLOW ALC
!SI	O	SI	O	0.0000	1	180.00	! ALLOW ALC
!SI	Ob	SI	Ob	0.0000	1	180.00	! ALLOW ALC
!Ob	SI	Os	Hs	0.0000	1	180.00	! ALLOW ALC
!SI	Ob	SI	Os	0.0000	1	180.00	! ALLOW ALC
!Os	SI	Os	Hs	0.0000	1	180.00	! ALLOW ALC

NONBONDED

!atom	ignored	epsilon	Rmin/2	ignored	eps,1-4	Rmin/2,1-4
SI	0.0	-0.3000	2.1475	0.0	-0.3000	2.1475
Ob	0.0	-0.1500	1.7500	0.0	-0.1500	1.7500
Os	0.0	-0.1500	1.7700	0.0	-0.1500	1.7700
Hs	0.0	-0.0460	0.2245	0.0	-0.0430	0.2245
O	0.0	-0.1500	1.7500	0.0	-0.1500	1.7500

HBOND CUTHB 0.5 ! If you want to do hbond analysis (only), then use
! READ PARAM APPEND CARD
! to append hbond parameters from the file: par_hbond.inp

END

```
#####
# Arquivo quick.opt.namdlite
#####
# protocol params
numsteps      100
cgmin on
# initial config
coordinates   step1.pdb
bincoordinates step2.coor
temperature   300
seed          12345

# output params
outputname    step3
binaryoutput  yes
dcdfilename  step3.dcd
dcdfreq       1

# integrator params
timestep      1.0

# force field params
structure      step1.psf
parameters     sio.buckingham.inp
exclude        scaled1-4
1-4scaling    1.0
switching     on
switchdist    8.0
cutoff         12.0

buckingham = on # replaces van der Waals interaction potential with Buckingham
buckparam = bks # uses BKS parameterizations, other possible values are ttam and fb
bucksafe = on   # sets up a safety switch eliminating the artificial well in the potential
```

```

# mobile atom selection:
# z > 5 or z < -5
fixedAtoms      on
fixedAtomsFile   step1_fixed.pdb
fixedAtomsCol    B

cellBasisVector1 57.306999 -0.100018 0.000000
cellBasisVector1 0.000000 57.306912 0.101530
cellBasisVector1 0.000000 0.000000 58.172912
cellOrigin       0.0     0.0     0.0

#####
# Arquivo opt.namdlite
#####
# protocol params
numsteps        1000
cgmin on
# initial config
coordinates     step1.pdb
temperature     300
seed            12345

# output params
outputname      step1
binaryoutput    yes
dcdfile         step1.dcd
dcdfreq         1

# integrator params
timestep        1.0

# force field params
structure        step1.psf
parameters       sio.buckingham.inp
exclude          scaled1-4
1-4scaling      1.0
switching        on
switchdist       8.0
cutoff           12.0

buckingham = on # replaces van der Waals interaction potential with Buckingham
buckparam = bks # uses BKS parameterizations, other possible values are ttam and fb
bucksafe = on    # sets up a safety switch eliminating the artificial well in the potential

# mobile atom selection:
# z > 5 or z < -5
fixedAtoms      on
fixedAtomsFile   step1_fixed.pdb
fixedAtomsCol    B

cellBasisVector1 57.306999 -0.100018 0.000000
cellBasisVector1 0.000000 57.306912 0.101530
cellBasisVector1 0.000000 0.000000 58.172912
cellOrigin       0.0     0.0     0.0

#####
# Arquivo md.namdlite
#####
# protocol params
numsteps        30000
#cgmin on
# initial config
coordinates     step1.pdb
bincoordinates   step1.coor
temperature     300
seed            12345

# output params
outputname      step2
binaryoutput    yes
dcdfile         step2.dcd
dcdfreq         10

```

```

# integrator params
timestep      1.0

# force field params
structure      step1.psf
parameters     sio.buckingham.inp
exclude        scaled1-4
1-4scaling    1.0
switching     on
switchdist    8.0
cutoff        12.0

buckingham = on # replaces van der Waals interaction potential with Buckingham
buckparam = bks # uses BKS parameterizations, other possible values are ttam and fb
bucksafe = on   # sets up a safety switch eliminating the artificial well in the potential

# mobile atom selection:
# z > 5 or z < -5
fixedAtoms      on
fixedAtomsFile  step1_fixed.pdb
fixedAtomsCol   B

cellBasisVector1 57.306999 -0.100018 0.000000
cellBasisVector1 0.000000 57.306912 0.101530
cellBasisVector1 0.000000 0.000000 58.172912
cellOrigin       0.0      0.0      0.0

#####
# Arquivo min.ptn.fixed.namd
#####

# input
coordinates      ionized.pdb
structure        ionized.psf
parameters       par_all27_prot_lipid_na.inp
parameters       par.LCX.inp
paratypecharmm  on

# output
set output      ionized
outputname      $output
dcdfile        ${output}.dcd
xstfile        ${output}.xst
dcdfreq        500
xstFreq        500

binaryoutput   no
binaryrestart  yes
outputEnergies 1000
restartfreq   1000

# mobile atom selection:
# not water and not name CLA
fixedAtoms      on
fixedAtomsFile  ionized_fixed.pdb
fixedAtomsCol   O

# Basic dynamics
exclude        scaled1-4
1-4scaling    1
COMmotion     no
dielectric    1.0

# Simulation space partitioning
switching     on
switchdist    9
cutoff        10
pairlistdist  12

# Multiple timestepping
firsttimestep 0
timestep       1
stepspercycle  20

```

```

nonbondedFreq      2
fullElectFrequency 4

# pme parameters
# ldbUnloadPME     yes
#PME               on
#PMETolerance      10e-6
#PMEInterpOrder    4
#PMEGridspacing   1
#PMEPencils        12

PME                 yes
PMEGridSizeX       128
PMEGridSizeY       128
PMEGridSizeZ       128
dedUnitCell        yes

# Temperature control

set temperature     298
temperature         $temperature; # initial temperature

# Pressure coupling !dgomes
useGroupPressure    yes
useFlexibleCell     yes
#useConstantRatio   yes
#useConstantArea    yes # XY is constant

# Berendsen Pressure Coupling
#BerendsenPressure  on
#BerendsenPressureTarget 1.01325
#BerendsenPressureCompressibility 4.57E-5
#BerendsenPressureRelaxationTime 10.0
#BerendsenPressureFreq     2

#Langevin Temperature
langevin            on
langevinDamping     10
langevinTemp        298.15
langevinHydrogen   no

#Langevin Pressure stuff
langevinPiston      on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 200
langevinPistonDecay 10
langevinPistonTemp   298.15

#reading from .xst file
cellBasisVector1   128.000000 0.000000 0.000000
cellBasisVector2   0.000000 128.000000 0.000000
cellBasisVector3   0.000000 0.000000 128.000000
cellOrigin         0.0      0.0      0.0

# wrap stuff
wrapAll           on
wrapNearest        on

# shake
rigidbonds        all      # SHAKE
rigidtolerance    0.00001 # SHAKE
rigiditerations   400      # SHAKE

# dgomes
margin 5

# Scripting
# run one step to go into scripting mode
minimize 0

# turn off until later
langevinPiston off
minimize      10000

```

```

#####
# Arquivo heat.npt.namd
#####
# input
coordinates      ionized.pdb
structure        ionized.psf
parameters       par_all27_prot_lipid_na.inp
parameters       par.LCX.inp
paratypecharmm   on

bincoordinates   heat.backbone.fixed.restart.coor
binvelocities    heat.backbone.fixed.restart.vel
extendedsystem   heat.backbone.fixed.restart.xsc

# output
set output       heat.backbone.fixed.npt
outputname       $output
dcdfile         ${output}.dcdf
xstfile         ${output}.xst
dcdfreq         500
xstFreq         500

binaryoutput    no
binaryrestart   yes
outputEnergies  1000
restartfreq    1000

# mobile atom selection:
# not water and not name CLA
fixedAtoms      yes
fixedAtomsFile  backbone_fixed.pdb
fixedAtomsCol   O

# Basic dynamics
exclude         scaled1-4
1-4scaling     1
COMmotion      no
dielectric     1.0

# Simulation space partitioning
switching      on
switchdist     9
cutoff         10
pairlistdist   12

# Multiple timestepping
firsttimestep  0
timestep        1
stepspercycle   20
nonbondedFreq   2
fullElectFrequency 4

# pme parameters
# ldbUnloadPME  yes
#PME           on
#PMETolerance  10e-6
#PMEInterpOrder 4
#PMEGridspacing 1
#PMEPencils    12

PME            yes
PMEGridSizeX  128
PMEGridSizeY  128
PMEGridSizeZ  128
dcdUnitCell   yes

# Temperature control

#set temperature 298
#temperature     $temperature; # initial temperature

# Pressure coupling !dgomes
useGroupPressure  yes
#useFlexibleCell   yes
#useConstantRatio  yes
#useConstantArea   yes # XY is constant

```

```

# Berendsen Pressure Coupling
#BerendsenPressure          on
#BerendsenPressureTarget    1.01325
#BerendsenPressureCompressibility 4.57E-5
#BerendsenPressureRelaxationTime 10.0
#BerendsenPressureFreq      2

#Langevin Temperature
langevin      on
langevinDamping 10
langevinTemp   298.15
langevinHydrogen no

#Langevin Pressure stuff
langevinPiston on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 200
langevinPistonDecay 10
langevinPistonTemp 298.15

#reading from .xst file
#cellBasisVector1 128.000000 0.000000 0.000000
#cellBasisVector2 0.000000 128.000000 0.000000
#cellBasisVector3 0.000000 0.000000 128.000000
#cellOrigin     0.0    0.0    0.0

# wrap stuff
wrapAll      on
wrapNearest   on

# shake
rigidbonds   all      # SHAKE
rigidtolerance 0.00001 # SHAKE
rigiditerations 400     # SHAKE

# dgames
margin 5

# Scripting
# run one step to go into scripting mode
minimize 0

# turn off until later
langevinPiston on
run      10000

#####
# Arquivo md.namd
#####
# input
coordinates   ionized.pdb
structure      ionized.psf
parameters    par_all27_prot_lipid_na.inp
parameters    par.LCX.inp
paratypecharmm on

bincoordinates heat.backbone.fixed.npt.restart.coor
binvelocities  heat.backbone.fixed.npt.restart.vel
extendedsystem heat.backbone.fixed.npt.restart.xsc

# output
set output     md.part0001
outputname    $output
dcdfile       ${output}.dcf
xstFile       ${output}.xst
dcdfreq       5000
xstFreq       5000

binaryoutput  no
binaryrestart yes
outputEnergies 1000
restartfreq   5000

# mobile atom selection:

```

```

# not water and not name CLA
fixedAtoms      no
fixedAtomsFile  backbone_fixed.pdb
fixedAtomsCol   O

# Basic dynamics
exclude          scaled1-4
1-4scaling       1
COMmotion        no
dielectric       1.0

# Simulation space partitioning
switching        on
switchdist       9
cutoff           10
pairlistdist    12

# Multiple timestepping
firsttimestep   0
timestep         1
stepspercycle    20
nonbondedFreq    2
fullElectFrequency 4

# pme parameters
# ldbUnloadPME   yes
#PME             on
#PMETolerance   10e-6
#PMEInterpOrder 4
#PMEGridspacing 1
#PMEPencils     12

PME              yes
PMEGridSizeX    128
PMEGridSizeY    128
PMEGridSizeZ    128
dcUnitCell       yes

# Temperature control
#set temperature 298
#temperature     $temperature; # initial temperature

# Pressure coupling !dgomes
useGroupPressure yes
#useFlexibleCell  yes
#useConstantRatio yes
#useConstantArea  yes # XY is constant

# Berendsen Pressure Coupling
#BerendsenPressure on
#BerendsenPressureTarget 1.01325
#BerendsenPressureCompressibility 4.57E-5
#BerendsenPressureRelaxationTime 10.0
#BerendsenPressureFreq   2

#Langevin Temperature
langevin          on
langevinDamping   10
langevinTemp      298.15
langevinHydrogen  no

#Langevin Pressure stuff
langevinPiston    on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 200
langevinPistonDecay 10
langevinPistonTemp 298.15

#reading from .xst file
#cellBasisVector1 128.000000 0.000000 0.000000
#cellBasisVector2  0.000000 128.000000 0.000000
#cellBasisVector3  0.000000 0.000000 128.000000
#cellOrigin        0.0      0.0      0.0

# wrap stuff

```

```
wrapAll      on
wrapNearest   on

# shake
rigidbonds    all      # SHAKE
rigidtolerance 0.00001  # SHAKE
rigiditerations 400     # SHAKE

# dgomes
#margin 5 #nao usar margin na simulacao, so na minimizacao

# Scripting
# run one step to go into scripting mode
minimize 0

# turn off until later
langevinPiston on
run        10000000
```