

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Guedmiller Souza de Oliveira**

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO MOLECULAR PROTEÍNA-HERBICIDA  
ATRAVÉS DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL: APLICAÇÃO NO  
DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES**

**São Carlos – SP  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Guedmiller Souza de Oliveira\***

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO MOLECULAR PROTEÍNA-HERBICIDA  
ATRAVÉS DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL: APLICAÇÃO NO  
DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM QUÍMICA, área de  
concentração FÍSICO-QUÍMICA.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite**

**\*Bolsista CAPES**

**São Carlos – SP  
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48ai

Oliveira, Guedmiller Souza de.

Análise da interação molecular proteína-herbicida através de simulação computacional : aplicação no desenvolvimento de nanobiossensores / Guedmiller Souza de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

110 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Físico-química. 2. Dinâmica molecular. 3. Imobilização. 4. Adsorção. 5. Biossensores (Biossensores). 6. Proteínas. I. Título.

CDD: 541 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Doutorado

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato Guedmiller Souza de Oliveira, realizada em 29 de abril de 2013:*

*Luiz Carlos Gomide*

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas

*Kaline Rabelo Coutinho*

---

Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho

*Ignéz Caracelli*

---

Profa. Dra. Ignéz Caracelli

*Jorge Chahine*

---

Prof. Dr. Jorge Chahine

*Carmen Lucia Cardoso*

---

Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso

*Dedico esta pesquisa e todos os conhecimentos adquiridos nela a Deus primeiramente, meus pais Josias e Maria, meu irmão Wilker e minha avó Abadia, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos.*

***"The character of a man is determined by the people who he chooses to live"***

**(Sigmund Freud)**

## **Agradecimentos**

À Deus, que sempre renovou em mim a capacidade de nunca desistir e ter fé;

À minha família, pelo apoio incondicional, sem eles eu não seria nada;

Ao Prof. Gomide, pela orientação e dedicação durante estes 4 anos de aprendizado;

Ao Prof. Fábio Leite pela amizade, dedicação e paciência;

Ao Prof. Dr. Eduardo F. Franca (Duzão) e esposa Luciana, pela amizade e troca de experiência acadêmica;

Aos meus amigos de Laboratório, Prof. Gomide, Eduardo Lopes (Du), Asdrubal, Ingrid, Diêgo, Ranilson (Marcelo), Kalil, Prof. Dr. José Divino, Leide, Prof. Dr. André Farias de Moura e ao Adriano Amarante (da UFSCar de Sorocaba);

Aos meus amigos de Uberlândia e São Carlos, Prof. Antonio Eduardo, Letícia, Panmella, Hugo (Hugão), Sara, Daniella, Glenda, Virgínia (Vi), Marcelo (Tiaum), Fabyana (Faby), Ricardo, Jean, Lucíola e Pedro (Pedim);

Aos meus para sempre amigos, durante o tempo no exterior, Prof. Dr. James M. Briggs, Iris Nira Smith e Jeff Smith, John Craft, Jeff Mindrebo, Ashwini, Khushboo, Kya e Koda;

À uma pessoa que está fazendo parte da minha vida a pouco tempo, porém, vem me fazendo muito feliz e tem me apoiado incondicionalmente, Joice Jaqueline Kaschuk;

À CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

## Lista de Abreviações

ACCcase	Acetil-CoA carboxilase
ACC	Acetyl- CoA carboxylase
AES	Agente espaçante de superfície
AFM	Atomic Force Microscope
AFS	Atomic Force Spectroscope
Arg	Arginina
BC	Biotina carboxilase
BL	Biotina de ligação
CT	Carboxiltransferase
LJ	Lennard-Jones
Lys	Lisina
MD	Molecular Dynamics
NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics
PDB	Protein Data Bank
PME	Particle Mesh Ewald
PTCB	Proteína transportadora da carboxil biotina
RC	Raio de Corte
RMSD	Root Mean Square Deviation
SMD	Steered Molecular Dynamics
UB	Urey-Bradley
VDW	van der Waals
VMD	Visual Molecular Dynamics

## Lista de Símbolos

$a_i$	Aceleração da partícula $i$
$\text{Å}$	Angstrom
$\Psi$	ângulo diedro impróprio Psi
$\Phi$	ângulo diedro impróprio Phi
ns	nanosegundos
$n$	Número de átomos
$K_0$	Constante de força angular
$F_i$	Força atuando na partícula $i$
$K_b$	Constante de força de ligação
$\Delta G$	variação da energia livre de Gibbs
$m_i$	massa da partícula $i$
$r_i(t)$	Vetor de coordenadas cartesianas do átomo $C_\alpha$ do resíduo $i$ no tempo $t$ .



## Lista de Tabelas

TABELA 1.1 - Componentes principais que dão origem aos nanossensores. <sup>16</sup> ...	8
TABELA 1.2 - Alguns dos principais herbicidas comerciais passíveis de inibir a atividade enzimática da ACCase.....	20
TABELA 4.1 - Número de partículas (N) de cada componente do sistema.....	48
TABELA 4.2 - Distância de ligação $r_{\mu}^0$ Å, e constante de força $k_{\mu}^s$ para o modelo AES mostrado na figura 4.2. ....	53
Tabela 4.3 - Ângulos de ligação $\theta_{\mu}^0$ e constante de força $k_{\mu}^b$ para o modelo AES mostrado na figura 4.2.....	53
TABELA 4.4 - Ângulos diedros $\phi_{\mu}^0$ e constante de força $k_{\mu}^t$ para o modelo AES mostrado na figura 4.2.....	54
TABELA 4.5 - Energias de interação entre ACCase+diclofop e ACCase+AES+diclofop. ....	66
TABELA 4.6 - Resumo dos sistemas moleculares simulados com dinâmica molecular para os herbicidas fluazifop e butoxydim. ....	71

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Desenho de uma ponta de AFM funcionalizada com enzimas para detecção de inibidores. ....	4
FIGURA 1.2 - Esquema dos principais componentes de microscópio de força atômica. ....	9
FIGURA 1.3 - Modos de operação do microscópio de força atômica. <sup>21</sup> .....	10
FIGURA 1.4 - A reação da formação da superfície AES representada da seguinte maneira: (a) APTES ligado à superfície oxidada do AFM. (b) a estrutura molecular final do AES utilizada na simulação.....	13
FIGURA 1.5 - Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima accase. <sup>45</sup> .....	16
FIGURA 1.6 - Enzima ACCase em sua forma dimérica com a localização dos sítios ativos.....	18
FIGURA 1.7 - Mapa do potencial eletrostático da enzima Acetil Co-A Carboxilase (ACCCase). Os potenciais correspondem à faixa de $-5K_B T/e$ a $+5 K_B T/e$ . ....	23
FIGURA 3.1 - Típica representação de docking molecular onde um ligante é complexado em uma região de uma proteína, formando o complexo proteína-ligante. ....	29
FIGURA 3.2 - Algoritmo clássico de simulação por dinâmica molecular.....	35
FIGURA 3.3 - Esquema bidimensional de um sistema com suas réplicas periódicas.....	41
FIGURA 4.1 - Modelo proposto da superfície da pontade AFM modificada pelo agente espaçador AES distribuído ao longo da superfície de $Si_3N_4$ (ponta do AFM). A representação foi obtida com o programa VMD.....	50
FIGURA 4.2 - Átomos numerados do modelo AES na qual a densidade eletrônica é mostrada através do potencial eletrostático. Os átomos são coloridos	

como segue: oxigênio em vermelho, silício em amarelo, carbono em azul, nitrogênio em azul escuro e hidrogênio em cor branca. ....	53
FIGURA 4.3 - Representação esquemática da ligação da enzima ACCase na superfície AES com diferentes orientações. Enzima ACCase é representada no modelo dos desenhos usando o programa VMD. Os sítios ativos situam-se entre as cadeias de vermelho e verde, e são indicadas pelas setas azuis. ....	58
FIGURA 4.4 - Energia eletrostática, energia de van der Waals e energias totais envolvidas durante os 50 ns de simulação entre enzima e a superfície. Depois de 15ns as energias do sistema estabilizaram na seguinte média: eletrostática = -306,46 kcal.mol <sup>-1</sup> ; van der Waals = -417,68 kcal.mol <sup>-1</sup> e energia total = -1724,15 kcal.mol <sup>-1</sup> . ....	59
FIGURA 4.5 - Monitoramento das ligações de hidrogênio nos últimos 30 ns de simulação. As médias encontradas foram de 18 ligações para ligações totais, sendo que as maiores contribuições foram da superfície interagindo com os aminoácidos arginina e lisina, ~6.5 e ~7 ligações de hidrogênio, respectivamente. ....	60
FIGURA 4.6 - Regiões 1 e 2 de direta interação da enzima ACCase com a superfície AES utilizando o programa VMD. Em laranja são os aminoácidos interagindo com a superfície modificada com AES (em amarelo). ....	61
FIGURA 4.7 - A mobilidade estrutural da enzima ACCase após 50 ns de simulação MD. Moléculas de água não foram apresentadas na representação. .	61
FIGURA 4.8 - Ângulos diedros $\psi$ e $\Phi$ monitorados das regiões 1 e 2 em contato com a superfície modelada. ....	62
FIGURA 4.9 - Ângulos diedros selecionados da região 2, $\phi$ (em vermelho) e $\Psi$ (em preto). A, C e E representa 10 ns da trajetória, após o equilíbrio, e B, D e F nos últimos 10ns da trajetória. ....	63
FIGURA 4.10 - Diagrama Ramachandran da enzima ACCase após 30 ns de dinâmica molecular. Em vermelho os diedros da região 1 e em magenta da região 2. Os outros diedros dos outros aminoácidos estão em amarelo. ....	64

FIGURA 4.11 - <i>Docking</i> molecular do herbicida diclofop ( <i>retro-docking</i> ) e <i>docking</i> molecular da célula APTES+Diclofop.....	65
FIGURA 4.12 - Estrutura molecular dos dois herbicidas comerciais para os cálculos de <i>docking</i> molecular. fluazifop (a) e (b) butroxydim.....	68
FIGURA 4.13 - Regiões utilizadas para os cálculos de <i>docking</i> . Seis <i>grids</i> foram feitos na enzima para avaliação da energia de interação. ....	69
FIGURA 4.14 - Energia de interação (em kJ/mol) das posições originadas dos clusteres formados utilizando cálculos de <i>docking</i> nos 6 pré-definidos <i>grids</i> das moléculas dos herbicidas fluazifop e butroxydim.....	72
FIGURA 4.15 - Curvas de força de AFS gravado em solução tampão PBS a pH 7,0 para os herbicidas específicos (diclofop) e não específicos (glifosato e imazaquim) do nanobiosensor proposto. ....	75
FIGURA 4.16 - Histograma contendo a frequência relativa de ocorrência das medidas para os substratos funcionalizados com os herbicidas diclofop, glifosato e imazaquin. Para cada substrato, foi realizado um total de 19 medidas.....	76
FIGURA 4.17 - Simulação da força de desligamento do herbicida diclofop do sítio ativo da enzima ACCase utilizando dinâmica molecular direcionada.....	77

## Resumo

ANÁLISE DA INTERAÇÃO MOLECULAR PROTEÍNA-HERBICIDA ATRAVÉS DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL: APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOSENSORES. Neste estudo, o objetivo foi quantificar e analisar as forças de interação entre a ponta do microscópio de força atômica (AFM) modificada quimicamente com moléculas ligantes e uma importante enzima responsável pela síntese de ácidos graxos em todos os seres vivos, a Acetil CoA carboxilase - ACCase. Nosso objetivo é desenvolver biossensores específicos para a detecção de pesticidas usados na agricultura. A fim de simular computacionalmente esta superfície modificada, utilizando a metodologia de dinâmica molecular (MD), os parâmetros campo de força foram desenvolvidos e implementados no modelo computacional aqui proposto. Estes parâmetros foram obtidos utilizando cálculos de mecânica quântica e implementados no campo de força do programa de MD utilizado. Três tipos de orientações moleculares da ACCase foram avaliadas como ponto de partida para os cálculos de MD, porém, apenas uma posição foi utilizada para a simulação. Os critérios para definir a orientação espacial da enzima na superfície tiveram como base a localização dos sítios ativos da enzima e a área de contato da enzima com a superfície funcionalizada. Este último parâmetro foi levado em conta com a intenção de assegurar uma força de interação forte o suficiente para manter a enzima imobilizada na ponta sem que haja o despreendimento da mesma devido a fracas interações. Superfície de contacto, ligações de hidrogênio e estabilidade estrutural da proteína foram os parâmetros avaliados e monitorados. As regiões da enzima expostas para interação com as moléculas do *bulk* foram avaliadas utilizando uma combinação de docking molecular e dinâmica molecular. Os *clusters* formados dos cálculos de *docking* em diferentes regiões da enzima ACCase foram submetidos a simulação por MD para o cálculo das energias envolvidas no sistema.

**Palavras-Chave:** Nanobiossensor. Imobilização Enzimática. Simulação Computacional. Dinâmica Molecular. Adsorção. Modelo Computacional.

## Abstract

ANALYSIS OF THE PROTEIN-HERBICIDE INTERACTIONS THROUGH COMPUTATIONAL SIMULATION: APPLICATION ON THE DEVELOPMENT OF NANOBIOSENSORS. In this study, our goal was evaluate the interactive forces between the Atomic force microscope tip (AFM tip) and an important enzyme responsible to fatty acids synthesis in all living beings (Acetyl CoA Carboxylase - ACC). We want to develop specific biosensors to detect pesticides molecules used in agriculture. The AFM tip can be functionalized through its oxidation with spacer molecules. In order to simulate computationally this modified AFM tip that was called surface spacer-agent (SSA) using molecular dynamic (MD) simulations, the force field (FF) parameters had to be calculated. The FF parameters were obtained using quantum mechanical calculations and were implemented in an appropriate FF protocol. Three types of geometric molecular orientations of the ACCase were evaluated as a starting point to enzymatic immobilization, but only one was used to MD simulation. The criteria to define xyz orientation were basically based on the active sites from the ACCase enzyme are available to interact with molecules from the bulk and the surface contact area of the enzyme interacting with SSA ensure an strong interaction force to maintain the enzyme immobilized on the tip. Surface contact area, hydrogen bonds and protein stability were the parameters monitored during the MD trajectory as the enzyme-herbicide interactions using a combination of molecular docking and molecular dynamics. The clusters formed using docking calculations in different regions along the ACCase enzyme were submitted to MD simulations in order to measure interactive energies of the system.

**Keywords:** Nanobiosensor. Enzymatic Immobilization. Computational Simulation. Molecular Dynamic. Adsorption. Computational Model.

## Sumário

<b>1 - Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Contexto Geral.....	1
1.2 – Vantagens e Limitações no Uso Microscópio de Força Atômica <sup>1,13</sup> .....	4
1.3 - Biossensores.....	6
1.3.1 - Classificação dos Biossensores .....	7
1.3.2 - Nanobiossensores de Ponta de AFM.....	8
1.4 - Funcionalização de Pontas de AFM.....	12
1.5 – Modelando as Interações entre Biomoléculas e Superfície .....	14
1.6 – Acetil CoA Carboxilase (ACCCase) .....	14
1.7 - Inibidores da ACCCase.....	19
1.8 - Aspectos Termodinâmicos da Imobilização de Biomoléculas em Superfícies.....	21
1.8.1 - Cinética de Adsorção.....	22
1.8.2 - Interação Eletrostática .....	23
1.8.3 - Hidrofobicidade da Proteína.....	24
1.8.4 - Estabilidade da Proteína .....	25
1.8.5 - Influência da Temperatura.....	25
1.8.6 - Efeitos do pH.....	26
1.8.7 - Influência da Pressão .....	26
<b>2 – Objetivos .....</b>	<b>28</b>
2.1 - Objetivos Gerais .....	28
2.1.1 - Objetivos Específicos: .....	28

<b>3–Bases Teóricas para a Simulação Molecular .....</b>	<b>29</b>
3.1 – <i>Docking</i> Molecular.....	29
3.1.1 - Parâmetros do Programa Autodock.....	30
3.2 - Dinâmica Molecular (MD) <sup>62</sup> .....	32
3.2.1 - Os Algoritmos de Verlet e <i>Leap-frog</i> .....	33
3.3 - O Campo de Força.....	36
3.3.1 – Os Campos de Força CHARMM e OPLS-AA.....	36
3.4 - O Programa NAMD.....	38
3.5 - O <i>Ensemble</i> NpT.....	39
3.6 - O <i>Ensemble</i> NVT.....	39
3.7–Condições Periódicas de Contorno .....	40
3.8–Acoplamento de Temperatura.....	41
3.8.1 – Termostato de Langevin para Dinâmica Molecular .....	42
3.9–Acoplamento de Pressão .....	42
3.10 – Interações de Longo Alcance (Eletrostático).....	43
3.10.1 – Campo de Reação Eletrostático .....	43
3.10.2 –Soma de Ewald .....	44
3.11 - Dinâmica Molecular Direcional ( <i>Steered Molecular Dynamics</i> - SMD) .....	45
3.12 - Análise da Trajetória.....	46
3.12.1 - Critério para Ligação de Hidrogênio.....	46
3.12.2 - Cálculos de Energia Eletrostática e de van der Waals .....	46
3.12.3 – Cálculos de Área de Superfície de Contato .....	46
3.12.4 – RMSD ( <i>Root Mean Square Deviation</i> ).....	47



<b>4 – Resultados .....</b>	<b>48</b>
4.1 – Etapa 1: Criação do Modelo da Superfície Funcionalizada do AFM para Simulação com Dinâmica Molecular .....	48
4.1.1 - Obtenção dos Parâmetros de Campo de Força para Simulação do Sistema .....	50
4.1.2 - Validação do Modelo Proposto .....	55
4.1.3 – Escolha da Orientação Inicial da Enzima no Modelo Proposto .....	56
4.2 – Etapa 2: Cálculos Teóricos de Interação da Enzima com Herbicidas ....	65
4.2.1 - <i>Docking</i> Molecular e Dinâmica Molecular .....	65
4.2.2 – Cálculos de <i>Docking</i> .....	68
4.2.3 – Dinâmica Molecular do Sistema Enzima-Inibidor .....	70
4.3 – Etapa 3: Análise Experimental do Nanobiosensor para Detecção de Agroquímicos .....	73
4.4 - Etapa 4: Dinâmica Molecular Direcionada .....	76
<b>5 – Conclusões.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>93</b>

# 1 - Introdução

## 1.1 - Contexto Geral

A Associação Brasileira de Saúde Coletiva - Abrasco publicou um dossiê que reúne os resultados de diversas pesquisas feitas em diversas regiões do Brasil avaliando os efeitos dos agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde das pessoas. O dossiê aponta que 14 agrotóxicos vendidos no Brasil já estão proibidos em outros países porque são suspeitos de causar danos neurológicos, mutação de gens e câncer. Com o objetivo de monitorar a ação destes pesticidas, proteínas são estudadas no desenvolvimento de biossensores para detecção de herbicidas. Este é um dos caminhos para a regulamentação do uso dos agrotóxicos comerciais.

Desde a invenção do microscópio de sonda por varredura<sup>1</sup>, uma variedade de novas áreas de pesquisa tem sido aberta. Enquanto o microscópio de varredura por tunelamento pode mapear detalhes atômicos devido a transferência de elétron por tunelamento entre a sonda condutora e a superfície do material condutivo, o microscópio de força atômica (AFM do inglês *atomic force microscopy*) pode extrair imagens da superfície de espécies isolantes bem como de condutores. Além disso, uma das vantagens do AFM é a capacidade deste instrumento operar em ambientes líquidos.<sup>2</sup> Com todas estas características, o AFM tem estimulado o estudo de objetos em escala nanométrica<sup>3</sup> possibilitando imagens detalhadas de diversos materiais tais como, metais, cerâmicas, polímeros, e estruturas biológicas. Basicamente o princípio fundamental do AFM da relêvo da superfície e suas forças de interação. Este princípio fundamental do AFM tem abilitado estudos de interações intermoleculares. Ao mesmo tempo, as técnicas de modificação química de superfície baseadas em monocamadas auto-

organizadas tem sido desenvolvidas e são particularmente importantes para a funcionalização de pontas de AFM, que são constituídas de nitreto de silício, silício, ou recobertas por ouro. Desse modo, as forças de interação molecular entre um pequeno número de moléculas tem sido medidas diretamente por meio da espectroscopia de força molecular usando o AFM.<sup>4-8</sup>

O reconhecimento molecular com o AFM tem sido facilitado pela modificação química dos cantilevers do AFM juntamente com o desenvolvimento da química de modificação de superfície. Diversos ligantes têm sido imobilizados na ponta da sonda do AFM, dentre estes, podemos destacar, os anticorpos que foram preferidos devido a estas moléculas exibirem uma complementariedade, os chamados de antígenos. As interações entre anticorpos e antígenos têm sido exploradas nas áreas da bioquímica.<sup>6,9</sup> Estudos explorando a imobilização de enzimas na ponta do AFM<sup>10,11</sup> indicam que os herbicidas utilizados em agricultura podem ser monitorados utilizando pontas de AFM modificadas. Logo, esta técnica pode ser utilizada para o controle biológico da ação enzima-herbicida com reflexos no controle de qualidade dos alimentos.

Muitas das funções de uma proteína dependem de sua estrutura, estabilidade, propriedades físicas e dinâmicas, tais como a flutuação conformacional em meio aquoso.<sup>12</sup> Estas funções podem ser alteradas pelo processo de imobilização, sendo recomendável conhecer os detalhes atômicos do sistema. Neste contexto, as metodologias de simulação computacional podem ser utilizadas para investigar propriedades estruturais de sistemas químicos complexos envolvendo proteínas, almejando a produção de conhecimentos básicos ao nível molecular que contribuam na elucidação destas questões. O entendimento do processo pode resultar no desenvolvimento de novos nanobiossensores com forte impacto econômico e tecnológico.

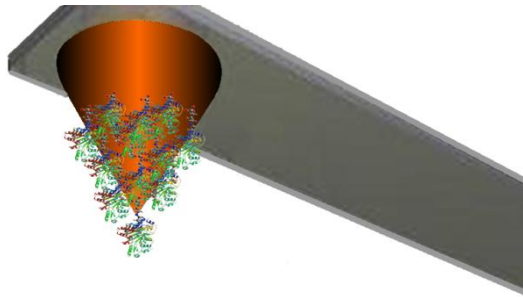
Em reações enzimáticas estes estudos implicam em conhecer o entendimento das interações entre o substrato e o sítio catalítico da enzima, bem

como de outros fatores que influem nesta interação. Dentre estes fatores podem-se destacar, além da composição e estrutura do sítio ativo, os efeitos dinâmicos e da composição do sistema. Ressalta-se que entender a sinergia destes processos é de real suma para o desenvolvimento de estratégias de intervenção em processos patológicos. O entendimento dos processos enzimáticos pode ser enriquecido pelo conhecimento de detalhes do sistema ao nível atômico e molecular. Entretanto, são raras as técnicas experimentais que revelam detalhes completos da dinâmica destes sistemas em escala atômica. As poucas técnicas existentes possuem custo elevado e dificuldades práticas para a aplicação generalizada. Deste modo, com o avanço e popularização de computadores cada vez mais velozes e o desenvolvimento de programas, a química computacional consolidou-se como uma área de pesquisa fundamental para o entendimento de processos químicos a nível atômico e molecular. A sinergia existente entre o desenvolvimento de *hardware & software* cria novos horizontes para a aplicação em pesquisa científica. Os avanços obtidos têm sido de grande valia para a química e áreas afins, proporcionando também o surgimento de interfaces de colaboração direta com a pesquisa experimental.

Serão apresentadas nesta tese as linhas gerais do tratamento termodinâmico da interação enzima-ponta de AFM funcionalizada. O modelo adotado para as simulações computacionais não incorpora todo o formalismo termodinâmico das condições em que a técnica de microscopia de força atômica é utilizada, mas os detalhes atomísticos incluídos fornecem uma informação mais completa na descrição do processo de funcionalização de pontas de AFM. Com pequenas mudanças, o modelo proposto pode ser também usado para estudar a imobilização de enzimas em sílica para aplicações em cromatografia líquida. Para o caso específico do AFM, serão apresentadas as linhas gerais da interação substrato-enzima enfatizando as interações não específicas que podem ser usadas como linha de base na medição experimental. Na figura 1.1 é apresentado um

desenho esquemático de uma ponta de AFM funcionalizada com enzimas aderidas a superfície.

FIGURA 1.1 - Desenho de uma ponta de AFM funcionalizada com enzimas para detecção de inibidores.



Fonte: Elaborado pelo autor

## 1.2 – Vantagens e Limitações no Uso Microscópio de Força Atômica<sup>1,13</sup>

As maiorias das pontas de AFM vendidas comercialmente são feitas de silício (Si), nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) ou cobertas com ouro (Au). Dentre as vantagens do uso do AFM experimental podemos destacar algumas:

- o AFM possui várias vantagens em comparação a um microscópio eletrônico de varredura (MEV), o AFM fornece uma imagem tridimensional da superfície diferentemente do microscópio eletrônico que faz uma projeção bidimensional ou uma imagem bidimensional de uma determinada amostra;
- investigações de materiais condutores ou isolantes, pois o AFM não utiliza corrente de tunelamento para a formação das imagens;
- análise de qualquer tipo de material;

- na análise é utilizado um pequeno volume de amostra, tornando a preparação da amostra simples ou desnecessária, e não é necessário nenhum tratamento especial (como metal ou revestimento de carbono) que poderia alterar ou danificar a amostra. Assim, possibilita analisar amostras biológicas sem retirá-la de seu meio e sem perder suas propriedades;
- possibilidade de análise de diversificados ambientes, inclusive na atmosfera (temperatura ambiente e em presença do ar) ou até mesmo em líquidos, diferentemente de um microscópio eletrônico que precisa de um ambiente de vácuo para o seu bom funcionamento. O uso do AFM reduz o preço da análise;
- pode ser utilizado para acompanhar processos em tempo real porque possui baixo tempo de análise;
- a alta resolução AFM é compatível a resolução do microscópio de tunelamento e o de microscopia eletrônica de transmissão;
- uma outra aplicação é a espectroscopia de força atômica, consiste na medição das forças de interação em função da distância entre a ponta e a superfície, o resultado desta medida é chamado de curva força-distância. O AFM tem sido muito utilizado para a medição de diversas forças em nanoescala, como: ligação atômica, as forças de van der Waals (Efeito Casimir), forças de dissolução em líquidos e forças de alongamento e ruptura. A Espectroscopia de força atômica pode ser feita tanto com os modos contato ou não contato;
- podem ser anexadas diferentes terminações (grupamentos) na ponta do microscópio de força atômica, por exemplo grupamentos químicos que possuam uma melhor interação com a amostra de interesse. Recentemente, uma molécula de monóxido de carbono foi utilizada pela IBM para “fotografar” uma molécula de pentaceno.<sup>1,13</sup>

Quanto às limitações desta técnica:

- vibrações podem atrapalhar o funcionamento do microscópio de força atômica, ou seja, o som ambiente, vibrações mecânicas (como pessoas circulando em um recinto) e até mesmo a rede elétrica podem ser interferentes na análise. Por isso o equipamento deve ser montado em uma mesa com um sistema de amortecimento em uma sala fechada;
- pelo AFM requerer uma coleção de imagens existe uma limitação na sua velocidade;
- a presença de contaminantes na superfície pode conduzir a uma imagem irreal, pois o AFM analisa apenas a última superfície da amostra. Os contaminantes mais comuns são carbonatos, carbonetos, água, hidrocarbonetos, etc. Quando esse contaminante é um líquido, uma operação do AFM no modo contato irá penetrar na camada de líquido para a imagem da superfície subjacente, enquanto que no modo não-contato com um AFM oscilará acima da camada adsorvida;
- o movimento da ponta do AFM pode ocasionar alterações na superfície;
- a imagem é a convolução da forma da ponta com a superfície, diferentes pontas podem ocasionalmente gerar diferentes imagens.

### **1.3 - Biossensores**

Os biossensores são ferramentas analíticas que combinam biomoléculas (ácido nucleico, enzima, anticorpo, receptor, célula, tecido) imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico.<sup>14</sup>

Dependendo da natureza do elemento de reconhecimento do sistema transdutor escolhido, o significado de biossensor pode ser estendido. Em

determinado evento pode ser de interesse priorizar a seletividade e/ou sensibilidade do sensor enquanto que em outro evento, o intervalo de resposta ou de habilidade de regeneração da superfície de interação seja a prioridade. Neste contexto, a miniaturização das partes sensoriais através da nanotecnologia é, em vários episódios, atraente e viável. Deste modo, quando a sensibilidade e a seletividade do biossensor são investigadas na escala nano (compreendidos na escala de 1-100 nm), estes dispositivos recebem o nome de nanobiossensores.<sup>15</sup>

Assim, podem-se definir os nanossensores como sendo materiais funcionais e sensoriais utilizados para transmitir informações químicas, físicas, quânticas ou biológicas sobre materiais e moléculas diversas.

### **1.3.1 - Classificação dos Biossensores**

Os nanossensores podem ser classificados de acordo com quatro critérios fundamentais:

- quanto ao método utilizado para detectar a interação desejada;
- quanto ao tipo de interação que se estabelece entre o elemento sensor e o analito;
- quanto ao sistema de transdução;
- Quanto a natureza do composto de reconhecimento (biológico ou não biológico).<sup>15</sup> Através de diversas combinações entre esses critérios, podem surgir diferentes tipos de nanossensores que são definidos e categorizados por seus diferentes alvos de detecção, materiais que são feitos e pelos sinais que utilizam para transmitir informação, como mostra a tabela 1.1.



TABELA 1.1 - Componentes principais que dão origem aos nanossensores.<sup>16</sup>

<b>NANOSSENSORES</b>		
<b>Materiais</b>	<b>Sinais</b>	<b>Alvo</b>
<i>Cantilevers</i> de AFM	Ópticos	Anticorpos
<i>Cantilevers</i> de AFM	Mecânicos	Peptídeos
Nanopartículas metálicas/magnéticas	Elétrico	Moléculas biológicas diversas
Nanotubos	Magnético	Analitos inorgânicos perigosos
Nanocanais	Eletroquímico	Aptâmero
<i>Cantilevers</i> de AFM	Piezoelétrico	Enzima

De acordo com a teoria que envolve os nanobiossensores, os componentes mostrados na tabela 1.1 se ajustam a várias combinações. Contudo, na prática, a escolha da molécula biológica sensorial depende dos atributos da molécula alvo de interesse.<sup>15</sup>

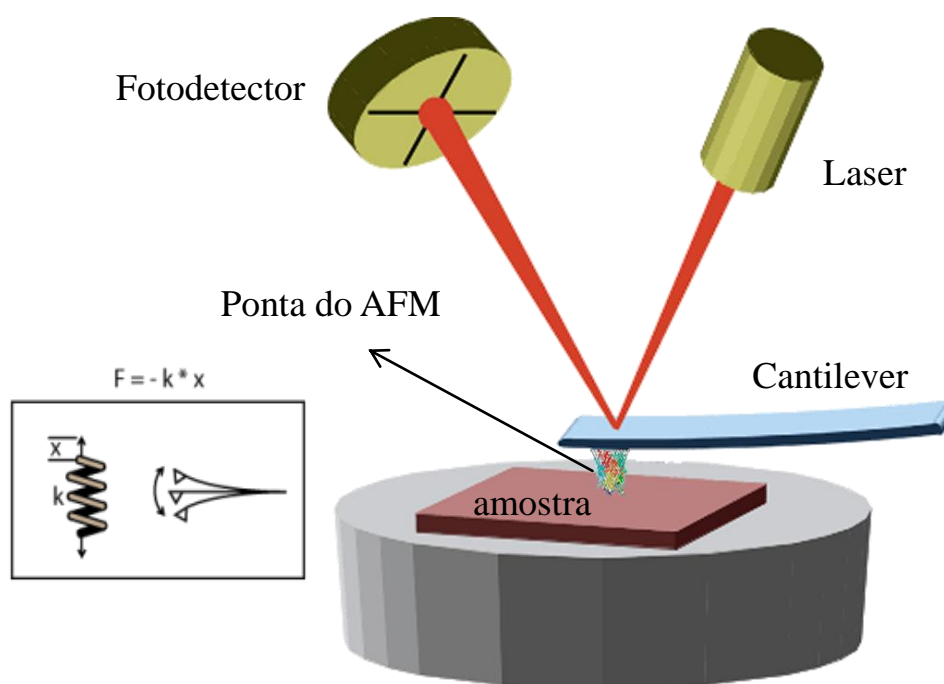
### 1.3.2 - Nanobiossensores de Ponta de AFM

O AFM, além de ser útil em análises de imageamento de diversos tipos superfícies e fornecer dados das propriedades mecânicas das mesmas,<sup>17</sup> também pode ser empregado como um instrumento de sensoriamento na nanoescala. O mesmo dispositivo utilizado para as análises de varredura de superfícies em AFM, o *cantilever* com uma ponta (figura 1.2), pode ser utilizado para medidas pontuais de interação e reconhecimento específico de diversos analitos. Sensores construídos com base neste dispositivo são chamados de nanossensores de pontas de AFM (ou de sonda, ou de *tip*) e, são baseados na resposta de interação entre a ponta do *cantilever* com um substrato específico ou ainda entre as moléculas imobilizadas no ápice de sua superfície, como uma

função da distância de separação relativa entre eles. Dados desse reconhecimento são fornecidos por curvas de força *versus* distância. Neste contexto, a espectroscopia de força atômica (AFS do inglês - *atomic force spectroscopy*) consegue fornecer dados relativos ao comportamento de moléculas nas superfícies através de forças de alongamento e torção, bem como a sua resposta de endentação.<sup>18,19</sup>

Os nanossensores de ponta de AFM podem detectar tanto analitos inorgânicos, como orgânicos, podendo ser construídos através da funcionalização química de sua superfície com elementos de sensoriamento biológicos (biomoléculas)<sup>20</sup> ou biomiméticos.

FIGURA 1.2 - Esquema dos principais componentes de microscópio de força atômica.



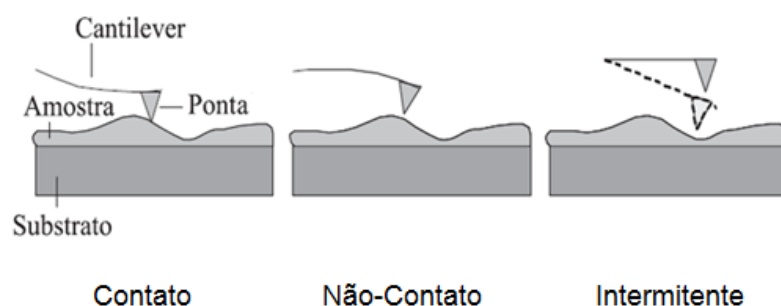
Fonte: Elaborada pelo autor

A distância entre a ponta e a amostra é de fundamental importância para a caracterização de um material, para a resolução das imagens e qualidade

dos resultados. Dessa forma, o modo de varredura em que o microscópio trabalha é importante para uma análise de qualidade do AFM. Nesse aspecto, três modos de operação são definidos de acordo com a distância existente entre a ponta e amostra:

- contato: forças repulsivas de van der Waals são predominantes; o escaneamento da amostra é rápido e, portanto, pode danificar a amostra;
- não-contato: forças atrativas de van der Waals são predominantes; geralmente fornece uma imagem de baixa resolução; não danifica a amostra;
- contato intermitente (*tapping mode*): permite boa resolução das imagens; velocidade de escaneamento é geralmente baixa. A figura 1.3 ilustra os três modos de operação do AFM.

FIGURA 1.3 - Modos de operação do microscópio de força atômica.<sup>21</sup>



Fonte: Ferreira et al. 2006<sup>21</sup>

Os componentes essenciais de um AFM, e da maioria dos microscópios de varredura por sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscopy*), são uma cerâmica piezoelétrica (*scanner*), um *cantilever* com a ponta, detector, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*, sistema de realimentação (*feedback*) e um computador, que armazena e processa as diferentes deflexões da sonda.<sup>22,23</sup>

Geralmente as pontas de AFM são funcionalizadas quimicamente como objetivo de promover uma ligação covalente para imobilizar ou adsorver fortemente uma molécula sensorial (enzima ou anticorpo na superfície da ponta).<sup>19,24</sup> Na maioria das vezes, as interações específicas entre esse sistema e o substrato (amostra) são reversíveis, permitindo o monitoramento contínuo de amostras<sup>25</sup>. Estes sensores são instrumentos muito úteis para a análise de doenças e detecção de moléculas tóxicas no meio ambiente, já que são altamente seletivos e sensíveis.<sup>26,27</sup>

As principais vantagens dos nanossensores de ponta de AFM estão relacionadas, principalmente, com os limites de detecção baixos, em nível molecular. Os nanossensores de ponta de AFM também apresentam vantagens de desempenho, como resposta instantânea/em tempo real e, em alguns casos, portabilidade.<sup>28</sup> Por serem dispositivos que permitem a imobilização de moléculas específicas, os nanossensores oferecem também um reconhecimento específico e direcionado, evitando assim ligações cruzadas inespecíficas. Adicionalmente, esses sensores são considerados como sendo sensores inteligentes, já que podem ser empregados como sistemas independentes de detecção ou integrados às redes de dados.<sup>28</sup> Igualmente, apresentam o benefício de detectar analitos múltiplos e, dependendo do design do nanossensor, podem ser reutilizáveis e mimetizar ambientes orgânicos.<sup>29</sup>

Em contrapartida, o ponto negativo dos nanossensores de ponta de AFM está ligado ao fato de que os sistemas de sensoriamento empregados para seu funcionamento precisam ser estudados detalhadamente para que se possa escolher tanto a melhor geometria da ponta, como as moléculas apropriadas para desempenhar o papel de elemento sensorial. Além disso, também é preciso indicar o método de imobilização (funcionalização) adequado de modo que os sítios ativos ou grupamentos químicos chave, estejam disponíveis para promoverem as ligações. Ter dimensões na nanoescala, o grande benefício desses sensores,

também pode ser uma grande desvantagem, já que os eventos na dimensão nanométrica se tornam mais difíceis de serem controlados.

## 1.4 - Funcionalização de Pontas de AFM

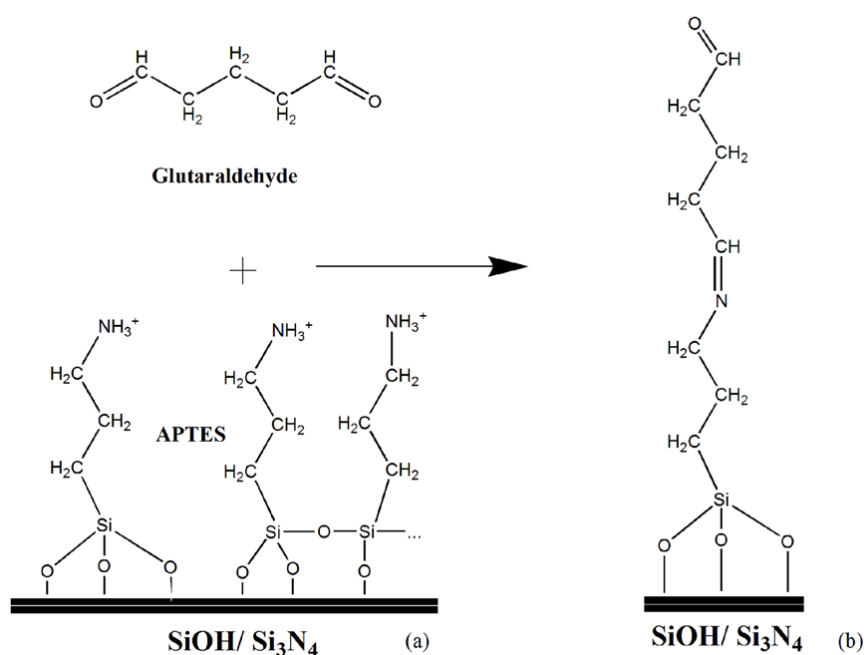
A modificação química de pontas de AFM permite a investigação de interações específicas entre a ponta e a amostra. A técnica vem sendo aplicada no estudo das forças existentes entre biomoléculas, devido, principalmente a sua resolução nanométrica.<sup>30</sup> Durante a varredura, a ponta do AFM contendo os ligantes entra em contato com a superfície onde estão os respectivos receptores, formando um tipo de ligação que é denominado “chave-fechadura”. Em seguida, a ponta é retraída, a força aplicada pelo sistema de realimentação é aumentada até que a ponta desprende-se da superfície. Para que ocorra a ligação específica, ou seja, o reconhecimento, é necessário que os ligantes sejam ligados fortemente à ponta do AFM, seja por ligação covalente ou por forças eletrostáticas.<sup>11</sup>

Dentre as metodologias existentes para modificação química de pontas de AFM, duas estão sendo mais explorada nos últimos anos, a primeira utiliza pontas de ouro (Au), ou recobertas com ouro<sup>31</sup>, e grupos tióis ligados covalentemente para a funcionalização de biomoléculas. A segunda trabalha com pontas de silício (Si) ou nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) oxidado, ao serem expostas ao ar ou à água elas oxidam naturalmente, formando uma camada de óxido que contém uma grande quantidade de grupos reativos (Si-OH), esses grupos reagem fortemente com silanos ou álcoois.<sup>32,33</sup>

Esta oxidação é aproveitada como ponto de partida para funcionalização das pontas do AFM. Para a funcionalização das pontas, o reagente 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES) reage fortemente com a superfície oxidada deixando grupos amino expostos, figura 1.4a. Estes grupos amino reagem com

grupos aldeído, exemplo, o glutaraldeído, o qual foi estudado nesta pesquisa como ligante cruzado, figura 1.4b. As formas de interação da molécula do APTES com a superfície foram descritas por Bhushan et al, 2005<sup>34</sup>. Para simular computacionalmente esta superfície modificada, o APTES-glutaraldeído o qual foi chamado de agente espaçante de superfície (AES), foi ligado covalentemente a superfície de SiOH para representar a superfície do AFM. Os parâmetros de campo de força para simular a dinâmica molecular do sistema tiveram que ser calculados usando mecânica quântica. Estes parâmetros foram implementados de acordo com o protocolo utilizado no campo de força CHARMM 27.<sup>35</sup> A enzima alvo para o estudo computacional de imobilização será apresentada nos próximos tópicos desta tese.

FIGURA 1.4 - A reação da formação da superfície AES representada da seguinte maneira: (a) APTES ligado à superfície oxidada do AFM. (b) a estrutura molecular final do AES utilizada na simulação.



Fonte: Elaborada pelo autor

## 1.5 – Modelando as Interações entre Biomoléculas e Superfície

Paralelamente aos avanços nas técnicas experimentais, existe um interesse crescente na realização de estudos de modelagem de proteínas solvatadas em água perto de interfaces inorgânicas. A modelagem molecular das interações proteína-superfície podem elucidar os princípios subjacentes das interações, e, assim, permitir a concepção deste tipo de interações.<sup>36</sup> As modelagens das interações proteínas-superfície podem ser realizadas em vários níveis de detalhe, procurando incorporar as condições experimentais do sistema real. Nas próximas seções, a atomística das interações entre a ponta do AFM funcionalizada e a enzima ACCase serão abordados.

As interações em sistemas contendo peptídeos e moléculas de solvente próximas de superfícies orgânicas e superfícies não-condutoras inorgânicas podem, em princípio, ser descritas por campos de força clássicos, levando em conta as propriedades termodinâmicas e estruturais dos sistemas. A energia total de interação soluto-superfície pode então ser calculada por meio da integração do potencial de interação dos pares de átomos soluto-superfície sobre todos os átomos da superfície.<sup>37-39</sup>

## 1.6 – Acetil CoA Carboxilase (ACCCase)

A Acetil-CoA carboxilase (ACCCase) é uma proteína crucial para o metabolismo dos ácidos graxos e tem um papel importante no desenvolvimento de terapias contra a obesidade, diabetes e outras doenças.<sup>40</sup> A estrutura cristalográfica da ACCCase do repositório disponível *online*, *Protein Data Bank*, PDB ID: 1UYR, a qual os resíduos ausentes foram incorporados segundo Franca *et. al.*,<sup>20</sup> foi utilizada como ponto de partida para as simulações computacionais no estudo de funcionalização de pontas de AFM.

A carboxil-transferase (CT) do domínio da ACCase, é o sítio de ação de herbicidas comerciais, tais como haloxifop, diclofop e sethoxidina. Os inibidores são ligados no sítio ativo, na interface do dímero do domínio do CT. As ações dos inibidores exigem grandes mudanças conformacionais de vários resíduos nessa interface, o que cria uma bolsa hidrofóbica altamente conservada, que se estende profundamente no núcleo do dímero. Dois tipos de resíduos que afetam a sensibilidade dos herbicidas estão localizados neste sítio de ligação e a mutação destes resíduos rompe a estrutura do domínio. Outros resíduos no local de ligação são estritamente conservados entre os domínios do CT.<sup>41</sup>

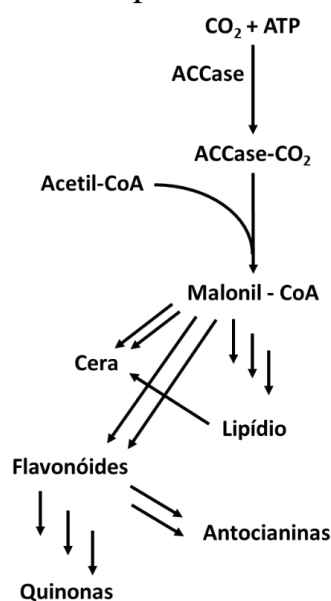
Os seres procariontes e plantas têm multi-subunidades da ACCase compostas de vários polipéptidos codificados por genes distintos. A atividade da biotina Carboxilase(BC), proteína transportadora carboxil biotina(PTCB), e atividade da carboxiltransferase(CT) estão cada uma contida em uma subunidade diferente. A estequiometria destas subunidades da holoenzima ACCase difere entre os organismos.<sup>42</sup>

Nos humanos e muitos eucariotes a ACCase têm evoluído os domínios catalíticos de CT,BCe os domínios transportadores da carboxil biotina em um único polipéptido. As regiões funcionais da ACCase, a partir da parte terminal N para parte terminal C são a biotina carboxilase(BC), biotina de ligação(BL), carboxiltransferase(CT), e a parte de ligação com o ATP que encontra-se dentro da BC. A biotina é ligada de forma covalente através de uma ligação amida ao longo da cadeia lateral de uma lisina residente em BL. Como a BL está entre as regiões BC e CT, a biotina pode ser facilmente translocada para ambos os sítios ativos onde é requerida. Nos mamíferos, onde duas isoformas da ACCase são encontradas, a principal diferença estrutural entre estas isoformas é estendida ao N-terminal da ACCase2 contendo uma sequência de direcionamento mitocondrial.<sup>42</sup>



A função da ACCase é a de regular o metabolismo de ácidos graxos, então quando a enzima está ativa, a malonil-CoA é produzida, que é um bloco para novos ácidos graxos, e pode inibir a transferência do grupo acilo de acil-CoA de carnitina com a carnitina acil transferase, que inibe a beta-oxidação de ácidos na mitocôndria. Nos mamíferos, as duas isoformas principais de ACCase são expressas em ACCase1 e ACCase2, que diferem tanto na distribuição e função dos tecidos. A ACCase1 é encontrada no citoplasma de todas as células, mas é enriquecida em tecido lisogênico, tais como o tecido adiposo e glândulas mamárias sem lactação, em que a síntese de ácidos graxos é importante.<sup>42</sup> Em tecidos oxidativos, tais como o músculo esquelético do coração, a proporção expressa de ACCase2 é maior. A ACCase1 e ACCase2 são altamente presentes no fígado, onde a oxidação de ácidos graxos é importante.<sup>43</sup> As diferenças de distribuição nos tecidos indicam que ACCase1 mantém a regulação da síntese de ácido graxo ao passo que ACCase2 regula principalmente a oxidação dos ácidos graxos.<sup>44</sup> A figura 1.5 representa a reação de síntese catalisada pela enzima ACCase.

FIGURA 1.5 - Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima accase.<sup>45</sup>

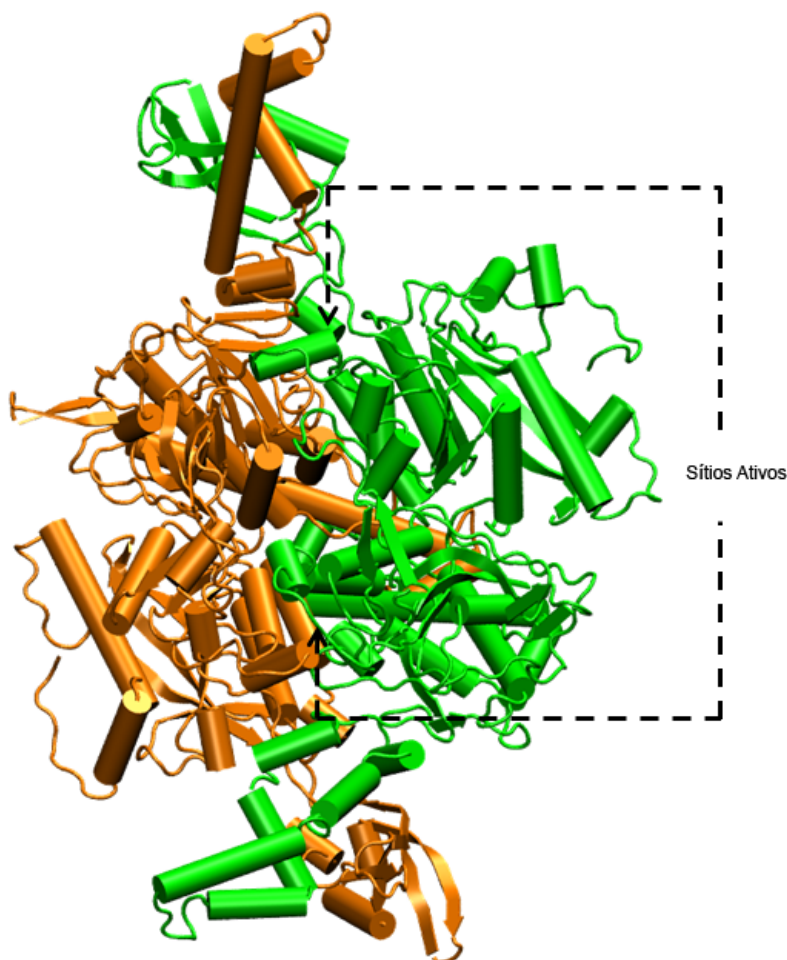


Fonte: Wikipedia<sup>44</sup>

Na junção da síntese de lípidos e das vias de oxidação, a ACCase apresenta muitas possibilidades clínicas para a produção de novos antibióticos e do desenvolvimento de novas terapias para diabetes, obesidade, e outras manifestações da síndrome metabólica.<sup>46</sup>

Muitos pesquisadores pretendem tirar partido das diferenças estruturais entre as ACCase's bacterianas e humanas para criar antibióticos específicos para a ACCase bacteriana, um esforço para minimizar os efeitos secundários para o paciente. Resultados promissores para a utilização de um inibidor de ACCase incluem a descoberta de que ACCase2 de camundongos que têm a oxidação de ácidos graxos contínua, a massa corporal reduzida de gordura e peso corporal reduzido, apesar de um aumento no consumo de alimentos.<sup>40</sup> Deve notar-se que os ratos mutantes desprovidos de ACCase1 são embrionariamente letais. No entanto, é desconhecido se as drogas que alvejam as ACCase's em seres humanos devem ser específicas para ACCase2 do que para a ACCase1.<sup>47</sup>

FIGURA 1.6 - Enzima ACCase em sua forma dimérica com a localização dos sítios ativos



Fonte: programa Visual Molecular Dynamics – VMD<sup>87</sup>

Nos seres humanos e na maioria dos eucariontes a ACCase evoluiu com a CT, os domínios catalíticos da BC e também os domínios da proteína carregadora de biotina-carboxil em uma única cadeia polipeptídica de 2.346 resíduos. De acordo com Franca et al<sup>20</sup>, a forma mais estável da enzima ACCase em solução aquosa é a forma dimérica na qual o sítio ativo se localiza entre dois monômeros da enzima (figura 1.6). Nos mamíferos, ocorrem duas principais isoformas da ACCase, a  $\alpha$ -ACCase que ocorre no tecido adiposo e a  $\beta$ -ACCase que ocorre nos tecidos que oxidam mas não sintetizam ácidos graxos, como os músculos cardíacos. Tecidos que sintetizam e oxidam ácidos graxos, como o fígado, contém as duas isoformas, que são homólogas, embora os genes que as

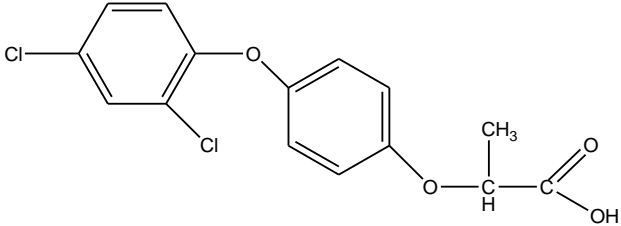
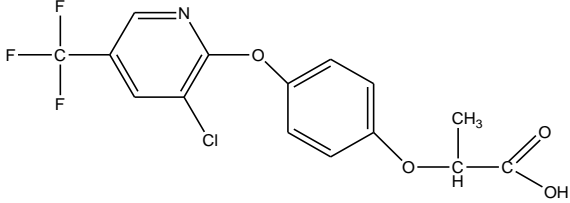
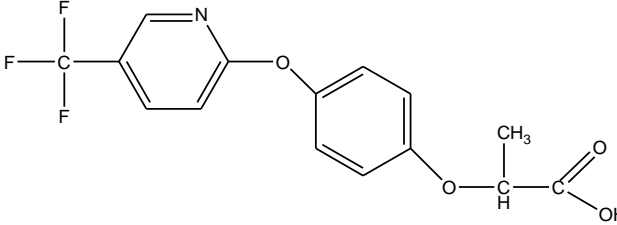
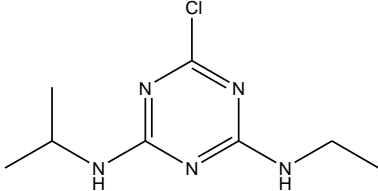
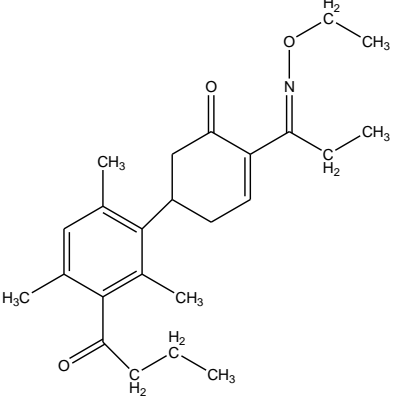
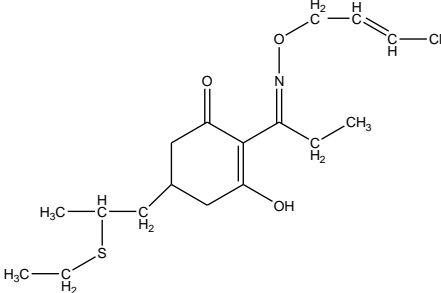
codificam estejam localizados em diferentes cromossomos. A função da  $\alpha$ -ACCCase é regulatória, o produto da reação catalisada pela ACCCase, malonil-CoA, inibe fortemente a importação da acil-CoA.

A ACCCase de procariótos não está sujeita a tais controles, pois nesses organismos, ácidos graxos não são armazenados como gorduras, mas são sobretudo precursores de fosfolipídeos. A enzima de *E. coli* é regulada pelos nucleotídeos da guanina, de forma que a síntese de ácidos graxos está coordenada com o crescimento celular.<sup>47</sup>

## 1.7 - Inibidores da ACCCase

Dentre os inibidores da ACCCase podemos destacar os ariloxifenoxipropionatos: diclofop, fenoxaprop, fluazifop-p, haloxyfop, propaquizafop, quizalofop etc. e ciclohexadionas: clethodim, sethoxidim etc. Na tabela 1.2 temos um resumo dos principais inibidores.

TABELA 1.2 - Alguns dos principais herbicidas comerciais passíveis de inibir a atividade enzimática da ACCase.

Herbicida	Estrutura Molecular
Diclofop - $C_{15}H_{12}Cl_2O_4$	
Haloxifop - $C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	
Fluazifop - $C_{15}H_{12}F_3NO_4$	
Antrazina - $C_8H_{14}ClN_5$	
Butroxydim - $C_{24}H_{33}NO_4$	
Clethodim - $C_{17}H_{26}ClNO_3S$	

Muitos dos estudos já realizados sobre o mecanismo de ação dos ariloxifenoxipropionatos foram feitos com o herbicida diclofop. Este herbicida é rapidamente absorvido pelas folhas e atinge os meristemas da planta, apesar de a quantidade que atinge a área meristemática ser muito pequena em relação ao que é aplicado. A translocação ocorre pelo xilema e pelo floema. A inibição da ACCase é vista perfeitamente com a redução no crescimento, o aumento na permeabilidade de membrana e os efeitos ultra-estruturais observados nas células. Trata-se de uma reação-chave no início da biossíntese de lipídios. Esta reação dosa o ritmo da biossíntese de lipídios. Em algumas horas, o crescimento de raízes e parte aérea é paralisado. O tecido meristemático em gemas e nós da planta torna-se clorótico e, depois, necrótico. Após alguns dias da aplicação, quando o tecido meristemático decai, fica aparente a disfunção de membrana. As folhas mais velhas apresentam sinais de senescência e mostram troca de pigmento.<sup>48</sup>

## **1.8 - Aspectos Termodinâmicos da Imobilização de Biomoléculas em Superfícies**

A adsorção de enzimas em superfície sólidas em meio aquoso é um processo muito complicado que é dirigido por diferentes forças, incluindo van der Waals, forças hidrofóbicas e eletrostáticas. Importantes parâmetros para adsorção são o pH, temperatura, força iônica, as propriedades intrínscicas da enzima e a natureza do solvente. A idéia fundamental em torno da adsorção espontânea de proteínas é que a adsorção ocorre quando mais energia é liberada ao invés de absorvida de acordo com a energia livre de Gibbs.

Isto pode ser visto na equação:

$$\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} - T\Delta S_{\text{ads}} < 0 \quad (1.1)$$

Onde,  $\Delta G_{\text{ads}}$  é a alteração dos parâmetros de rede;  $G(\text{kJ/mol})$  é a energia livre de Gibbs;  $T(\text{K})$  é a temperatura;  $S(\text{kJ/mol})$  é a entropia e  $H(\text{kJ/mol})$  é a entalpia.

Para que a adsorção da proteína ocorra de forma espontânea, o valor do termo  $\Delta G_{\text{ads}}$  deve ser um número negativo.

### 1.8.1 - Cinética de Adsorção

Um dos fatores determinantes para a adsorção de proteínas é a velocidade inicial de adsorção. Neste caso, nem todas as moléculas proteicas que chegam a superfície são adsorvidas. Conseqüentemente existe uma barreira energética para a adsorção. O efeito hidrodinâmico pode criar um obstáculo antes de a proteína ser imobilizada na superfície, por exemplo: tanto a proteína quanto a superfície precisam ser desidratadas, a proteína precisa estar na orientação espacial adequada em direção a superfície e a repulsão eletrostática precisa ser vencida.<sup>49</sup>

Os principais mecanismos para a proteína entrar em contato com a superfície são: a difusão, a convecção térmica, o fluxo de massa, ou uma combinação de todos estes. Ao considerar o transporte de proteínas, é clara a forma como gradientes de concentração, temperatura, tamanho da proteína e da velocidade de fluxo poderão influenciar na chegada de proteínas em uma superfície sólida. Sob condições de baixo fluxo e gradientes de temperatura mínima, a taxa de adsorção pode ser modelada depois da equação de velocidade de difusão,<sup>50</sup> ou seja:

$$\frac{dn}{dt} = C_0 \left( \frac{D}{\pi t} \right)^{1/2} \quad (1.2)$$





diferença-finita como descrito por Nichols e Honig,<sup>53</sup> e o efeito da força iônica sendo incluído pelo termo de Debye-Hückel usando cargas parciais e raios atômicos dos parâmetros dos campos de força. Para isso existem programas, tais como o APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*).<sup>54</sup> O potencial eletrostático varia ao longo do espaço, portanto, o mapa de potencial pode ser visualizado da mesma maneira que a densidade eletrônica. Na simulação biomolecular, o mapeamento do potencial eletrostático da superfície molecular tem-se mostrado particularmente útil no entendimento de interações moleculares. Usando esta aproximação, é possível identificar as possíveis regiões de ligação do sítio ativo e regiões que se ligam na superfície de imobilização. A representação do potencial de uma proteína pode ser visualizado na figura 1.7. Esta informação pode ser usada para promover um ‘*insight*’ visual qualitativo da afinidade relativa das proteínas com os diferentes materiais presentes na ponta funcionalizada do AFM.

Além do mapa tridimensional descrito na figura 1.7, o cálculo de potencial eletrostático permite estimar o  $pK_a$ , a energia livre de solvatação e a energia de interação eletrostática entre a proteína e o pesticida.<sup>55,56</sup>

### **1.8.3 - Hidrofobicidade da Proteína**

Os aminoácidos de uma proteína podem ser hidrófilos e hidrófobos e dependendo da polaridade da cadeia lateral, os aminoácidos variam na sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica. Estas propriedades são importantes para a estrutura da proteína e interações proteína-proteína. A importância das propriedades físicas das cadeias laterais trata da influência que isso tem sobre as interações dos resíduos de aminoácidos “com outras estruturas, tanto dentro de uma única proteína e de entre as proteínas”. A distribuição dos aminoácidos hidrofílicos e aminoácidos hidrofóbicos determinam a estrutura terciária da proteína, e a sua localização física na estrutura do lado de fora das proteínas

influenciando na sua estrutura quaternária. Por exemplo, as proteínas solúveis têm superfícies ricas em aminoácidos polares como a serina e treonina, enquanto que as proteínas de membrana integrais tendem a ter o anel externo de aminoácidos hidrofóbicos que os ancora para a bicamada lipídica. As proteínas ancoradas à membrana têm uma extremidade hidrofóbica que bloqueia na membrana. Do mesmo modo, as proteínas que têm de se ligar a moléculas carregadas positivamente têm superfícies ricas com carga negativa aminoácidos como o glutamato e aspartato, enquanto que as proteínas que se ligam a moléculas carregadas negativamente têm superfícies ricas com correntes de carga positiva como lisina e arginina. Recentemente, uma nova escala de hidrofobicidade com base na energia livre de associação hidrofóbica tem sido proposto.<sup>57</sup>

As interações hidrofílicas e hidrofóbicas das proteínas não têm de contar apenas com as cadeias laterais de aminoácidos em si. Por várias modificações pós-tradução de outras cadeias podem ser ligados a proteínas, formando lipoproteínas hidrofóbicas ou hidrofílicas glicoproteínas.

#### **1.8.4 - Estabilidade da Proteína**

Fatores que Influenciam a Estabilidade são: temperatura, pH, força iônica, presença de agentes desnaturantes e atividade da água.

#### **1.8.5 - Influência da Temperatura**

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente:

- taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas;

- estabilidade da proteína decresce devido a desativação térmica.

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. O efeito da temperatura em uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH, a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor.

No processo de desnaturação térmica ocorre a perda da atividade biológica da enzima. Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo.

### **1.8.6 - Efeitos do pH**

Normalmente valores extremos de pH induzem a desnaturação. Alteração da carga dos aminoácidos da molécula (anula interações eletrostáticas - promove repulsões) - 8 dos 22 aminoácidos das proteínas alteram sua carga com variação do pH. Afeta a estrutura da molécula. Desaparecimento das cargas negativas (grupos COOH das Asp e Glu) e desaparecimento das cargas positivas - acúmulo de cargas negativas nos grupos COOH e nas tirosinas e cisteínas.

### **1.8.7 - Influência da Pressão**

O efeito da pressão em um processo físico-químico em equilíbrio é governado por uma mudança de volume no processo (NVT). A aplicação de pressão faz com que o equilíbrio se desloque em favor do lado da reação com menor volume.

$$\left(\frac{d \ln K}{dP}\right)_T = -\left(\frac{\Delta V}{RT}\right) \quad (1.3)$$

P = pressão em atm

Volume = em Litros

T = temperatura em Kelvin

### Interações Intramoleculares

- Interações iônicas: Proteínas formam pares iônicos que estabilizam sua estrutura terciária e quaternária. O aumento da pressão leva ao seu rompimento.
- Hidratação: Deformação da proteína pela entrada de água dentro da molécula.
- Ligações de hidrogênio: Promove as ligações de H, acarretando em conformações flutuantes. Diminui o tamanho das ligações comprimindo a molécula.

### Interações Intermoleculares

- Proteína-Proteína: Dissociação de proteínas oligoméricas, fragmentação da molécula.
- Enzima-Substrato: A ocorrência de eletrostrição pode romper o par iônico entre substrato e enzima.

## **2 – Objetivos**

### **2.1 - Objetivos Gerais**

O objetivo deste estudo é a avaliação de um modelo computacional para representar a superfície da ponta de um microscópio de força atômica funcionalizada, e assim fazer um estudo das propriedades termodinâmicas e estruturais adequadas para o desenvolvimento de um nanobiosensor de alta especificidade para a detecção de herbicidas comerciais utilizados na agricultura.

#### **2.1.1 - Objetivos Específicos:**

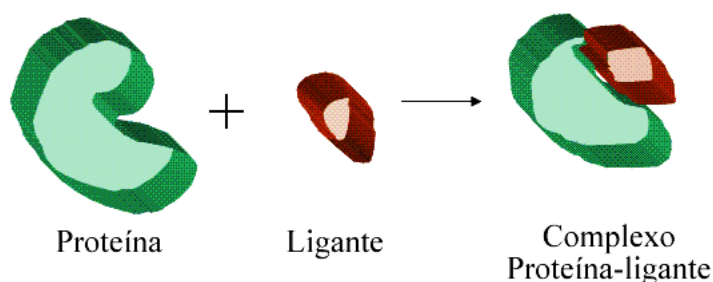
- descrever por intermédio do modelo teórico a funcionalização da superfície do substrato de mica com as moléculas do herbicida diclofop;
- propor um modelo teórico que explique as superfícies envolvidas no nanobiossensor do ponto de vista do sensoriamento.
- a partir do modelo teórico proposto e cálculos de dinâmica molecular, fazer provisões que auxiliem e corroborem resultados experimentais existentes.
- relacionar os resultados obtidos pelo modelo teórico com resultados experimentais, obtendo mais uma ferramenta para validar e aperfeiçoar o protótipo experimental do nanobiossensor de alta especificidade.

## 3–Bases Teóricas para a Simulação Molecular

### 3.1 – *Docking* Molecular

*Docking* é um método computacional que permite a previsão de ligação de substratos em diferentes poses. *Docking* é amplamente aplicado no estudo e design de drogas para compreensão dos mecanismos de interações do complexo proteína-ligante. Dentre os programas de simulação de encaixe usando o método de docking, o AutoDock é o mais amplamente utilizado.<sup>58</sup> Neste programa no primeiro passo, hidrogênios são adicionados ao ligante e as proteínas e cargas parciais são calculadas. Em seguida, uma caixa (*grid*) que geralmente abrange o local de ligação é construída. Subsequentemente, dentro deste *grid* é investigada a energia de ligação para a geometria do ligante na posição elencada. A ideia é a de identificar as poses em que os ligantes têm as menores energias. O AutoDock emprega uma abordagem de algoritmos genéticos para gerar conformações de ligantes. Um algoritmo é usado para investigar conformações favoráveis de ligantes das diversas populações formadas com base em uma semelhança predefinida pelo raio de corte. É provável que as regiões mais populosas do ligante sejam estatisticamente significativas, e devam ser levadas em consideração. Na figura 3.1 a seguir a representação esquemática de *docking*.

FIGURA 3.1 - Típica representação de docking molecular onde um ligante é complexado em uma região de uma proteína, formando o complexo proteína-ligante.



Fonte: Reelaborada pelo autor

Os algoritmos do *docking* são elaborados de tal modo que os mesmos sejam eficientes, rápidos e de fácil uso. Os algoritmos podem ser divididos em três tipos: *docking* rígido (proteína rígida e ligante rígido) e semiflexível (proteína e rígida e ligante flexível) e flexível (proteína e ligante flexíveis). Os cálculos de *docking* flexíveis são mais eficientes, mas exigem um alto custo computacional. Geralmente, nestes tipos de *docking*, apenas alguns resíduos localizados no sítio ativo ou de interesse da proteína são considerados flexíveis.

### 3.1.1 - Parâmetros do Programa Autodock

O objetivo fundamental do algoritmo do *docking* é encontrar a mais favorável conformação de ligação do ligante. Isto é obtido através do cálculo da energia de ligação do ligante a cada conformação possível. O algoritmo calcula iterativamente conformações do ligante, avalia cada conformação e mantém conformações com energias mais baixas. Três parâmetros são usados para determinar a duração do programa AutoDock utilizando o método de algoritmos genéticos: tamanho da população, número de avaliações e o número de gerações.

O algoritmo funciona da seguinte maneira, para uma população de 150 (valor padrão), 150 avaliações de energias são realizadas para cada geração para calcular a aptidão dos membros da população. O *Docking* termina ao atingir o número máximo de avaliações de energia ou o número máximo de gerações, consoante a condição que foi atingido primeiro. Os parâmetros padrão, ou seja, o número de avaliações (25 milhões) e número de gerações (27000) é geralmente melhor para se obter resultados de *docking* robustos. No entanto, em casos de um ligante comum, com um número maior de detorções, recomenda-se aumentar o número do parâmetro avaliações ou o tamanho da população<sup>59</sup>.

O programa AutoDock usa um campo de força empírico, que foi semi parametrizado com base em um grande número de inibidores dos complexos

proteicos. O cálculo envolve dois passos: o primeiro são as mudanças de energia intramolecular do ligante, bem como a proteína a partir do estado não ligado até estado ligado são calculados; o segundo é a avaliação das energias intermoleculares entre o ligante e a proteína na conformação ligada.

A equação para o cálculo da energia livre é o seguinte:

$$\Delta G = (V_{\text{bound}}^{\text{L-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{L-L}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-P}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-P}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-L}}) + \Delta S_{\text{conf}} \quad (3.1)$$

L- representa "ligante", P - representa "proteína" e V - representa o termo de energia dos pares

$$V = W_{\text{vdW}} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{\text{hbond}} \sum_{ij} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{\text{elec}} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{\text{sol}} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left( \frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \quad (3.2)$$

Equações acima foram tiradas do guia do usuário do programa Autodock 4.2<sup>60</sup> em que, W representa constante de ponderação cujo valor é derivado experimentalmente determinado das constantes de ligação. O primeiro termo  $6/12$ , é o potencial de interação dispersão/repulsão, o segundo é o termo de ligação, o terceiro termo é o potencial de Coulomb e o último termo é o potencial para a solvatação. A e B são parâmetros de van der Waals derivadas do campo de força Amber,<sup>61</sup> os parâmetros de C e D foram designados 5 kcal/mol da profundidade máxima de 1,9Å bem para O-H e N-H e uma profundidade de 1kcal/mola 2,5Å para S-H.



### 3.2 - Dinâmica Molecular (MD)<sup>62</sup>

Simulações computacionais atuam como uma ponte entre a estrutura microscópica da matéria e a macroscópica assim como a teoria e o experimento.<sup>61</sup> As propriedades termodinâmicas observáveis podem ser descritas pelo formalismo da mecânica estatística junto com o potencial de interação do sistema, que pode ser obtido a partir da mecânica quântica.<sup>63</sup> Porém, a solução analítica da função de partição só pode ser obtida para um número limitado de sistemas e modelos simplificados, como sólidos e gases ideais.

A dinâmica molecular está envolvida com movimento molecular, que é inerente a todos os processos físicos e químicos. Simulação por dinâmica molecular calcula o comportamento dependente do tempo de um sistema molecular e usa isto para investigar a estrutura, dinâmica e termodinâmica de moléculas biológicas. As simulações de MD são indicadas como relevantes na tradução da informação em mecanismos das funções biomoleculares. As simulações de sistemas biomoleculares são bem sucedidas quando podem dar um bom entendimento dos processos biológicos básicos e fornecer uma compreensão do design de fármacos.<sup>64</sup> Os movimentos de átomos são simulados em função do tempo de acordo com a equação de movimento de Newton, dada abaixo:

$$F_i = m_i a_i \quad (3.3)$$

A força pode ser expressada com um gradiente de energia potencial,

$$F_i = -\nabla_i V \quad (3.4)$$

Então a expressão seguinte é obtida pela combinação das duas equações anteriores:

$$F_i = \frac{-dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (3.5)$$

Uma força em um no átomo  $i$  é denotada por  $F_i$  e o tempo por  $t$ . A simulação MD requer o cálculo do gradiente de energia pontencial  $V(r)$ , que, portanto, deve ser uma função diferenciável das coordenadas atômicas  $r_i$ . A integração da equação 3.5 é feita em pequenos passos de tempo  $\Delta t$ , tipicamente 1 femtosegundos para sistemas moleculares. As grandezas termodinâmicas em equilíbrio podem ser obtidas pela média ao longo da trajetória, a qual se deve ser longa o suficiente de modo a formar um conjunto (*ensemble*) representativo do estado do sistema. Além das médias de *ensemble*, informações dinâmicas podem ser extraídas. Outro trunfo de simulações MD é que as propriedades fora do equilíbrio, que podem ser eficientemente estudadas. Visto como uma técnica para pesquisar o espaço de configuração, na MD a energia cinética do sistema permite amostrar configurações separadas por barreiras energéticas. Em geral, uma simulação de MD inclui três etapas: minimização, equilibração e cálculo da trajetória no equilíbrio para gerar dados necessários para as médias de *ensemble* e outras. A etapa de minimização é necessária para retirar possíveis tensões espúrias existentes na configuração inicial, e a etapa de equilibração é requerida para levar o sistema para uma configuração compatível com o estado de equilíbrio termodinâmico.<sup>65</sup> Isto é realizado *a priori* de uma simulação de dinâmica molecular, de modo que fortes interações repulsivas e de van der Waals que possam existir sejam removidas. Se essas interações forem mantidas, o sistema pode sofrer uma distorção estrutural local resultando em uma simulação instável. O objetivo de equilibração é levar o sistema a uma conformação favorável em que a uma determinada pressão e temperatura. No período de coleta de dados, a trajetória MD é gravada para posterior análise.

### 3.2.1 - Os Algoritmos de Verlet e *Leap-frog*

Os algoritmos são simples para um sistema que tem apenas dois átomos, no qual o potencial entre um único par é calculado. No entanto, como

aumento do número de átomos, os cálculos incluem os efeitos de vários átomos, nestes casos, os métodos de diferenças finitas são usados para integrar as equações de movimento. Estes métodos permitem o cálculo de potenciais contínuos para cálculos de dinâmica molecular. Os algoritmos de Verlet<sup>66</sup> e *Leap-frog*,<sup>67</sup> são amplamente utilizados nos métodos de diferenças finitas para integrar as equações de movimento. O algoritmo do método Leap-frog possui dois passos. Primeiro, ele calcula as velocidades no tempo  $(t + 1/2\delta t)$ , as posições então são calculadas no tempo  $(t + \delta t)$  a partir das velocidades calculadas:

$$v_{xi}(t + \delta t/2) = v_{xi}\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + ha_{xi}(t) \quad (3.6)$$

$$r_{xi}(t + \delta t/2) = r_{xi}(t) + hv_{xi}\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) \quad (3.7)$$

Tanto o algoritmo de Verlet e Leap-frog usam expansões em série de Taylor para aproximar posições, velocidades e acelerações, como se segue:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta tv(t) + \frac{1}{2}\delta t^2 a(t) + \frac{1}{6}\delta t^3 b(t) + \frac{1}{24}\delta t^4 c(t) \dots \quad (3.8)*$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + \delta ta(t) + \frac{1}{2}\delta t^2 b(t) + \frac{1}{6}\delta t^3 c(t) + \dots \quad (3.9)*$$

$$a(t + \delta t) = a(t) + \delta tb(t) + \frac{1}{2}\delta t^2 c(t) \dots \quad (3.10)*$$

$$b(t + \delta t) = b(t) + \delta tc(t) + \dots \quad (3.11)*$$

\* Equações tiradas de Andrew R. Leach, 2001.<sup>68</sup>  $v$  - velocidade (a primeira derivada da posição com respeito ao tempo),  $a$  - aceleração (a segunda derivada),  $b$  - é a terceira derivada, e assim por diante.

Aspectos importantes sobre simulações de dinâmica molecular (MD):

- princípios teóricos;



As condições de simulação, tais como número de partículas, modelo molecular usado, temperatura e outros parâmetros serão apresentados e comentados na parte de resultados e discussão.

### **3.3 - O Campo de Força**

A energia potencial na dinâmica molecular é definida por um campo de força que pode ter por base cálculos quântico. O campo de força é otimizado para ser capaz de representar os dados experimentais do sistema em estudo, levando aos chamados "campos de força empíricos". Campos de força comuns descrevem as interações entre as moléculas de um determinado arranjo de configurações e as interações eletrostáticas entre os átomos ou, de modo mais geral, os locais em que as moléculas estão presentes no sistema.

#### **3.3.1 – Os Campos de Força CHARMM e OPLS-AA**

A bioquímica e biofísica computacional são campos de pesquisa que vêm sendo aplicados a uma vasta gama de sistemas heterogêneos de diferentes tamanhos e complexidade. Fontes computacionais gratuitas, incluindo arquiteturas paralelas, e códigos eficientes, tais como o programa *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD) e GROMACS tem feito importantes contribuições para estes avanços, a qualidade dos campos de força que atuam como um quadro trabalho da biofísica e bioquímica computacional tem melhorado até o ponto que simulações estáveis destes sistemas são possíveis. Nesta direção, campo de força CHARMM tem feito importantes contribuições e existem muitas versões deste campo de força disponíveis. O campo de força empírico usado neste estudo é o CHARMM. A função de energia potencial intramolecular e a função de energia potencial

intermolecular no CHARMM são mostradas nas equações 3.10 e 3.11, respectivamente.

$$\begin{aligned}
& \sum_{\text{ligação}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torção}} K_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta)) \\
& + \sum_{\text{impróprios}} K_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
& + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{UB} (r_{1,3} - r_{1,3;0})^2
\end{aligned} \tag{3.10}$$

$$4\pi D \sum_{\text{elet}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{\text{VDW}} \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \tag{3.11}$$

A porção intramolecular da função de potencial de energia inclui os termos de ligação, ângulos, diedros próprios, diedros impróprios e termos 1-3 da função Urey-Bradley, onde  $b_0$ ,  $\theta_0$ ,  $\varphi_0$ , e  $r_{1,3;0}$  são os termos de equilíbrio, ligação, ângulo, impróprio, e UB respectivamente,  $n$  e  $d$  são a multiplicidade do diedro e fase e  $K$ 's são as respectivas constante de força. Os termos intramoleculares incluem as interações eletrostáticas e de vdW, onde  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas atômicas parciais dos átomos  $i$  e  $j$  respectivamente,  $\varepsilon_{ij}$  é a profundidade da curva de energia potencial,  $R_{\min,ij}$  o raio no termo de Lennard-Jones (LJ) usado para tratar as interações de VDW, e  $r_{ij}$  é a distância entre  $i$  e  $j$ .

O campo de força OPLS-AA<sup>70</sup> apresenta muito em comum com o AMBER96 e CHARMM22, o potencial de (12-6) Lennard-Jones mais cargas pontuais para átomos soltos ou distantes; e para átomos diferentes é utilizado ainda mistura de regras geométricas. Interações intra-moleculares apresentam

dinâmicas do potencial tipo harmônico tanto para estiramento de ligações quanto para torções angulares e ângulos diedrais do tipo próprio. Átomos conectados por três ligações também apresentam tratamento misto, porém em escala distinta: são regidos por Lennard-Jones e potencial de Coulomb, ambos em escala de 0,5. Torções angulares do tipo impróprias são utilizadas em certos átomos do tipo  $sp^2$  para restringir a planaridade de resíduos aromáticos. Como popular campo de força em estudos protéicos, o OPLS-AA se sai bem na maioria dos parâmetros.<sup>71</sup>

### 3.4 - O Programa NAMD

*Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD) é um código de dinâmica molecular paralelo utilizado em simulação de alta performance de grandes sistemas biomoleculares tais como proteínas e ácidos nucleicos. As forças não-ligadas requerem o cálculo de interação emparelhadas (*pairwise*) entre átomos. O raio de corte, RC, é usado na maior parte dos métodos comuns. Interações não-ligadas entre átomos além da distância RC não são calculadas ou são calculadas com menos frequência.

Espacialmente, o NAMD paraleliza os cálculos de força de partículas não-ligadas através da divisão do espaço de simulação numa série de cubos. Para aumentar o grau de paralelismo, a decomposição de força é também implementada no NAMD. Com a decomposição de força, um número de objetos computados podem ser criados entre cada par de vizinhos confinados em um cubo. Estes objetos computados, são responsáveis pelo cálculo das forças não-ligadas e são usados computacionalmente e podem ser atribuídos a cada processador. O NAMD permite que o campo de força seja dividido em três partes sobre a sua frequência de variação. Todos os parâmetros ligados tais como ligações, ângulos diedros, impróprios são assumidos como variando rapidamente, enquanto os não-ligados, incluindo as forças eletrostáticas, Lennard Jones dentro de um raio de corte são

considerados para variar de forma lenta enquanto que as contribuições eletrostáticas de longo alcance são consideradas variando de forma mais lenta ainda.<sup>72</sup>

### **3.5 - O *Ensemble* NpT**

O *ensemble* NpT permite simulações usando a pressão, temperatura e número de partículas constantes. A temperatura é mantida através do sistema ser colocado em um banho de aquecimento externo, fixando uma temperatura desejada.<sup>73</sup> O banho é a fonte de energia térmica, que fornece e retira calor do sistema, conforme for necessário. Do mesmo modo, para manter a pressão constante no sistema é acoplado a uma pressão definida. As partículas não são restringidas a entrar ou deixar o sistema. Isto é normalmente realizado através da utilização potencial de contorno ou condições periódicas de contorno.

### **3.6 - O *Ensemble* NVT**

Numa simulação NVT, a energia total não é conservada. Este *ensemble* é imprescindível para a etapa de termalização do sistema, ou seja, aquela fase inicial da simulação em que a estrutura e a dinâmica do sistema precisam ser ajustadas, para corresponder ao estado termodinâmico de interesse. O *ensemble* NVT é também feito em etapas posteriores visando reequilibrar o sistema ao estado termodinâmico desejado. Simulações neste *ensemble* são ainda utilizadas para se fazer tratamentos térmicos do sistema, tais como anelamento (*annealing*) de fases sólidas amorfas, e também em estudos de desnaturação térmica de proteínas.<sup>74</sup>

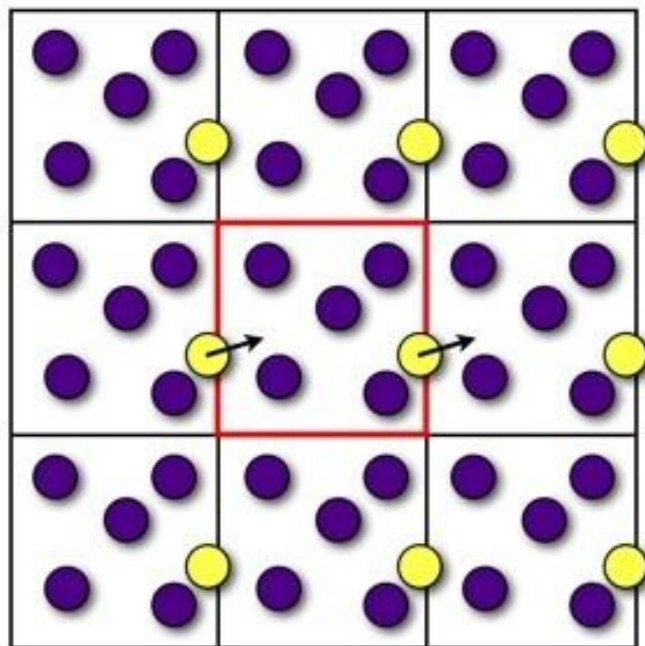


### 3.7–Condições Periódicas de Contorno

Simulações de MD são tipicamente realizadas em caixas retangulares ou caixa octaédricas predefinidas (outras geometrias podem ser usadas). Por conseguinte, um método deve ser utilizado para tratar as interações e comportamento das partículas perto das extremidades da caixa. As condições periódicas de contorno ajudam na simulação de todas as partículas da mesma forma como se fossem no líquido contínuo. A idéia é colocar a caixa de simulação no centro, rodeada por suas repetidas imagens virtuais que formam uma rede infinita virtual. Se uma partícula cruza uma aresta da caixa de simulação, ela entra novamente através da extremidade oposta. Desta forma, as partículas de perto uma face da caixa de "ver" as mais próximas da face oposta. Somente as coordenadas do caixa central são armazenadas durante a simulação.

Para o sistema em estudo onde uma enzima foi colocada próxima a uma superfície modificada do AFM, uma caixa utilizando um raio de corte (RC) de 16 *ångstrons* foi utilizada para representar o sistema. A figura3.3 mostra o sistema simulado bem como as repetidas imagens relativas as condições periódicas de contorno. O protocolo para a MD será descrito detalhadamente nas próximas seções desta tese.

FIGURA 3.3 - Esquema bidimensional de um sistema com suas réplicas periódicas.



Fonte: Reelaborada pelo autor

### 3.8–Acoplamento de Temperatura

Dinâmica molecular em sua mais simples forma é a amostra de um sistema no conjunto microcanônico (NVE), com um número constante de partículas  $N$ , volume constante  $V$ , e a constante de energia total do sistema  $E$ . Para provar em mais comuns condições experimentais, uma pressão constante, temperatura isotérmica - um ensemble com pressão constante ( $NpT$ ) é necessário. A definição de pressão constante e temperatura podem ser simples em simulações de Monte Carlo, mas é mais problemático em simulações de dinâmica molecular.<sup>75</sup> Com efeito uma vai precisar adicionar graus de liberdade utilizados para regular a temperatura para as equações de movimento, de forma a influenciar os graus de liberdade.

### 3.8.1 – Termostato de Langevin para Dinâmica Molecular

Em dinâmica molecular termostato Langevin, é um meio eficaz é representado pela temperatura dependente do termo de ruído e um termo de atrito adicionado às equações de movimento. O termostato de Langevin é freqüentemente utilizado em casos em que os graus de liberdade de solventes não são explicitamente modelados. Em vez disso, um "fundo" solvente é assumido, que faz com que as acelerações aleatórias e fricção nos soluta explicitamente modelada. As acelerações aleatórias são explicitadas por uma força estocástica, a fricção é aplicada como um termo adicional para as velocidades das partículas.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - m_i \xi_i \frac{dr_i}{dt} + f_i(r_i) + r_i \quad (3.12)$$

Aqui,  $\xi$  é um termo de atrito com a unidade de  $ps^{-1}$ , e  $r$  é a força ruído que depende da temperatura absoluta e do atrito constante. O método do termostato de Langevin gera um *ensemble* canônico NVT definido, um ruído aleatório não irá perturbar as dinâmica do sistema real. Um caso especial do termostato de Langevin é dado por dinâmica Browniana, em que é assumido que, em média, deslocamentos resultantes de força aleatórias. Isto também pode ser descrito como dinâmica superamortecida ou não-inerciais de Langevin<sup>76</sup>

### 3.9–Acoplamento de Pressão

Simulações a pressão constante requerem condições periódicas de contorno. A pressão é controlada pelo ajuste dinâmico do tamanho da célula unitária e reescala todas as coordenadas de todos os átomos (e também aqueles que átomos determinados como fixos) durante a simulação. O programa NAMD

utilizado neste estudo fornece uma simulação a pressão constante usando um método modificado de Nosé-Hoover<sup>75</sup> no qual a dinâmica de Langevin<sup>73</sup> é usada para controlar flutuações no termostato. Este método deveria ser combinado com um método de controle de pressão tal como, a dinâmica de Langevin. A fim de simular o *ensemble* NpT. O NAMD fornece ainda uma simulação de pressão constante usando o método de Berendsen.<sup>73</sup>

### 3.10 – Interações de Longo Alcance (Eletrostático)

Interações de longo alcance formam uma peça complexa nas simulações moleculares, tal como um aumento do raio de corte dentro da qual todos os cálculos são executados será dimensionado com a terceira potência para o número de partículas que necessitam de ser calculadas. No entanto, para a distância de corte, valores fisicamente elevados para a derivada do potencial estão presentes, o que será especialmente problemático quando a distância de corte é relativamente baixa. Isso leva não só a uma superestimação das forças no sistema, mas também prejudica a conservação de energia no sistema. Soluções comuns para este problema são baseadas em dois métodos populares: campo de reação eletrostático<sup>77</sup> ou soma de Ewald.<sup>78</sup>

#### 3.10.1 – Campo de Reação Eletrostático

Na reação de campo de reação eletrostático,<sup>77</sup> a interação coulômbica pode ser modificada para sistemas homogêneos assumindo uma constante dielétrica além do raio de corte  $r_c$ . O ambiente fora deste raio é modelado como um contínuo dielétrico com constante dielétrica  $\epsilon_{rc}$ . O potencial eletrostático ( $V_{crf}$ ) é descrito como:

$$V_{c_{rf}} = \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \left[ 1 + \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \frac{r_{ij}^3}{r_c^3} \right] - f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_c} \frac{3\epsilon_{rf}}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \quad (3.13)$$

Sendo  $r_c$  o raio de corte,  $\epsilon_r$  a constante dielétrica,  $\epsilon_{rf}$  a constante dielétrica fora do raio de corte.

### 3.10.2 –Soma de Ewald

O tratamento eletrostático com soma de Ewald, originalmente desenvolvido para o cálculo em cristais,<sup>79</sup> é um método bem conhecido para os sistemas periódicos estudados em dinâmica molecular.<sup>80,81</sup> Baseia-se uma representação eletrostática de um sistema de cargas pontuais coulômbica  $q$ . Para um tal sistema de cargas pontuais  $N$  o total da energia eletrostática pode ser expressa como:

$$E = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N \sum'_{n \in \mathbb{Z}^3} \frac{q_i q_j}{r_{ij} \ln L} \quad (3.14)$$

O apóstrofo 'na soma de imagens periódicas  $n$  indica que a auto interação da partícula,  $i = j$ , que deve ser ignorada quando  $i$  e  $j$  estão na mesma imagem periódica ( $n = 0$ ) O termo  $L$  representa as dimensões xyz da caixa de simulação. Devido à convergência lenta da interação eletrostática na equação 3.14, o cálculo é dividido em duas partes. O raciocínio pode ser visualizado pela seguinte expressão:

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1-f(r)}{r} \quad (3.15)$$

A primeira parte do lado direito é um potencial de interação de Coulomb dentro de um determinado raio de corte. Além do raio de corte desta função será insignificante ou nula. A segunda parte do lado direito será uma

função de variação lenta de todo  $r$  distâncias, e foi otimizado para ser representado por uma transformada de Fourier.

### 3.11 - Dinâmica Molecular Direcional (*Steered Molecular Dynamics* - SMD)

As simulações *de Steered Molecular Dynamics* (SMD), ou simulações de sonda de força, aplicam forças a uma proteína, a fim de manipular sua estrutura, forçando modificações de graus liberdade previamente escolhidos. Estas experiências podem ser conduzidas para induzir alterações estruturais em proteínas ao nível atômico, sendo frequentemente usada para simular deformações mecânicas na estrutura.<sup>82</sup>

Existem dois protocolos típicos de SMD: uma na qual a velocidade para puxar seja constante, e uma em que a força aplicada é constante. Tipicamente, uma parte do sistema em estudo (por exemplo, um átomo de uma proteína) é retido por um potencial harmônico. As forças são, em seguida, aplicado a átomos com velocidade constante específica ou uma força constante. O método de *umbrella-sampling* é utilizado para mover o sistema ao longo da coordenada de reação desejada, variando, por exemplo, as forças, distâncias e ângulos manipulados na simulação. Por meio do método de *umbrella-sampling*, todas as configurações do sistema, tanto de alta energia e de baixa energia são adequadamente amostradas. Então, em cada mudança de configuração a energia livre pode ser calculada obtendo-se o potencial de força média (PMF) ao longo de uma coordenada previamente estabelecida.<sup>83-85</sup>

## 3.12 - Análise da Trajetória

### 3.12.1 - Critério para Ligação de Hidrogênio

Uma ligação de hidrogênio é um tipo de força intermolecular atrativa que ocorre entre duas cargas elétricas parciais de polaridade opostas. Os critérios para ligação de hidrogênio utilizados neste estudo são: 3,5 Å para a distância para o raio de corte entre os átomos doador e acceptor, e 30° para o ângulo entre centros de referência escolhidos no doador e no acceptor.<sup>86</sup>

### 3.12.2 - Cálculos de Energia Eletrostática e de van der Waals

Para os cálculos de energia eletrostática e de van der Waals uma interface do programa NAMD Energy (*plugin*) implementado no programa VMD foi utilizado ao longo da trajetória de dinâmica molecular do sistema apresentado. O *plugin* NAMD Energy fornece tanto uma interface gráfica quanto uma interface de comandos para avaliar as energias usando o NAMD. Com uma seleção prévia das entidades moleculares que se deseja avaliar a energia em cada quadro da dinâmica, é possível se estabelecer graficamente como se dá a interação de duas espécies durante a trajetória de simulação. A nomenclatura utilizada para este fim segue a mesma sintaxe utilizada no programa VMD<sup>87</sup>.

### 3.12.3 – Cálculos de Área de Superfície de Contato

Para os cálculos de área de superfície de contato o *plugin* MolSpace foi instalado no programa VMD e utilizado para mapear o cálculo da área exposta de uma estrutura química ao solvente e/ou a uma outra estrutura química. Esta facilidade é particularmente útil para caracterizar a proteína, os complexos de

ligante-proteína ou mesmo interfaces da proteína. O algoritmo de volume pode ser utilizado para prever o espaço ocupado por uma estrutura química bem como o volume de cavidades, tais como túneis, fendas, etc. Este software é o mais recente desenvolvido pelo Grupo de Bioquímica Computacional (CBC), pertencente ao Instituto de Pesquisa e REQUIMTE da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em Portugal. Este pacote é um *plugin* do software de visualização VMD.

### 3.12.4 – RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

O RMSD (do inglês, *root mean square deviation*) calcula o desvio padrão médio quadrático para todos os átomos da proteína. O RMSD pode ser calculado pela fórmula abaixo:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.16)$$

$$M = \sum_{i=1}^N m_i \quad (3.17)$$

Onde  $r_i(t_1)$  e  $r_i(t_2)$  são as posições do átomo  $i$ , respectivamente, nos tempos  $t_1$  e  $t_2$ ;  $m_i$  é a massa do átomo  $i$ ;  $M$  é o somatório da massa de todos os átomos da molécula.



## 4 – Resultados

### 4.1 – Etapa 1: Criação do Modelo da Superfície Funcionalizada do AFM para Simulação com Dinâmica Molecular

Nesta seção, será apresentado o modelo computacional de ponta funcionalizada, para avaliação das posições energeticamente favoráveis da enzima para imobilização. A enzima ACCase foi colocada a uma distância de 5 Å acima da superfície modelo. O modelo proposto pode ser usado tanto para representar a ponta do AFM quanto para representar superfície da amostra analisada, uma vez que para ambos os sistemas o mesmo reagente é empregado. Para obter as condições iniciais da simulação do sistema, com dinâmica molecular, um modelo de forma quadrada da superfície do AFM foi proposto, de acordo com a figura 4.1. Esta enzima é composta de 1655 resíduos (23150 átomos), os quais os resíduos incompletos foram reconstruídos de acordo com os procedimentos descritos por Franca *et al.*<sup>20</sup>. O sistema ACCase-AES foi imerso em uma caixa contendo 47.732 moléculas de água do tipo tip3p<sup>88</sup> e 30 Na<sup>+</sup> contra íons foram adicionados. O sistema final está resumido na tabela 4.1.

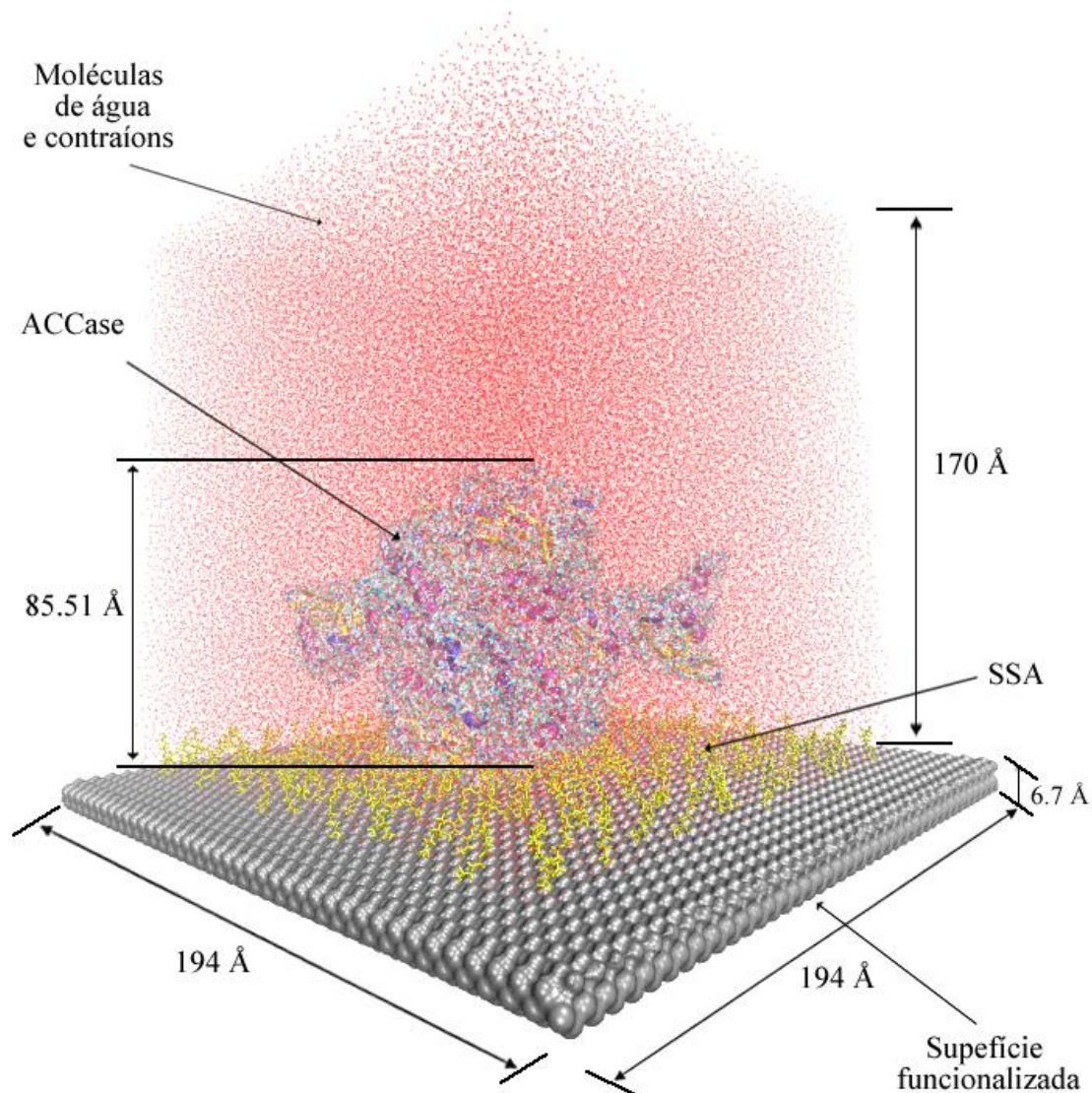
Tabela 4.1 - Número de partículas (N) de cada componente do sistema.

<b>Componente</b>	<b>N</b>
AES	6.076
Enzima	23.150
Tip3p água	143.196 (47.732)
Na <sup>+</sup> contra-íons	30
Total	172.451

A simulação de dinâmica molecular foi feita usando o programa NAMD 2.7<sup>64</sup> com o seguinte protocolo:

1. raio de corte de 16.0 Å foi usado para interações eletrostáticas e de van der Waals e as contribuições de longa distância para energia incluem o método *particle mesh* Ewald (PME);<sup>80</sup>
2. depois do ajuste de volume a 1.0 atm por um pistão de Langevin<sup>89</sup> a dinâmica foi feita em um *ensemble* NVT a 310 K e 1.0 atm durante 1 ns, e a temperatura foi controlada usando um termostato de Langevin;
3. depois do passo (2) uma trajetória de 20 ns para equilíbrio no *ensemble* NpT foi obtida;
4. valores médios foram obtidos no equilíbrio com o *ensemble* NVT usando os últimos 10 ns de uma trajetória de 30 ns gerada após o passo (3). Os resultados foram analisados com os programas VMD e XMGRACE.<sup>90</sup>

FIGURA 4.1 - Modelo proposto da superfície da ponta de AFM modificada pelo agente espaçador AES distribuído ao longo da superfície de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (ponta do AFM). A representação foi obtida com o programa VMD



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.1.1 - Obtenção dos Parâmetros de Campo de Força para Simulação do Sistema

Para a simulação de dinâmica molecular usando um campo de força clássico, a energia total do é dividida em dois termos o  $E^{intra}$  e o  $E^{inter}$ . A energia de interação  $E^{intra}$  é definida da seguinte maneira:

$$E^{\text{intra}} = E^{\text{esti}} + E^{\text{ang}} + E^{\text{torc}} + E^{\text{nL}} \quad (4.1)$$

Os primeiros três termos referenciam a uma expressão harmônica (estiramento, ângulo, e rotação de diedros próprios e impróprios)

$$\begin{aligned} E^{\text{ligação}} &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_s} k_{\mu}^s (r_{\mu} - r_{\mu}^0)^2; & E^{\text{ângulo}} &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_b} k_{\mu}^b (\theta_{\mu} - \theta_{\mu}^0)^2; & E^{\text{torção}} &= \\ & & & & \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_{\text{Rt}}} k_{\mu}^t (\phi_{\mu} - \phi_{\mu}^0)^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

onde,  $k_{\mu}^s$ ,  $k_{\mu}^b$ ,  $k_{\mu}^t$  and  $r_{\mu}^0$ ,  $\theta_{\mu}^0$ ,  $\phi_{\mu}^0$  são a constante de força e valores de equilíbrio para ligação, ângulo e ângulos de torção respectivamente. O termo  $E^{\text{torc}}$  é o termo de contribuição de um diedro flexível  $\Psi$ . Para o campo de força OPLS-AA os cinco termos da função de Ryckaert-Bellemans (RB)<sup>91</sup> foram calculados com os dados da curva obtida dos cálculos quânticos de escaneamento de diedros pela seguinte equação:

$$E^{\text{torc}} = \sum_{n=0}^5 C_n (\cos(\Psi))^n \quad (4.3)$$

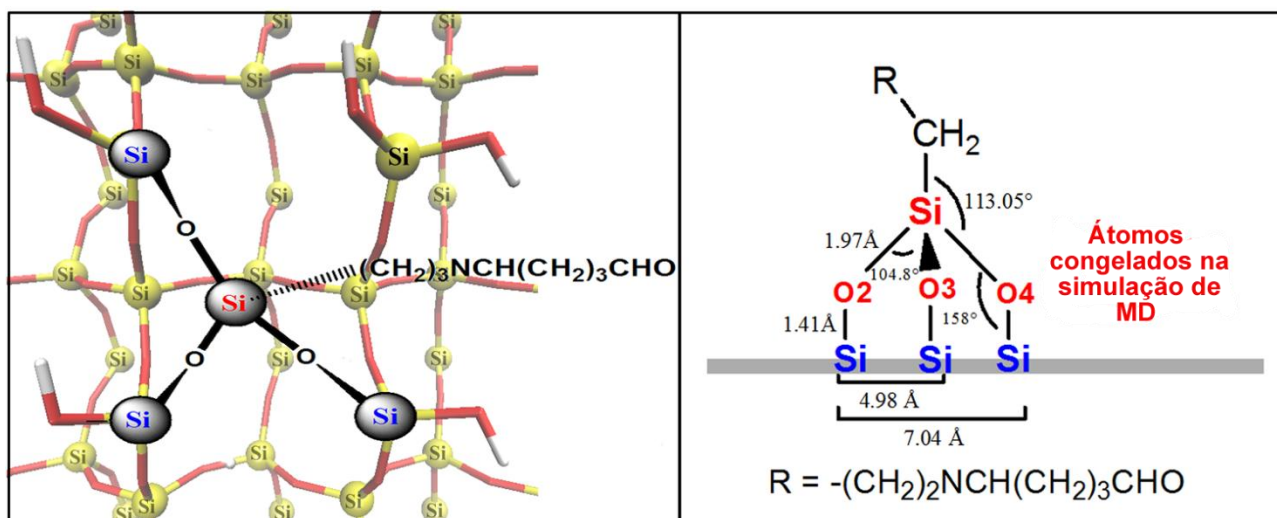
E os termos  $C_n$  são geralmente obtidos através de uma curva de energia do monitoramento dos ângulos diedros. No caso do sistema em estudo a maioria dos parâmetros de potencial definidos acima foi encontrados e estão disponíveis no campo de força OPLS-AA. Para campo de força CHARMM estes parâmetros não foram utilizados. As geometrias e os resultados calculados de energia com o programa ORCA<sup>92</sup> com a metodologia HF/6-31g\* e estão apresentados nas tabelas 4.2 a 4.4.

Na equação 4.1,  $E^{\text{nb}}$  representa as interações não-ligadas definidas pela soma padrão 12-6 do potencial de Lennard-Jones ( $E^{\text{LJ}}$ ) e uma interação carga-carga ( $E^{\text{Coul}}$ ). Usando um campo de força apropriado, a contribuição das interações intermoleculares ( $E^{\text{inter}}$ ) para a energia total é também definida como a soma dos termos de  $E^{\text{nL}}$ .

Alguns parâmetros já implementados para outras moléculas foram tirados dos campos de força CHARMM e OPLSAA. As cargas requeridas para calcular as interações coulombianas foram obtidas utilizando o método RESP implementado no programa NWChem.<sup>93</sup> Os resultados obtidos com a metodologia quântica HF/6-31g\* estão apresentados nas tabelas 4.1-4. O mesmo procedimento foi usado para criar as curvas de energia potencial, de acordo com Kirschner et.al.<sup>94</sup> As otimizações com restrições foram feitas especificando uma coordenada interna para manter imóvel os átomos ligados a superfície enquanto que os outros átomos não tiveram restrições quanto aos graus de liberdade.

Os parâmetros de campo de força necessários para executar a dinâmica molecular do sistema estudado foram calculados. Para isso, foram implementados ao campo de força CHARMM27 os dados obtidos dos cálculos quânticos. As constantes de força de distâncias de ligação, ângulos de ligação, e ângulos diedros, necessários na equação 4.2 foram calculados e são apresentados nas tabelas 4.2 á 4.4 para o modelo AES. Como discutido anteriormente, os cálculos quânticos foram realizados utilizando o programa ORCA com a metodologia HF/6-31g\*. As constantes de força obtidas, foram aproveitadas no campo de força OPLS-AA, o qual utiliza a equação de Ryckaert-Bellemans<sup>91</sup> com o programa GROMACS<sup>65</sup>, porém para os dados apresentados nesta tese se referindo a superfície AES interagindo com a enzima ACCase foram utilizado o programa NAMD com o campo de força CHARMM27. O desvio padrão entre as curvas de energia calculadas e os valores obtidos foi de 0,05 kcal.mol<sup>-1</sup>. A figura 4.2 mostra a densidade eletrônica da molécula do agente espaçador - AES bem como a numeração de acordo com os dados de campo de força apresentados nas tabelas 4.2-4.

FIGURA 4.2 - Átomos numerados do modelo AES na qual a densidade eletrônica é mostrada através do potencial eletrostático. Os átomos são coloridos como segue: oxigênio em vermelho, silício em amarelo, carbono em azul, nitrogênio em azul escuro e hidrogênio em cor branca.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4.2 - Distância de ligação  $r_{\mu}^0$  Å, e constante de força  $k_{\mu}^s$  para o modelo AES mostrado na figura 4.2.

Ligação(r)	$k_{\mu}^s$ kcal. mol <sup>-1</sup> Å <sup>2</sup>	$r_{\mu}^0$ Å
C8-Si	306.432	1.5080
Si-O	363.214	1.4180

Tabela 4.3 - Ângulos de ligação  $\theta_{\mu}^0$  e constante de força  $k_{\mu}^b$  para o modelo AES mostrado na figura 4.2.

Ângulo ( $\theta$ )	$k_{\mu}^b$ kcal. mol <sup>-1</sup> rad <sup>-2</sup>	$\theta_{\mu}^0/c$
C8-Si-O	418.400	108.000
C7-C8-Si	488.273	112.700
Si-C8-H8	313.800	110.700

TABELA 4.4 - Ângulos diedros  $\phi_{\mu}^0$  e constante de força  $k_{\mu}^t$  para o modelo AES mostrado na figura 4.2.

Dihedral ( $\phi$ )	$k_{\mu}^t$ kcal. mol <sup>-1</sup>	Número	$\phi_{\mu}^0$
O1- Si-O2-H	0.7440	1	0.0000
	-1.700	2	180.00
	-0.1600	3	0.0000
C7-C8-Si-O	-0.344	1	0.0000
	0.878	2	180.00
	0.238	3	0.0000
H8-C8-Si-O	-0.327	1	0.0000
	0.536	2	180.00
	0.140	3	0.0000
C8-Si-O-H	0.135	1	180.00
	0.118	2	0.0000
C6-C7-C8-Si	0.051	1	0.0000
	0.341	2	180.00
	0.166	3	0.0000
C3-C4-C5-N	0.200	2	180.00
	0.150	3	0.0000
H7-C7-C6-N	0.200	2	180.00
	0.150	3	0.0000
C5-N-C6-H6	0.102	1	0.0000
	-0.168	2	180.00
	-0.176	3	0.0000
H5-C5-N-C6	0.344	1	0.0000
	8.076	2	180.00
	0.447	3	0.0000

\* Note que os valores de ângulos diedros no equilíbrio para os átomos de Silício são de 180°, independente de suas posições na superfície.

Uma vez que para a simulação do sistema proposto as interações da superfície AES com a enzima ACCase foi priorizada, a análise da superfície da ponta oxidada do AFM não foram levadas em conta neste trabalho, porém em um estudo posterior, estas interações poderão ser reconsideradas. Aos átomos de oxigênio O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e O<sub>4</sub>, bem como seus respectivos átomos de hidrogênio ligados, representados na figura 4.2, foram aplicadas restrições de posição, por imposição de constantes de força de valor elevado em comparação com as constantes

normais de uma simulação por dinâmica molecular. Com isso, o número de átomos do sistema simulado diminuiu consideravelmente.

#### **4.1.2 - Validação do Modelo Proposto**

A validação do modelo computacional proposto de ponta de AFM funcionalizada não foi comparada com grandezas experimentais representativas do sistema físico real, porém, este modelo foi comparado com trabalhos semelhantes relatados na literatura<sup>10,95,96</sup> que exploram o tema desta tese de forma semelhante.

As simulações computacionais utilizam campos de força, que são conjuntos de parâmetros que ao serem inseridos em uma equação analítica fornecem um potencial em função das coordenadas de todos os átomos do sistema. Desta forma ao se utilizar algoritmos adequados para gerar a evolução das coordenadas atômicas, cria-se um vínculo entre a simulação e o formalismo da Mecânica Estatística, permitindo que se calculem as propriedades macroscópicas do sistema.

Quando os parâmetros de campo de força não podem ser validados através dos dados termoquímicos, tais como, densidades e volumes molares e energia de coesão, estes parâmetros podem ser validados em parte por dados espectroscópicos e de espalhamento, que contém grande quantidade de interações intermoleculares e de informações estruturais de moléculas individuais. Podem ser usados em alguns casos, cálculos quânticos ab initio na parametrização, principalmente para se determinar a geometria de equilíbrio e as cargas atômicas. No entanto, deve-se sempre testar a validade da parametrização nas situações específicas de cada simulação.

O campo de força CHARMM<sup>35</sup> foi utilizado na maioria das simulações descritas nesta tese. Para a simulação utilizando a dinâmica molecular



direcionada, foi utilizado o campo de força OPLS-AA<sup>70</sup>. Tanto o campo de força CHARMM como o OPLS-AA têm como principal característica o uso de grupos funcionais transferíveis, ou seja, de grupamentos de átomos que conservam seus parâmetros de interação em diferentes ambientes químicos.

A seguir serão apresentados os resultados da simulação do sistema em estudo utilizando dinâmica molecular no qual uma superfície formada pelo agente espaçante nomeado de AES é colocada de forma alinhada em uma superfície rígida de nitreto de silício (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) representando a ponta funcionalizada do AFM. Primeiramente um estudo da orientação molecular da enzima ACCase foi abordada para adsorção enzimática. A partir deste estudo inicial, as outras análises foram decorridas.

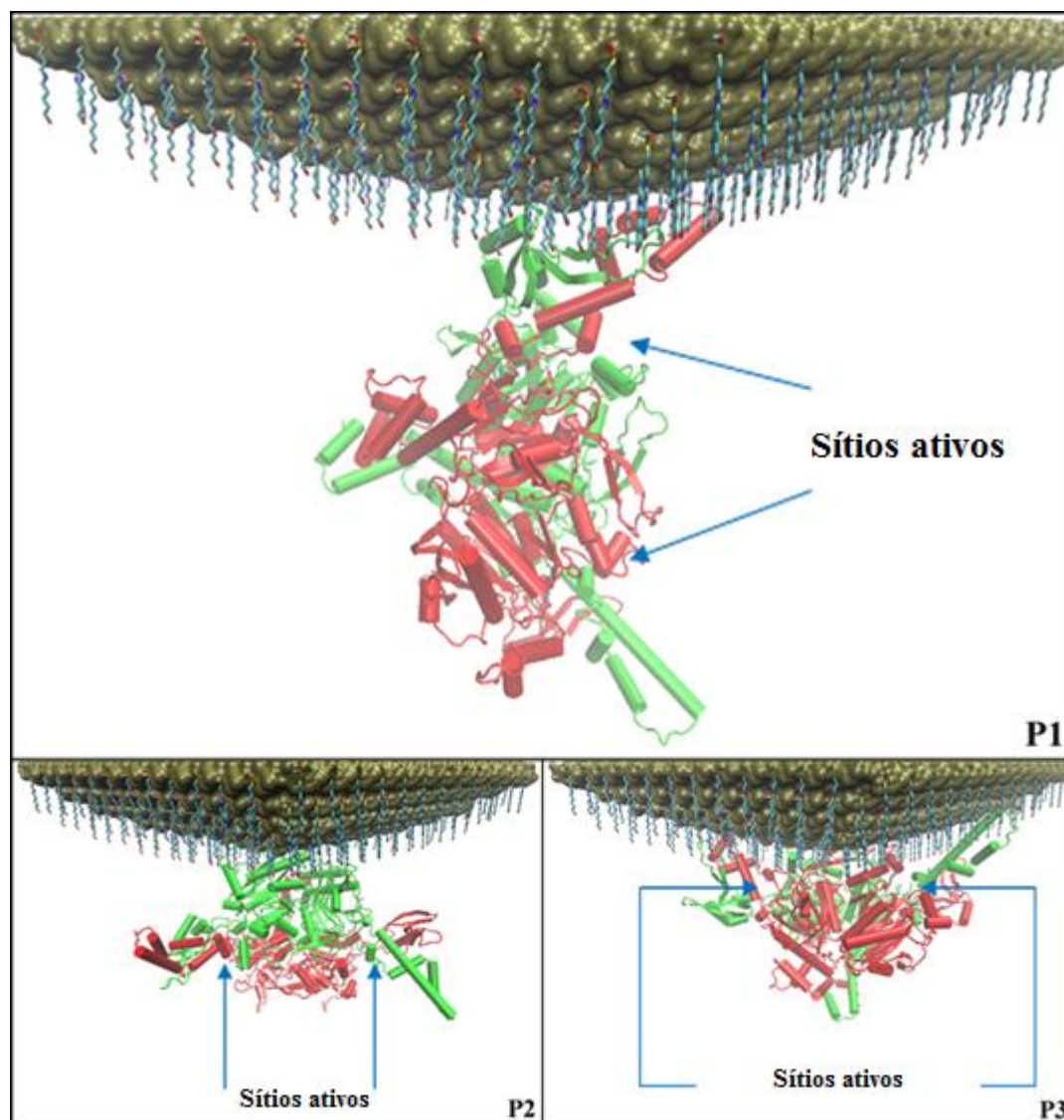
#### **4.1.3 – Escolha da Orientação Inicial da Enzima no Modelo Proposto**

Na figura 4.3, três posições foram consideradas para a adsorção da enzima ACCase na superfície AES. A orientação favorável da enzima exige uma energia de superfície de contato que garanta uma forte adsorção na AES mas deixe os sítios ativos desbloqueados para interagir com o substrato. Das análises feitas com as ferramentas do VMD a área de superfície de contato para as 3 posições sugeridas são em ordem crescente:  $A(P1) \cong 2623,47 \text{ \AA}^2$ ,  $A(P2) \cong 5000,25 \text{ \AA}^2$  e  $A(P3) \cong 9825,23 \text{ \AA}^2$ . A posição P3 tem uma ótima área de adsorção, porém nesta posição os sítios ativos da enzima estão desfavorecidos para interações posteriores com o substrato, apesar de um sítio ativo estar desbloqueado. Como a superfície de contato de P2 é maior que a de P1, e os sítios ativos de P1 estarem geometricamente assimétricos, a P2 foi escolhida como coordenada inicial para as análises de dinâmica molecular.

Esta configuração inicial possui fortes interações eletrostáticas entre superfície e a enzima. Isso permitiu a estudar a adsorção em tempos de simulação razoáveis (~ 50 ns). Foram efetuadas simulações teste, com a enzima orientada a cerca de 5 Å acima da superfície, utilizando uma estrutura pré-equilibrada.

A dinâmica molecular do sistema foi realizada conforme o protocolo apresentado na metodologia. No processo de equilíbrio a enzima foi forçada em direção a superfície usando um protocolo implementado no programa NAMD que usa a metodologia *Steered Molecular Dynamics* (SMD) para movimentar uma determinada substância do sistema. Neste procedimento, uma aceleração constante de  $0,001 \text{ \AA} \cdot \text{ps}^{-2}$  (0.13896 pN) foi utilizada até o primeiro aminoácido da enzima estar a uma distância de 5 Å de AES. Então, uma simulação usando NpT ensemble de 20 ns foi realizada para equilibrar o sistema. Depois deste processo de equilíbrio, outra simulação utilizando as coordenadas do ultimo quadro da anterior foi feita durante 30 ns para análise do comportamento do sistema. A energia relacionada a estas simulações pode ser vista na figura 4.4. Podemos observar que depois de 20 ns a energia total do sistema é quase constante e está em concordância com um cálculo no *ensemble* NVT.

FIGURA 4.3 - Representação esquemática da ligação da enzima ACCase na superfície AES com diferentes orientações. Enzima ACCase é representada no modelo dos desenhos usando o programa VMD. Os sítios ativos situam-se entre as cadeias de vermelho e verde, e são indicadas pelas setas azuis.

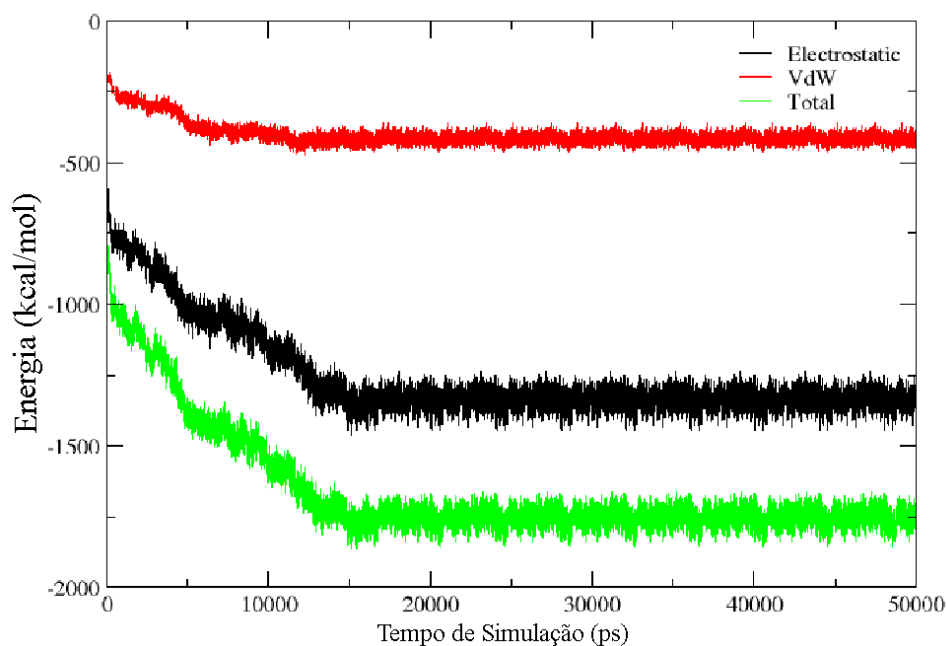


Fonte: Elaborada pelo autor

Os dados de dinâmica molecular só foram avaliados após a minimização/equilíbrio do sistema. Para esta finalidade uma trajetória de 50 ns foi gerada até garantir que a energia do sistema estivesse totalmente equilibrada. A figura 4.4, mostra que o sistema atingiu o equilíbrio após 15 ns, a uma temperatura

de 310 K e pressão 1 atm. A temperatura de 310 K foi escolhida, pois a ACCase tem sua atividade enzimática a temperaturas superiores a ambiente<sup>97</sup>.

FIGURA 4.4 - Energia eletrostática, energia de van der Waals e energias totais envolvidas durante os 50 ns de simulação entre enzima e a superfície. Depois de 15 ns as energias do sistema estabilizaram na seguinte média: eletrostática = -306,46 kcal.mol<sup>-1</sup>; van der Waals = -417,68 kcal.mol<sup>-1</sup> e energia total = -1724,15 kcal.mol<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborada pelo autor

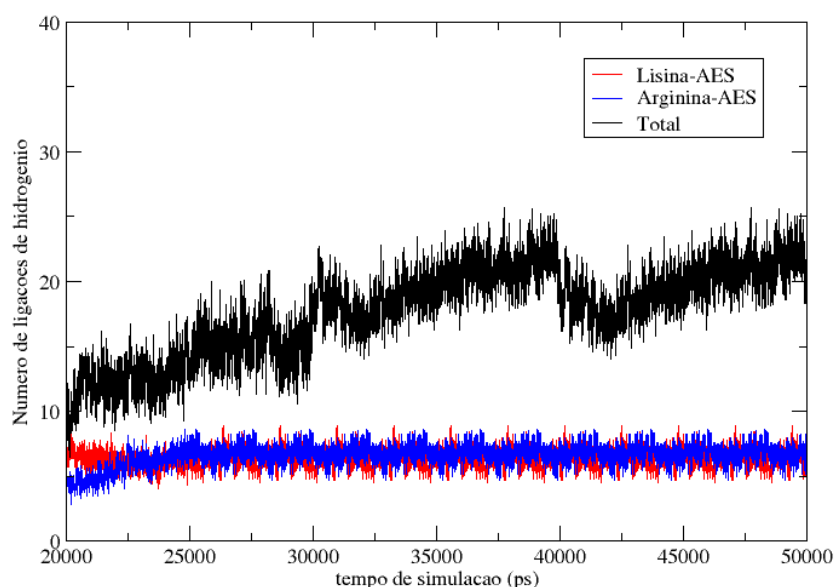
Usando os últimos 10 ns da trajetória simulada, alguns parâmetros foram analisadas para obter uma compreensão da dinâmica comportamental do sistema. A análise das possíveis ligações de hidrogênio entre a enzima ACCase e a AES, devido a fatores de distância e ângulo, foram obtidas monitorando as interações dos grupos enzimáticos ARG-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> e LYS-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> com o grupo aldeído O=C-H do AES em função do tempo e os resultados obtidos estão mostrados na figura 4.5. A população de ligações de hidrogênio foi calculada usando regras geométricas implementadas no programa VMD, mas usando as considerações estruturais propostas por Torshin et al.<sup>86</sup>

Na figura 4.5 as análises de ligações de hidrogênio (*h-bonds*)

mostraram que uma média de 18 *h-bonds* entre a enzima e a AES de trajetória, e como esperada, as contribuições para este tipo de interação foram em sua maior parte com os grupos aminoácidos arginina e lisina. Podemos observar que as melhores condições de adsorção em função do tempo estão em concordância com o aumento da área de superfície de contato.

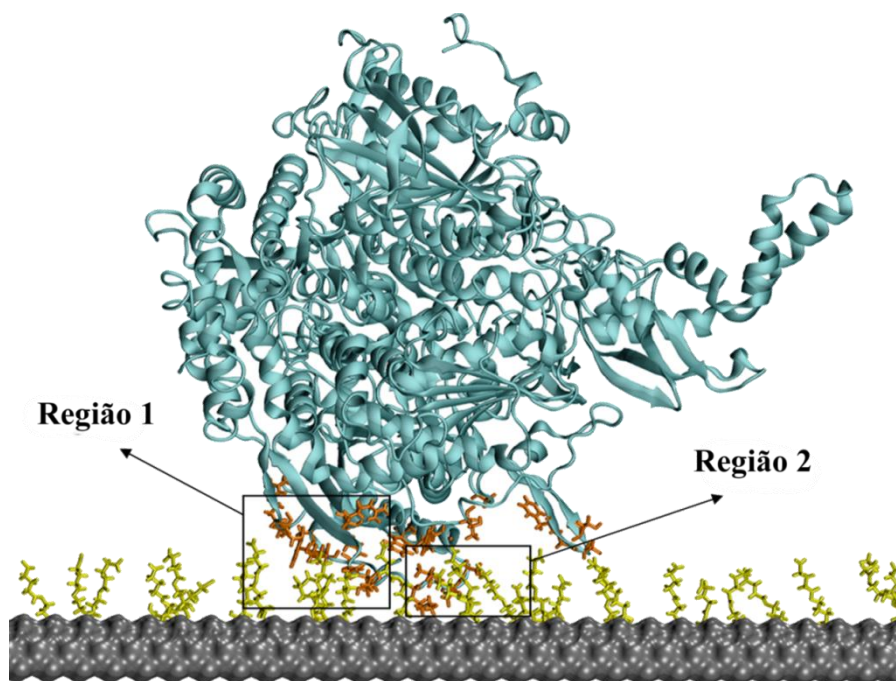
A interação da enzima ACCase com a superfície AES como uma função do tempo, é ainda mostrada na figura 4.6 e 4.7. Observa-se melhores condições de adsorção em função do tempo de acordo com o aumento da área de contato de superfície. Uma energia média de área de superfície de contato de  $-88,9546 \text{ kcal/mol/A}^2$  (região 1) e  $-102,80 \text{ kcal/mol/A}^2$  (região 2) foi obtida em comparando-se com as energias iniciais de  $-52,42$  e  $-89,23 \text{ kcal/mol/A}^2$  e  $\text{kcal/mol/A}^2$  respectivamente. Um aumento evidente na energia de interação foi detectado, mas os sítios ativos da enzima permaneceram desbloqueados para interações com as moléculas do substrato.

FIGURA 4.5 - Monitoramento das ligações de hidrogênio nos últimos 30 ns de simulação. As médias encontradas foram de 18 ligações para ligações totais, sendo que as maiores contribuições foram da superfície interagindo com os aminoácidos arginina e lisina,  $\sim 6.5$  e  $\sim 7$  ligações de hidrogênio, respectivamente.



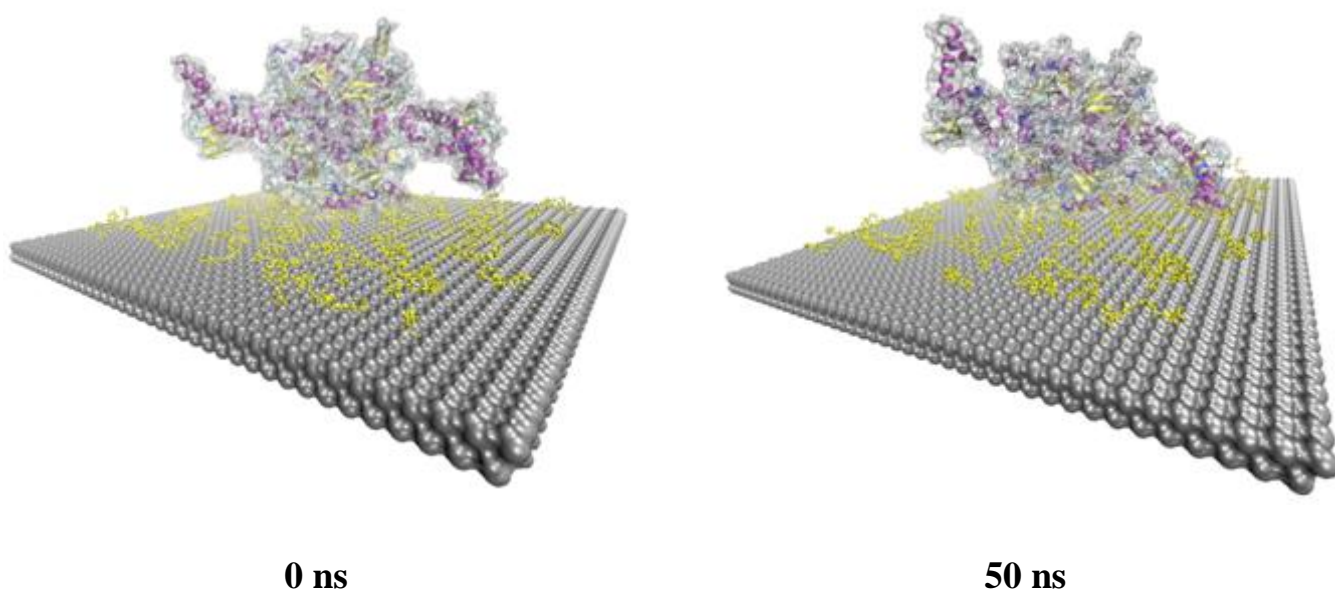
Fonte: Elaborada pelo autor

FIGURA 4.6 - Regiões 1 e 2 de direta interação da enzima ACCase com a superfície AES utilizando o programa VMD. Em laranja são os aminoácidos interagindo com a superfície modificada com AES (em amarelo).



Fonte: Elaborada pelo autor

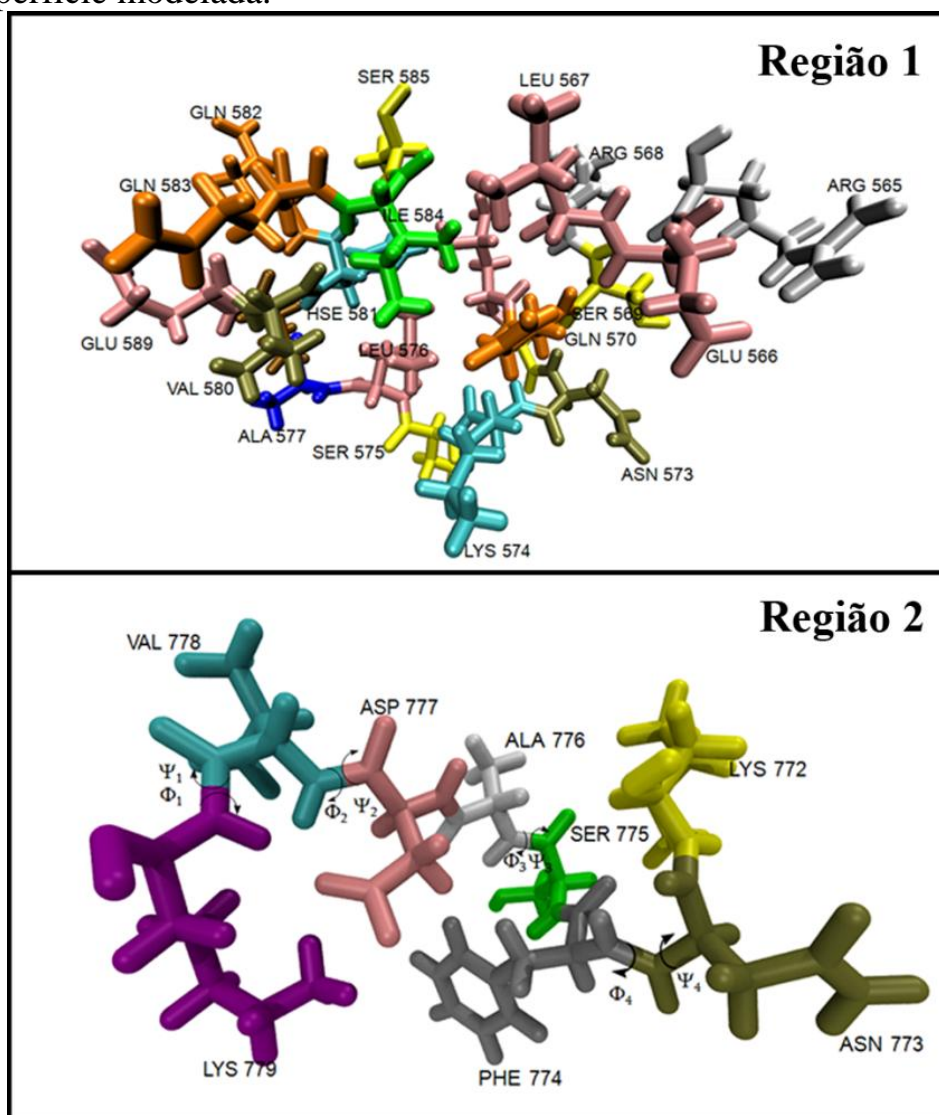
FIGURA 4.7 – A mobilidade estrutural da enzima ACCase após 50 ns de simulação MD. Moléculas de água não foram apresentadas na representação.



Fonte: Elaborada pelo autor



FIGURA 4.8- Ângulos diedros  $\psi$  e  $\Phi$  monitorados das regiões 1 e 2 em contato com a superfície modelada.

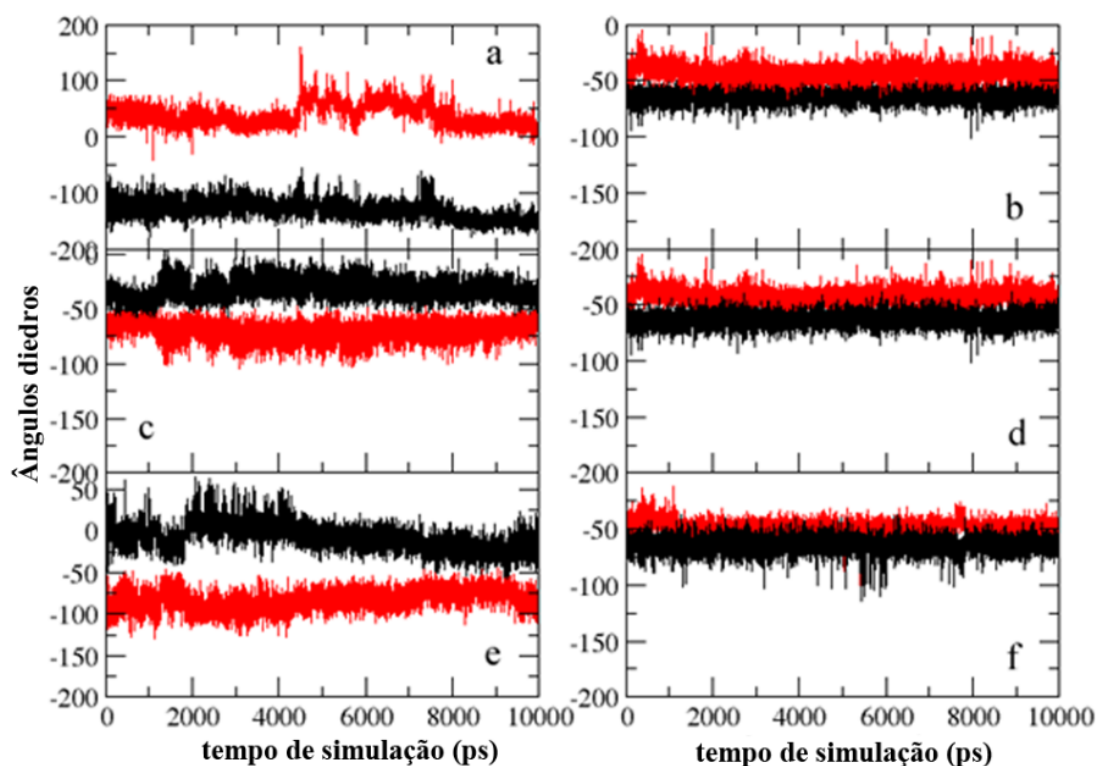


Fonte: Elaborada pelo autor

Outro parâmetro importante monitorado foi à estrutura molecular da enzima em função do tempo para prevenir possível desnaturação. Para fazer esta análise alguns aminoácidos selecionados foram divididos em duas regiões de acordo com as interatividades com a AES (figura 4.8). A região 1 é definida como a região de interação direta com a AES enquanto que a região 2 alcança a interação com a superfície depois de 20 ns. Portanto, a flexibilidade interna das regiões 1 e 2 foram investigadas monitorando os diedros  $\phi$  e  $\Psi$  em função do tempo. Foi esperado mudanças estruturais destas regiões como consequência da

interação entre enzima e AES. No entanto, a distribuição dos ângulos diedros em função do tempo foi quase igual para as duas regiões. A figura 4.9 representa a progressão dos diedros selecionados da região 2 nos últimos 20 ns da trajetória. Nesta última parte (figura 4.9 - *a*, *c* e *e*) os diedros sofreram algumas mudanças devido as poucas ligações de hidrogênio encontradas. Em contrapartida, na última parte, o numero de ligações de hidrogênio foi aumentada (figura 4.9- *b*, *d* e *f*), como resultado, os valores observados foram quase que estáveis.

FIGURA 4.9 - Ângulos diedros selecionados da região 2,  $\phi$  (em vermelho) e  $\Psi$  (em preto). A, C e E representam 10 ns da trajetória, após o equilíbrio, e B, D e F nos últimos 10 ns da trajetória.



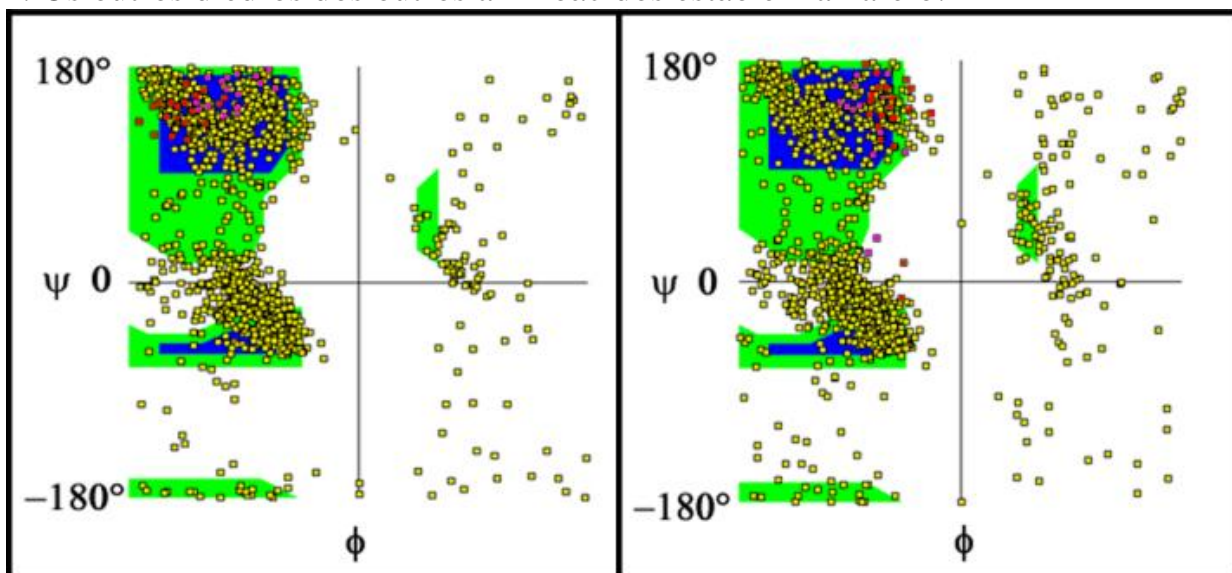
Fonte: Elaborada pelo autor

A estrutura final e inicial da enzima como um todo foi comparada utilizando o diagrama Ramachadran apresentado na figura 4.10. O resultado obtido do gráfico mostrou que nenhuma mudança considerável entre os ângulos diedros  $\phi$  e  $\Psi$  depois de 50 ns de trajetória foi detectada. Portanto a enzima ACCase não sofreu desnaturação devido a interação com a AES. De acordo com Gunsteren, W. F. V et al.<sup>98</sup>, uma simulação mais longa pode ser necessária para



averiguar a estabilidade de enzimas. Portanto, a trajetória continua sendo estendida e novos dados serão analisados no futuro.

FIGURA 4.10 - Diagrama Ramachandran da enzima ACCase após 30 ns de dinâmica molecular. Em vermelho os diedros da região 1 e em magenta da região 2. Os outros diedros dos outros aminoácidos estão em amarelo.



Fonte: Elaborada pelo autor

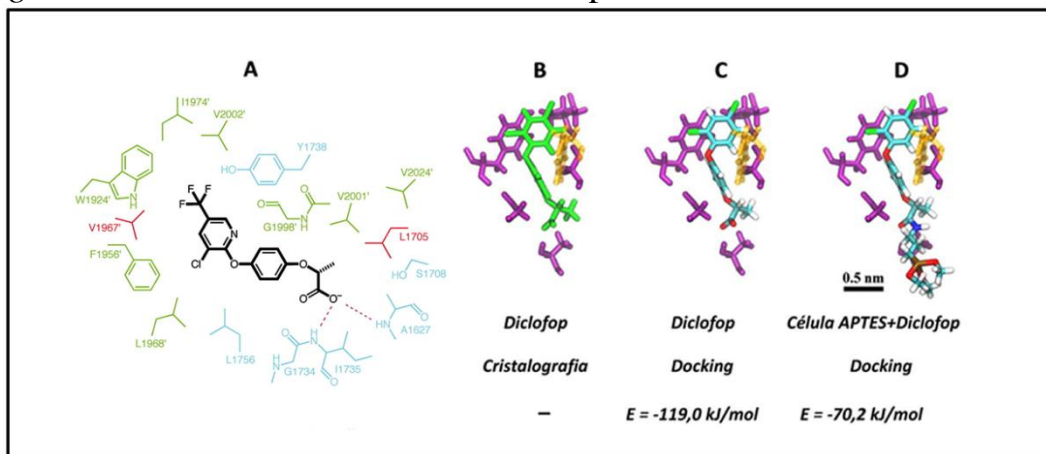
Neste trabalho, foram escolhidos algumas herbicidas comerciais (diclofop, fluazifop e butroxydim para estudos teóricos e diclofop, glifosato e imazaquin para estudos experimentais), para a interação com a ACCase. Na próxima seção serão apresentados os resultados obtidos com estes herbicidas. Métodos analíticos foram propostos para a melhor compreensão dos resultados obtidos e são apresentados na próxima seção desta tese.

## 4.2 – Etapa 2: Cálculos Teóricos de Interação da Enzima com Herbicidas

### 4.2.1 - *Docking* Molecular e Dinâmica Molecular

O diclofop inibe a enzima ACCase reversivelmente bloqueando uma de suas duas entradas ao sítio ativo. O bloqueio acontece de forma que o diclofop se ligue através de forças eletrostáticas e de van der Waals aos resíduos constituintes do sítio ativo, neste caso: Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A, Phe1956B e Ala1627A como mostra a figura 4.11 - A.<sup>41,42</sup> Este processo de inibição foi feito utilizando o método de *docking* Molecular no qual o diclofop foi colocado na região correspondente aos resíduos da (Figura 4.11 - A), também representados na cor violeta nas figuras 4.11 -B, C e D. A figura 4.11-B a qual mostra a melhor conformação e posição do diclofop (em verde) obtida a partir de dados cristalográficos (arquivo PDB referência 1UYR), enquanto as figura 4.11 - C e D mostram as melhores conformações e posições obtidas a partir dos cálculos de *docking* molecular para o diclofop e a célula APTES+diclofop respectivamente.

FIGURA 4.11 - *Docking* molecular do herbicida diclofop (retro-*docking*) e *docking* molecular da célula APTES+Diclofop.



Fonte: Elaborada pelo autor

Para completar os resultados de *docking*, a dinâmica molecular permitiu a obtenção da energia de ligação média considerando a flutuação e mobilidade do sistema proteína-inibidor, no caso do complexo ACC-diclofop e de maneira análoga, o *docking* da Célula APTES+diclofop na enzima ACCase, ambos mostrados na tabela 4.5.

TABELA 4.5 - Energias de interação entre ACCase+diclofop e ACCase+AES+diclofop.

Sistema	Eletrostática	van der Waals	Total (kJ/mol)
ACCcase + diclofop	-316,7	-181,3	-498,0
ACCcase+AES+diclofop	-22,4	-271,0	-293,4

É importante observar que as magnitudes das energias de interação observadas na tabela 4.5 estão abaixo das magnitudes das energias de ligação covalentes, o que garante a enzima não irá se soltar durante a interação específica com o substrato, resultado. Como pode ser observado na tabela 4.5, quando a enzima ACCase interage com o herbicida diclofop a energia é maior em comparação com o sistema ACCase+AES+diclofop {AAD}. Essa diferença pode ser atribuída ao fato do herbicida diclofop possuir maior quantidade de orientações energeticamente mais favoráveis do que quando está ligado à molécula de APTES. A diferença entre as energias eletrostáticas e de van der Waals é mais acentuada quando se trata do sistema {AAD}, essa é da ordem de 12 vezes maior do que a energia eletrostática, e isto se deve principalmente ao volume molecular ocupado pelo conjunto diclofop+APTES. Ao final do processo de interação, um dos oxigênios da carboxila do diclofop fica acessível à solução, enquanto o restante é englobado por uma bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos envolvidos.<sup>41,42</sup> A presença desse oxigênio livre contribuiu para que a célula APTES+diclofop não perdesse a característica de interação, como se pode notar fazendo a comparação entre as energias de ligação entre a célula APTES+diclofop e o inibidor diclofop descritos

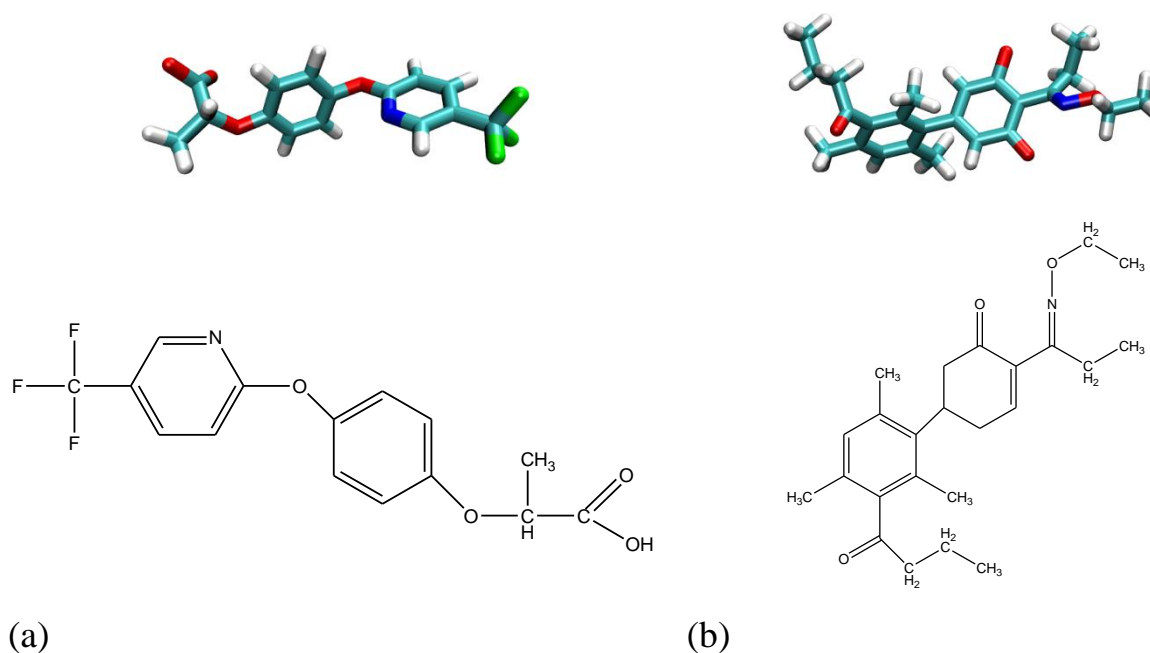
na tabela 4.5. Esse resultado valida a parte correspondente experimental, fornecendo uma comprovação teórica de que é possível fixar o herbicida diclofop na superfície da placa de mica do AFM sem haver perdas em sua capacidade de interação que invalidem a os resultados obtidos experimentalmente.

Para os cálculos de interação enzima e inibidores, foram avaliadas as energias não específicas oriundas das interações dos herbicidas com regiões da ACCase não correspondentes aos dois sítios ativos. O intuito de quantificar estas energias foi de obter uma comparação com as energias do sítio ativo e estabelecer um parâmetro de quantificação das energias específicas (sítio ativo) e não específicas do sistema em estudo.

A figura 4.12 são apresentados dois pesticidas (fluazifop e butroxidim) utilizados neste estudo, os dois são inibidores da atividade enzimática da ACCase. O herbicida fluazifop é da mesma classe do herbicida diclofop (fops) que foi utilizado na parte experimental deste estudo. Tanto o diclofop quanto o fluazifop inibem de forma reversível a ACCase, com isso a enzima pode ser reaproveitada experimentalmente em outras medições. As energias relacionadas ao fluazifop são de grandezas muito próximas as energias calculadas para o diclofop quando o mesmo ocupa o sítio ativo da ACCase.

Através de cálculos de docking molecular estas duas moléculas foram "dockadas" contra a estrutura molecular da ACCase e os clusters formados foram usados como ponto de partida para os cálculos de dinâmica molecular para avaliação das energias de interação do sistema.

FIGURA 4.12 - Estrutura molecular dos dois herbicidas comerciais para os cálculos de *docking* molecular. fluazifop (a) e (b) butroxydim.



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.2.2 – Cálculos de *Docking*

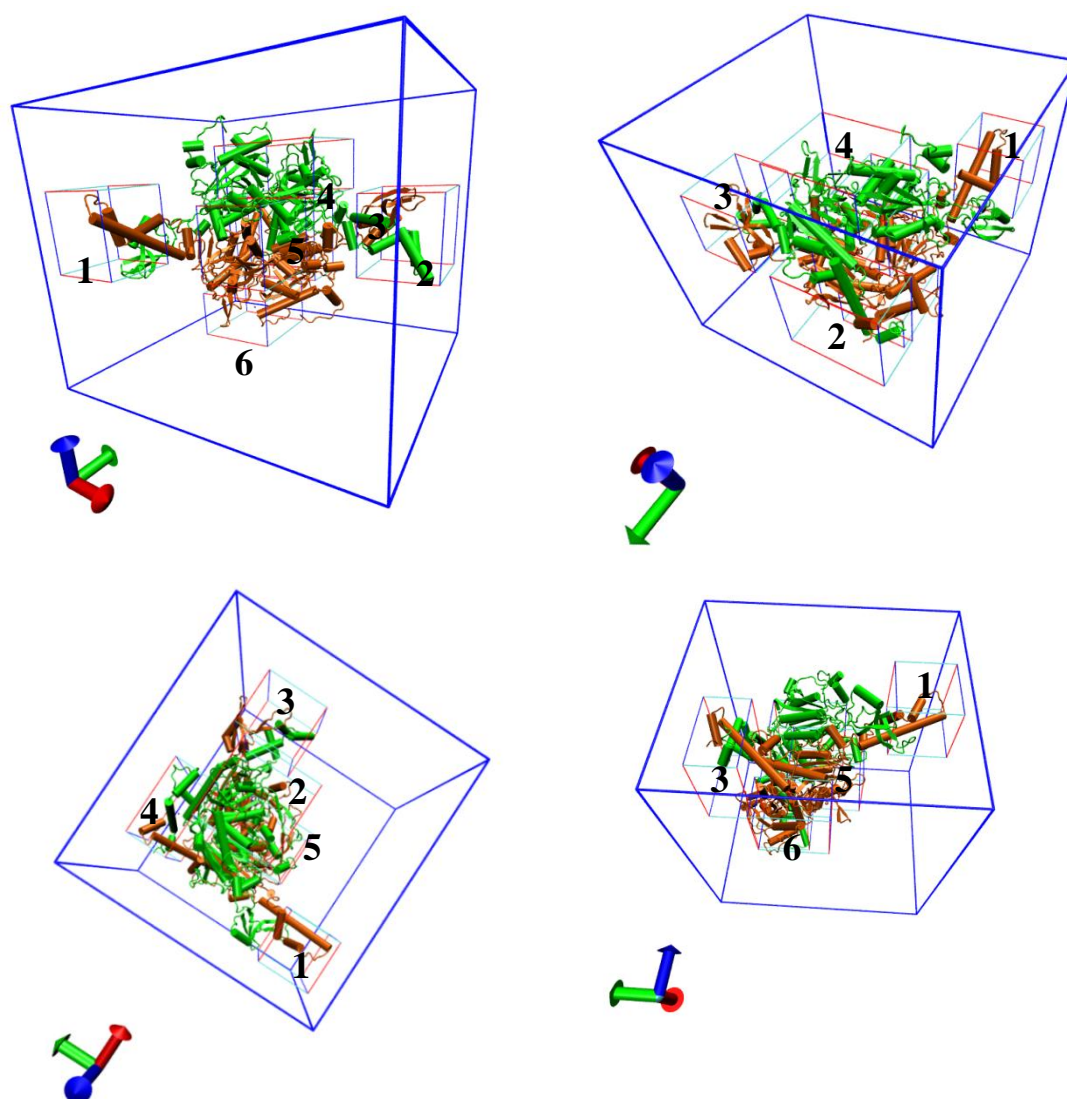
Para os cálculos de *docking* molecular 6 regiões foram destacadas como possíveis regiões de interação da ACCase após a imobilização da enzima na ponta do AFM (figura4.13). O importante de se calcular as energias não específicas é que as mesmas podem mascarar as interações que se deseja avaliar (específicas) e podem servir de linha de base para as medições experimentais das interações sítio ativo-inibidor.

Para o protocolo de execução dos cálculos de *docking* molecular pode ser descrito nos seguintes passos:

- todos os cálculos foram realizados usando o programa AutoDockVina;

- as cargas atribuídas às moléculas de herbicidas (fluazifop e butoxydim) para efetuar cálculos de docking foram baseados no formalismo de cargas parciais de Gasteiger-Huckel;<sup>99</sup>
- um *grid* 3D foi criado pelo algoritmo AutoGrid (um subprograma do AutoDock) para avaliar as energias de ligação com 100 poses diferentes;
- o algoritmo genético de Lamarck foi empregado para pesquisar o espaço cartesiano e conformacional na do *grid* de encaixe;
- os critérios para a escolha de conjuntos de estruturas ancoradas foram baseadas em energias mais baixas totais e um *root mean square deviation* (RMSD) de 5 Å.

FIGURA 4.13 - Regiões utilizadas para os cálculos de docking. Seis grids foram feitos na enzima para avaliação da energia de interação



### 4.2.3 – Dinâmica Molecular do Sistema Enzima-Inibidor

Para as simulações de dinâmica, a topologia das estruturas moleculares dos herbicidas fluazifop e butoxydim com o campo de força CHARMM27 foram retiradas do site online SwissParameters<sup>100</sup>, porém, a topologia gerada Swiss param não foi a mais adequada para as moléculas dos herbicidas e alguns parâmetros tiveram que ser recalculados utilizando mecânica quântica para se adequarem ao sistema simulado(dados não reportados).

Das posições dos *clusters* formados através dos cálculos de *docking*, os cálculos de dinâmica molecular foram feitos usando o programa NAMD 2.7. As simulações de dinâmica seguiram os seguintes passos:

- depois do ajuste de volume a 1.0 atm através de um pistão de Langevin<sup>76</sup> os cálculos foram feitos num ensemble NVT á 310 K e 1.0 atm, no qual a temperatura foi controlada usando um termostato de Langevin;
- um raio de corte de 16 Å foi utilizado para descrever as interações eletrostáticas e de van der Waals, as contribuições de longo alcance foram incluídas através do método de *particle mesh Ewald* (PME);<sup>78</sup>
- depois da energia ser minimizada uma dinâmica de utilizando o ensemble NpT foi utilizado para o passo de equilíbrio durante 1 ns;
- as energias médias obtidas no *ensemble* NVT foram calculadas usando os 1 ns adicional da trajetória de simulação. Os resultados foram analisadas usando os programas VMD e XMGRACE.

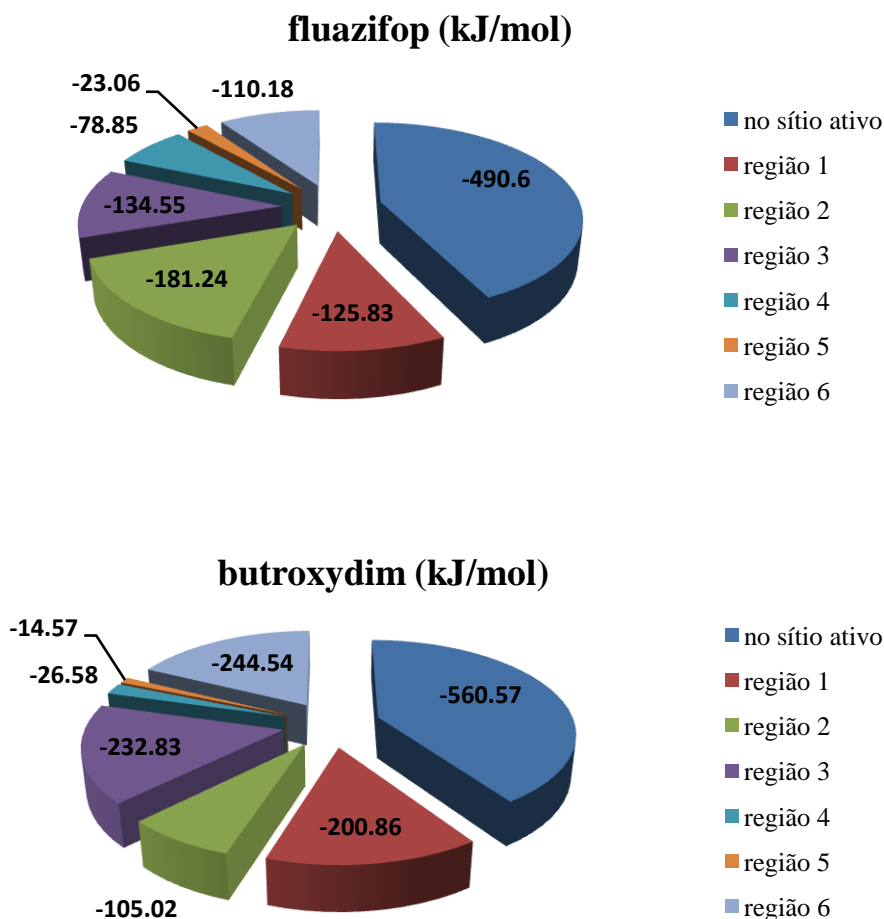
TABELA 4.6 - Resumo dos sistemas moleculares simulados com dinâmica molecular para os herbicidas fluazifop e butoxydim.

Sistema 1	Numero de átomos	Sistema 2	Numero de átomos
ACCcase	23150	ACCcase	23150
butoxydim	58	fluazifop	34
Tip3p água	337485	Tip3p água	333543
K <sup>+</sup>	60	K <sup>+</sup>	60
Cl <sup>-</sup>	30	Cl <sup>-</sup>	30
Total	360783	Total	356817

Os seis *grids* mostrados na figura 4.13 foram usados para medir as energias de ligação não específicas entre os dois herbicidas e a enzima ACCase. As poses representativas dos cálculos de *docking* foram submetidas a simulação por dinâmica molecular utilizando o protocolo supra-citado, como resultado, as energias eletrostáticas, de vdW e total foram obtidas ao longo da trajetória. De acordo com a figura 4.14, podemos observar que a posição 5 é a menos favorável para a interação do inibidor com a enzima para os dois herbicidas estudados. Em contrapartida, a posição seis indica uma energia de interação favorável da ordem de -244,54 kJ/mol. Este valor de energia mais alto dentre os encontrados, deve servir de linha de base para a exclusão de energias não desejadas nos experimentos de AFM.



FIGURA 4.14 - Energia de interação (em kJ/mol) das posições originadas dos *clusters* formados utilizando cálculos de docking nos 6 pré-definidos *grids* das moléculas dos herbicidas fluazifop e butroxydim.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos na figura 4.14 foram levados em consideração para a análise de imobilização da ACCase no modelo criado para representar a ponta funcionalizada do AFM. Das posições analisadas, os valores a serem descontados durante uma medição experimental para o fluazifop e butroxydim são -181,24 kJ/mol e -244,54 kJ/mol, respectivamente. Dependendo da quantidade de enzimas imobilizadas na ponta do AFM, bem como a quantidade de enzimas com o sítio ativo disponível para interação com as moléculas da amostra, a energia associada pode variar. No entanto, os resultados apresentados aqui podem ser

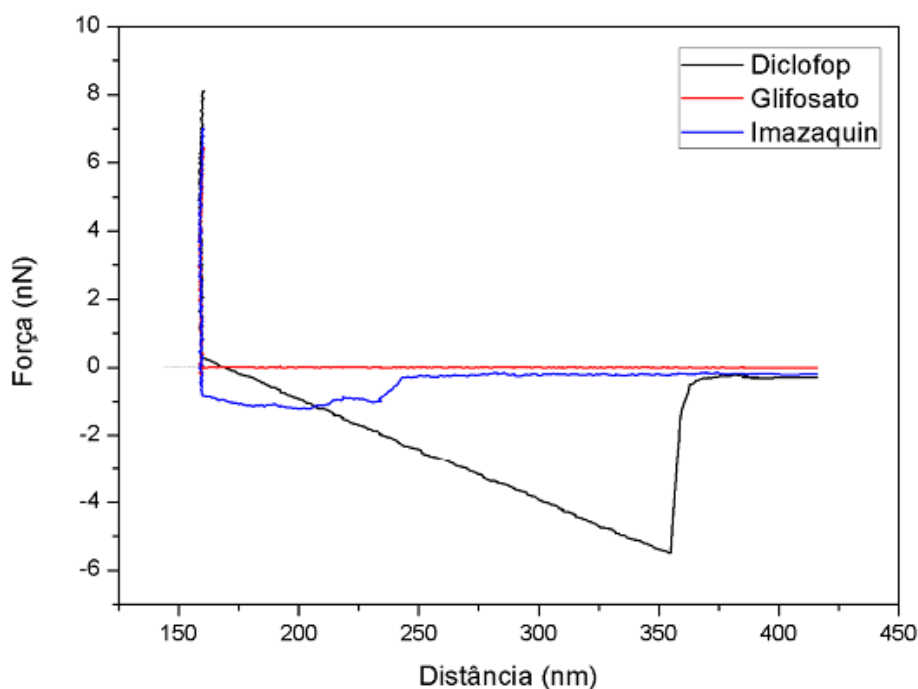
utilizados em estudos posteriores mais aprofundados para se estabelecer uma ponte entre os resultados experimentais e teóricos na descrição atomística dos experimentos de AFM. Os herbicidas butoxydim, fluazifop e diclofop são inibidores específicos da ACCase, e as energias teóricas calculadas para eles poderão ser comprovadas experimentalmente através testes com pontas de AFM funcionalizadas nas condições propostas para que se estabeleça uma ponte entre teoria e experimentos. Nas próximas seções, serão apresentadas algumas aproximações teóricas baseadas em dados experimentais para o cálculo da energia de desacoplamento do herbicida diclofop do sítio ativo da ACCase.

### **4.3 – Etapa 3: Análise Experimental do Nanobiosensor para Detecção de Agroquímicos**

As curvas de força de AFM são usadas para quantificar as interações entre a ponta do AFM modificada com a enzima e a amostra contendo os herbicidas bem como a confirmação da arquitetura do sistema e o reconhecimento específico ou não específico entre a enzima e o herbicida. Além disso, as curvas de força foram realizadas em meio aquoso, pois a força capilar da ponta do AFM pode mascarar as medições, uma vez que, a interação é fraca, o comportamento dos sistemas está de acordo com o proposto por Vezenovet et al.<sup>101</sup> e Noyet et al.<sup>102</sup> A figura 4.15 apresenta as curvas de forças obtidas com a ponta de AFM funcionalizada e substratos modificados com quatro diferentes herbicidas (3 não-específicos: imazaquin, metsulfurone glyphosate, 1 específico: diclofop). A interpretação das curvas de força mostradas na figura 4.15, poderia ser que, devido à geometria da curva de aderência (de retirada), o nanobiosensor mostrou ser selectivo e específico para o herbicida inicialmente proposto (diclofop). Em contrapartida, para os herbicidas não específicos a ponta do AFM não foi tão seletiva.

A figura 4.15 indica que os valores das forças de adesão do diclofop são 8 vezes mais elevados ( $6,0 \pm 1,0$  nN) em magnitude quando comparados com o herbicida imazaquin ( $0,8 \pm 0,1$  nN), e 9 vezes maiores quando comparados com o herbicida metsulfuron ( $0,3 \pm 0,1$  nN). Esta diferença nos valores de força de adesão são esperados uma vez que estes herbicidas (imazaquin e metsulfuron) inibem a ação de outra enzima, a acetolactato sintase (ALS),<sup>103-105</sup> e, conseqüentemente, fazem um tipo de interação não específica com a enzima ACCase. Da mesma forma, os valores de adesão do diclofop são 9 vezes maiores em magnitude quando comparados com o herbicida glifosato ( $0,6 \pm 0,1$  nN). Esta diferença no valor da força de adesão também é esperado uma vez que o herbicida glifosato é um inibidor da enzima EPSP (5-enolpiruvil sintase chiquimato-3-fosfato)<sup>106-108</sup> e por conseguinte, é também um ligante não específico. Todas as diferenças médias entre os valores de reconhecimento específico (inibidor - diclofop) e não específico (não-inibidores: imazaquin, metsulfuron e glifosato) são de aproximadamente 90%. Esta evidência valida a seletividade e especificidade do nanobiosensor e os experimentos controlados, em que o processo de reconhecimento biológico teve ação inibitória, foram usados para confirmar a especificidade dos eventos de reconhecimento específicos detectados por razões estatísticas. Este controle foi conseguido na saturação da ponta com o agente de bloqueio complementar (ou seja, anticorpo anti-ACCase). Uma redução significativa de 97% da probabilidade de adesão nas curvas de força foi observado para o complexo ACCase+anticorpo+diclofop (dados não reportados).

FIGURA 4.15 – Curvas de força de AFS gravado em solução tampão PBS a pH 7,0 paraos herbicidas específicos (diclofop) e não específicos (glifosato e imazaquin) donanobiosensorpostosto.



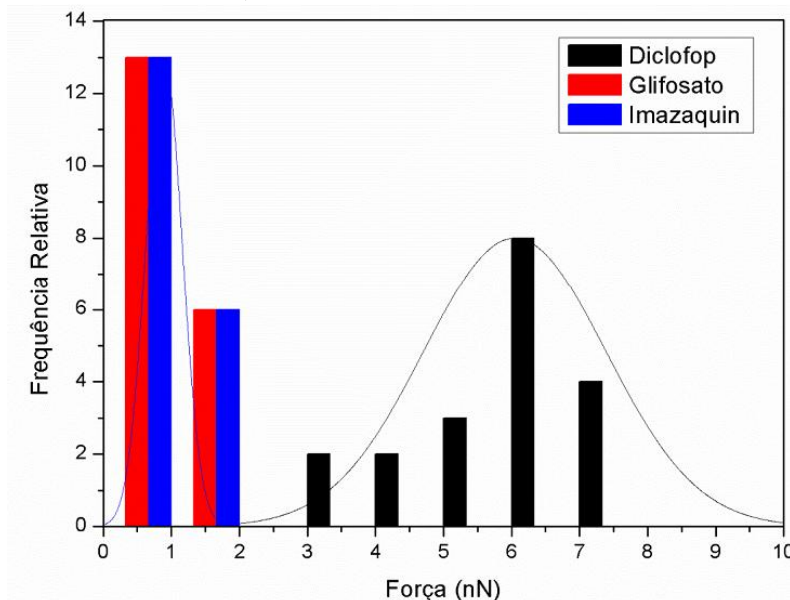
<i>Inibidor</i>	<i>Força de Adesão (nN)</i>
<i>Diclofop</i>	<b>6,0 ± 2,0</b>
<i>Glifosato</i>	<b>0,6 ± 0,2</b>
<i>Imazaquin</i>	<b>0,8 ± 0,2</b>

Fonte: Figura da dissertação de mestrado de Bueno C. C<sup>23</sup>

No histograma obtido na figura 4.16, são mostrados vários valores de força de adesão específicos. O mais importante é que a uma dada taxa de carregamento, a força de adesão mais provável pode ser observada, e, por conseguinte, estes valores podem normalizar o funcionamento do sensor em grande escala. A diferença entre os valores da adesão, para cada grupo de herbicidas (específico e não específico), e a probabilidade estatística dos valores aparecem nas medidas experimentais. Para diferentes distribuições estatísticas dos herbicidas, exemplo, a quantidade, todos os picos foram ajustados a uma função gaussiana, o que significa que é o valor que deve ser encontrado em experiências

práticas para o sistema de sensor de ACCase-diclofop. Através Figura 4.16, a diferença visual dos eventos de adesão é evidente.

FIGURA 4.16 - Histograma contendo a frequência relativa de ocorrência das medidas para os substratos funcionalizados com os herbicidas diclofop, glifosato e imazaquin. Para cada substrato, foi realizado um total de 19 medidas.

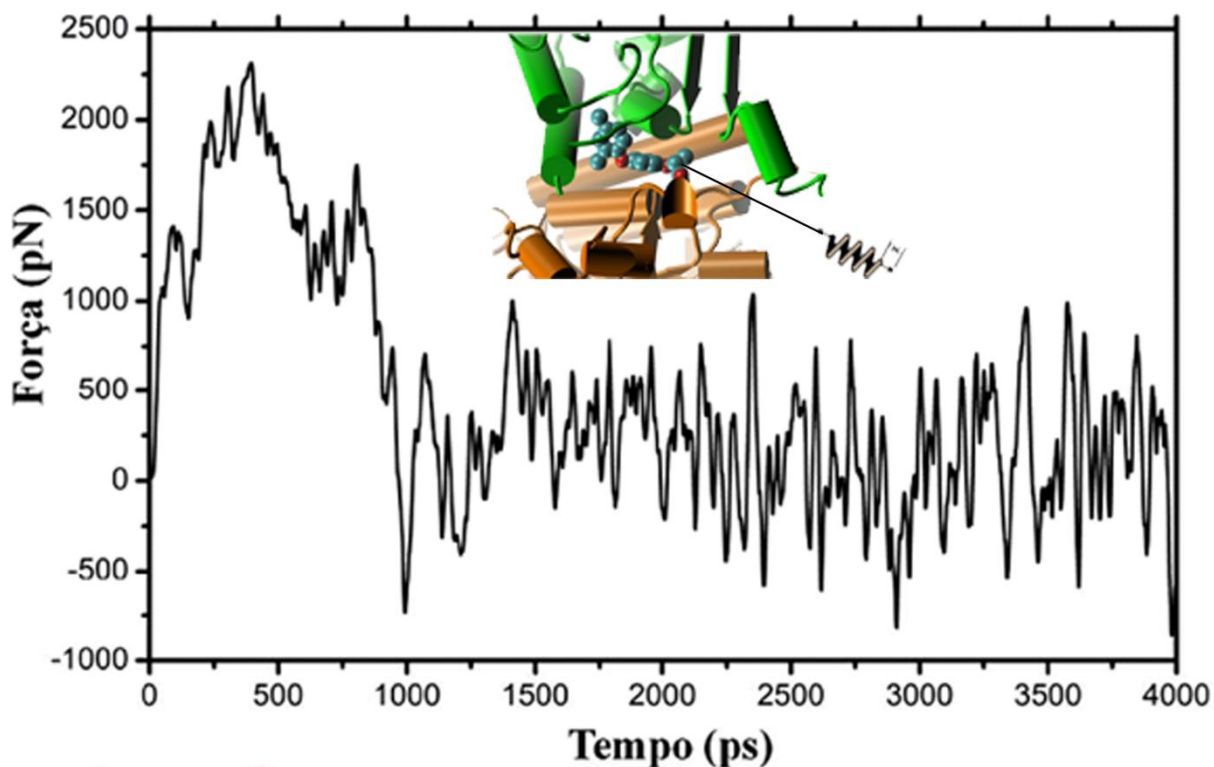


Fonte: Figura da dissertação de mestrado de Bueno C. C3<sup>23</sup>

#### 4.4 - Etapa 4: Dinâmica Molecular Direcionada

Os cálculos de dinâmica molecular direcionada consistiram em simular a força média necessária para o desacoplamento do herbicida diclofop dos resíduos do sítio ativo da ACCase e comparar a força calculada com o obtido experimental. A figura 4.17 mostra a força aplicada com na direção e sentido do desacoplamento, resultando em uma média de  $(1,6 \pm 0,5)$  nN para o processo. Essa força foi associada à força de adesão entre o herbicida diclofop e a enzima ACCase.

FIGURA 4.17 - Simulação da força de desligamento do herbicida diclofop do sítio ativo da enzima ACCase utilizando dinâmica molecular direcionada.



Fonte: Elaborada pelo autor

Analisado a curva de força da figura 4.17, nota-se que a força necessária para a reversão do processo de inibição da enzima ACCase pelo herbicida diclofop, pode ser compreendida como a força de adesão entre 1 herbicida diclofop funcionalizado num determinado substrato com 1 entrada do sítio ativo da enzima ACCase, funcionalizada na superfície da ponta do AFM.

Dispondo deste valor de força de adesão pode-se fazer uma previsão teórica, por intermédio dos cálculos de modelagem molecular e o modelo rígido proposto no Anexo desta tese para a enzima ACCase, do valor da força de adesão que deverá ser detectada pelo protótipo experimental do nanobiossensor ao interagir especificamente com um substrato funcionalizado com herbicidas diclofop, mostrada em (equação 4.4).

As curvas de força de adesão descritas no Anexo desta tese foram obtidos os resultados da medida mais freqüente do experimento de detecção, pela

ponta do AFM funcionalizada (protótipo do nanobiossensor), realizado de acordo com o modelo teórico descrito, para três diferentes substratos contendo o inibidor (diclofop) e dois não-inibidores (imazaquin e glifosato) cada um.

A avaliação deste sistema com os biossensores reportados na literatura ainda é um desafio, devido às características, como a natureza física e química da molécula, topografia da superfície, cargas envolvidas no evento de reconhecimento, os modos de transdução diferentes, e o método de funcionalização da área ativa do nanobiossensor.

O número de enzimas úteis  $N$  para pontas de AFM com raio  $>15$  nm deve ser a razão entre a área  $A$  da ponta do AFM disponível para agrupar as enzimas úteis pela área correspondente a área média da superfície de interação do modelo rígido para a enzima ACCase descrito no anexo desta tese de doutorado. O valor do raio da ponta do AFM (utilizada no experimento do nanobiossensor) especificado pelo fabricante é  $R < 20$  nm, enquanto o valor mínimo para que ocorra as interações específicas com o substrato, envolvendo mais de uma enzima ACCase funcionalizada, calculado teoricamente é 15 nm. Essas especificações definem o valor do raio da ponta utilizada experimentalmente como sendo um valor entre 16 (valor maior que 15 nm) e 20 nm, ou  $(18,0 \pm 2,0)$  nm. Desta forma, o número de enzimas úteis na superfície da ponta do AFM é descrito de acordo com o cálculo em (equação 4.4.).

$$N = \frac{2\pi \cdot 2(18 \pm 2,0)}{34,8 \pm 2,6} = (6,5 \pm 1,2) \text{ Enzimas} \quad (4.4)$$

Para o valor do raio da ponta do AFM de 18,0 nm, o parâmetro de profundidade  $d = 2,0$  nm define uma superfície de semi esfera de raio maior 8,2 nm formando uma circunferência. A figura 13 do Anexo mostra a vista superior (ponto de vista do substrato) do pólo da ponta do AFM funcionalizada com sete

enzimas ACCase úteis sendo limitada pela semi-esfera de área ( $2\pi \cdot 2 \cdot 18$ ). O arranjo das 7 enzimas dentro das limitações da área da circunferência da Figura 13 do Anexo é um arranjo esperado, de acordo com as probabilidades das calculadas nas Figuras do anexo desta tese. A forma como as enzimas se acopla é uma previsão feita pelo modelo rígido, ainda não comprovada experimentalmente.\

A força de adesão prevista pela modelagem molecular da AFM para o nanobiossensor pode ser estimada pela seguinte fórmula:

$$F_t = N (F \pm 0,5) 0,53 \quad (4.5)$$

Onde N é o número de enzimas que cabem na ponta, F é a força teórica, e os parâmetros 0,5 e 0,53 são os dados estatísticos para que a enzima se oriente na superfície de forma favorável em relação às outras enzimas. Com isso o resultado teórico foi de  $(5,5 \pm 2,7)$  nN, resultado que é muito próximo da força calculada experimentalmente.

## 5 – Conclusões

Esta tese apresenta um modelo atomístico para a superfície da ponta de microscópio de força atômica coberta por moléculas de ligantes cruzados para facilitar a imobilização de enzimas no propósito do desenvolvimento de um nanobiossensor. Para os cálculos de dinâmica molecular o campo de força CHARMM e OPLS-AA foram usados, mas alguns parâmetros moleculares não encontrados foram calculados utilizando mecânica quântica na metodologia HF/6-31g\*. A dinâmica molecular empregada para simular o modelo de ponta de AFM funcionalizada interagindo com a enzima ACCase, a qual foi modelada previamente por Franca et al.<sup>20</sup> em solução aquosa. De acordo com análises de potencial eletrostático, três possíveis orientações enzimáticas foram propostas. Os



cálculos de dinâmica molecular empregados levaram em conta a orientação da enzima onde a energia de adsorção é alta, mas também que mantivesse os sítios ativos livres para interagir com as moléculas do substrato.

As análises do potencial eletrostático da ACCase interagindo com a AES levaram ao monitoramento de duas regiões enzimáticas em direto contato com a superfície. As ligações de hidrogênio (*h-bonds*) formadas em função do tempo foram monitoradas, e um média de 18 *h-bonds* foram detectadas. A maioria das ligações de hidrogênio foram formadas entre os grupos laterais arginina e lisina com o grupo aldeído da AES. Foi também observado um aumento da área de superfície de contato entre a enzima ACCase e AES mas os sítios ativos da enzima permaneceram desbloqueados para interações com as moléculas do substrato. A possibilidade de haver desnaturação da enzima devido a presença da superfície AES foi investigada pelo monitoramento dos ângulos diedros da área de contato. O diagrama Ramachadran mostrou que após 50 ns de simulação nenhuma mudança significativa foi observada.

Os resultados obtidos sugerem que o modelo atomístico proposto na presente tese é útil para uma melhor compreensão do processo de interações enzima e superfície a partir de um ponto de vista atomístico. Também vale a pena notar que, com pequenas modificações, o modelo AES pode se usá-lo para estudar imobilização de enzima em sílica para aplicações cromatograficas.<sup>107,108</sup> Portanto, as interações de um determinado substrato com um sítio ativo da enzima podem ser estudados considerando todas as características importantes necessária para a modelagem atomística em diferentes processo de detecção, o que é útil para o desenvolvimento de novas metodologias de rastreo de moléculas ligantes. O resultado experimental foi muito próximo do teórico com relação a força de retirada do herbicida diclofop quando o mesmo está ocupando o sítio ativo da ACCase. Os resultados precisam ser refinados, mas o primeiro passo foi dado para que os cálculos possam ser melhorados.

## Referências Bibliográficas

1. BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.
2. YANG, J. AFM as a high-resolution imaging tool and a molecular bond force probe. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 41, n. 3, p. 435-450, 2004.
3. WILLEMSSEN, O. H. et al. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 5, p. 2220-2228, 1998.
4. LEE, G. U.; KIDWELL, D. A.; COLTON, R. J. Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v.10, n. 2, p. 354-357, 1994.
5. FLORIN, E. L. et al. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 9-10, p. 895-901, 1995.
6. ROS, R. et al. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 13, p. 7402-7405, 1998.
7. DAMMER, U. et al. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 5, p. 2437-2441, 1996.
8. FRITZ, J. et al. Probing single biomolecules with atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 119, n. 2, p. 165-171, 1997.
9. HINTERDORFER, P. et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3477-3481, 1996.

10. STEFFENS, C. et al. Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 6, p. 8278-8300, 2012.
11. DA SILVA, A. et al. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Methylsulfonyl-Methyl Detection. **Sensors**, v. 13, n. 2, p. 1477-1489, 2013.
12. FERRAND, M. et al. Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes - effects of temperature and hydration studied by neutron-scattering. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 90, v. 20, p. 9668-9672, 1993.
13. GIESSIBL, F. J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of Modern Physics**, v. 75, n. 3, p. 949-983, 2003.
14. MELO, A. F., **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 104p. , Dissertação de Mestrado (Área de concentração Bioquímica), Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
15. RUMAYOR, V. G. et al. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madrid - Espanha, Elecé Industria Gráfica, 2005.
16. SWIERCZEWSKA, M. et al. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, 2012.
17. BURNHAM, N. A.; COLTON, R. J.; POLLOCK, H. M. Interpretation of force curves in force microscopy. **Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 64, 1993.
18. GARCÍA, R.; PÉREZ, R. Dynamic atomic force microscopy methods. **Surface Science Reports**, v. 47, n. 6-8, p. 197-301, 2002.
19. DEDA, D. K. et al. **Atomic Force Microscopy-Based Molecular Recognition: A Promising Alternative to Environmental Contaminants Detection**, Badajoz: Formatex Research Center, 2012. p. 0-30.

20. FRANCA, E. F. et al. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 19, p. 8894-8899, 2011.
21. FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.
22. SANTOLIN, M. A. **Nanolitografia do Silício Utilizando o Microscópio de Força Atômica**. 2009. 84p. Dissertação de Mestrado Departamento de Física Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
23. BUENO, C. C. **Desenvolvimento de um Nanobiossensor para o Monitoramento da Qualidade Ambiental no Setor Agrícola**. 2013. 166p. Dissertação de Mestrado (Área de concentração Física de Materiais) Departamento de Física de Materiais, Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba, Sorocaba, 2013.
24. ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. D. C.; TESCHKE, O. Identificação de microcistina LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1843-1848, 2010.
25. FERRAZ, R. M. et al. High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 13, p. 2119-2123, 2006.
26. CUI, Y. et al. Biomimetic peptide nanosensors. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 5, p. 696-704, 2012.
27. VO, D. ; TUAN, N. **Nanosensors and nanoprobe for environmental health sensing and biomedical screening** Disponível em: <<http://en.zl50.com/2010071146886828.html>>. Acesso em: 08 nov. 2012.
28. DEVREESE, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **MRS Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 718-725, 2007.
29. BOGUE, R. Nanosensors: a review of recent research. **Sensor Review**, v. 29, n. 4, p. 310-315, 2009.

30. ITO, T.; IBRAHIM, S.; GRABOWSKA, I. Chemical-force microscopy for materials characterization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 225-233, 2010.
31. TANINAKA, A.; TAKEUCHI, O.; SHIGEKAWA, H. Reconsideration of Dynamic Force Spectroscopy Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2134-2151, 2010.
32. SCHROEDER, T. et al. Single-molecule force spectroscopy of supramolecular heterodimeric capsules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 36, p. 10981-10987, 2010.
33. JOHNSON, W. T. **Immobilizing Biological Molecules on AFM Probes for MRFM and TREC Studies, Agilent technologies**. Disponível em: <<http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-7702EN.pdf>>. Acesso em: 07 jun 2012.
34. BHUSHAN, B. et al. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon based surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 3, p. 327-341, 2005.
35. BROOKS, B. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187-217, 1983.
36. GRAY, J. J. The interaction of proteins with solid surfaces. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 110-115, 2004.
37. GANAZZOLI, F.; RAFFAINI, G. Computer simulation of polypeptide adsorption on model biomaterials. **Physical chemistry chemical physics**, v. 7, n. 21, p. 3651-3663, 2005.
38. RAFFAINI, G.; GANAZZOLI, F. Molecular dynamics simulation of the adsorption of a fibronectin module on a graphite surface. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 20, n. 8, p. 3371-3378, 2004.

39. RAFFAINI, G.; GANAZZOLI, F. Protein adsorption on the hydrophilic surface of a glassy polymer: a computer simulation study. **Physical chemistry chemical physics**, v. 8, n. 23, p. 2765-2772, 2006.
40. ABU-ELHEIGA, L. et al. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science**, v. 291, n. 5513, p. 2613-2616, 2001.
41. ZHANG, H. et al. Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2064-2067, 2003.
42. TONG, L.; HARWOOD JR., H. J. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 6, p. 1476-1488, 2006.
43. BARBER, M. C.; PRICE, N. T.; TRAVERS, M. T. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1733, n. 1, p. 1-28, 2005.
44. **Acetyl-CoA carboxylase - Wikipedia, the free encyclopedia**. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Acetyl-CoA\\_carboxylase](http://en.wikipedia.org/wiki/Acetyl-CoA_carboxylase)>. Acesso em: 21 fev 2012.
45. SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 6, p. 1175-1184, 2004.
46. CORBETT, J.; HARWOOD JR, J. Inhibitors of Mammalian Acetyl-CoA Carboxylase. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 162-180, 2007.
47. ABU-ELHEIGA, L. et al. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12011-12016, 2005.

48. EMBRAPA - **Herbicide Action Course: an intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils.** Disponível em: <[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/336.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2013.
49. KLEIJN, J. M.; NORDE, W. The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces. **Heterogeneous Chemistry Reviews**, n. 2, p. 157-172, 1995.
50. DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions.** 2003.
51. DAVIS, M. E.; MCCAMMON, J. A. Calculating electrostatic forces from grid-calculated potentials. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 401-409, 1990.
52. ANTOSIEWICZ, J.; GILSON, M. K.; MCCAMMON, J. A. Acetylcholinesterase: Effects of Ionic Strength and Dimerization on the Rate Constants. **Israel Journal of Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 151-158, 1994.
53. NICHOLLS, A.; HONIG, B. A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 435-445, 1991.
54. HOLST, M.; BAKER, N.; WANG, F. Adaptive multilevel finite element solution of the Poisson-Boltzmann equation I. Algorithms and examples (vol 21, pg 1319, 2000). **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 475-475, 2001.
55. **Calculation of electrostatic potentials with UHBD.** Disponível em: <<http://projects.villa-bosch.de/mcm/projects/afwb-2002/uhbd.html>>. Acesso em: 05 maio 2012.
56. UNNI, S. et al. Web Servers and Services for Electrostatics Calculations with APBS and PDB2PQR RID A-8605-2010. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1488-1491 2011.

57. URRY, D. W. The change in Gibbs free energy for hydrophobic association: Derivation and evaluation by means of inverse temperature transitions. **Chemical Physics Letters**, v. 399, n. 1-3, p. 177-183, 2004.
58. MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.
59. HETÉNYI, C.; VAN DER SPOEL, D. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 11, n. 7, p. 1729-1737, 2002.
60. MORRIS, G. M. et al. **AutoDock Version 4.2 Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors**. Disponível em: <[http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2\\_UserGuide.pdf](http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2_UserGuide.pdf)>. Acesso em: 05 jul. 2011.
61. WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 3, p. 765-784, 1984.
62. JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. Odense: Wiley, 2006. 599p.
63. MCQUARRIE, D. A. **Physical Chemistry: a Molecular Approach**. Sausalito: University Science Books, 1997.
64. KALE, L. V. et al. NAMD: A Case Study in Multilingual Parallel Programming. Berlin: Springer, 1997. p. 367-381.
65. VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.
66. VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98-103, 1967.



67. 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.
68. LEACH, A. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Southampton Reino Unido Prentice Hall, 2001, 784.
69. **NAMD - Scalable Molecular Dynamics**. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>>. Acesso em: 02 mar. 2012.
70. JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADORIVES, 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.
71. JORGENSEN, W. L.; MCDONALD, N. A. Development of an all-atom force field for heterocycles. Properties of liquid pyridine and diazenes. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 424, n. 1-2, p. 145-155, 1998.
72. LEE, S.; CHOW, P. **An Fpga Implementation of Reciprocal Sums for Spme**. Toronto: University of Toronto, 2007.
73. 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.
74. MORGON, N.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
75. NOSÉ, S. Constant Temperature Molecular Dynamics Methods. **Progress of Theoretical Physics Supplement**, v. 103, p. 1-46, 1991.
76. FELLER, S. E. et al. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 11, p. 4613-4621, 1995.

77. TIRONI, I. G. et al. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 13, p. 5451-5459, 1995.
78. ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995.
79. EWALD, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. **Annalen der Physik**, v. 369, n. 3, p. 253-287, 1921.
80. DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.
81. DESERNO, M.; HOLM, C. How to mesh up Ewald sums. I. A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. **The Journal of Chemical Physics**, v. 109, n. 18, p. 7678-7693, 1998.
82. NIENHAUS, G. U. **Protein-ligand interactions methods and applications**. Totowa: Humana Press, 2005.
83. LESZCZYNSKI, J. **Computational Chemistry: Reviews of Current Trends**. World Scientific Pub Co Inc, 2005. 256p.
84. KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011-1021, 1992.
85. BARTELS, C. Analyzing biased Monte Carlo and molecular dynamics simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 331, n. 5-6, p. 446-454, 2000.
86. TORSHIN, I. Y.; WEBER, I. T.; HARRISON, R. W. Geometric criteria of hydrogen bonds in proteins and identification of 'bifurcated' hydrogen bonds. **Protein Engineering**, v. 15, n. 5, p. 359-363, 2002.

87. HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
88. WU, Y.; TEPPER, H. L.; VOTH, G. A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. **The Journal of Chemical Physics**, v. 124, n. 2, p. 24503-24512, 2006.
89. MARTYNA, G.; TOBIAS, D.; KLEIN, M. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Algorithms. **Journal of Chemical Physics**, v. 101, n. 5, p. 4177-4189, 1994.
90. **Grace: Developer's Corner.** Disponível em: <<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/devel/>>. Acesso em: 07 set. 2012.
91. RYCKAERT, J.; BELLEMANS, A. Molecular-Dynamics of Liquid Normal-Butane Near Its Boiling-Point. **Chemical Physics Letters**, v. 30, n. 1, p. 123-125, 1975.
92. NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2011.
93. VALIEV, M. et al. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. **Computer Physics Communications**, v. 181, n. 9, p. 1477-1489, 2010.
94. KIRSCHNER, K. N. et al. A Glycam-Based Force Field for Simulations of Lipopolysaccharide Membranes: Parametrization and Validation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 11, p. 4719-4731, 2012.
95. LEITE, F. L. et al. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 12773-12856, 2012.
96. SOUZA, A. L. et al. Self-assembled hybrid films of phosphotungstic acid and aminoalkoxysilanes on SiO<sub>2</sub>/Si surfaces. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 9, p. 3574-3580, 2012.

97. XIANG, S. et al. A different mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by tepraloxymid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 49, p. 20723-20727, 2009.
98. VAN GUNSTEREN, W. F. et al. Investigation of protein unfolding and stability by computer simulation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 348, n. 1323, p. 49-59, 1995.
99. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 3181-3184, 1978.
100. ZOETE, V. et al. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359-2368, 2011.
101. VEZENOV, D. V. et al. Force Titrations and Ionization State Sensitive Imaging of Functional Groups in Aqueous Solutions by Chemical Force Microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 8, p. 2006-2015, 1997.
102. NOY, A. et al. Chemical force microscopy: Exploiting chemically-modified tips to quantify adhesion, friction, and functional group distributions in molecular assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 30, p. 7943-7949, 1995.
103. AHONSI, M. O. et al. Effects of ALS-inhibitor herbicides, crop sequence, and fertilization on natural soil suppressiveness to *Striga hermonthica*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 104, n. 3, p. 453-463, 2004.
104. KOGAN, M. et al. Eficacia de penoxsulam, inhibidor ALS, para el control de *Alisma plantago-aquatica*, resistente a sulfonilureas, en arroz en Chile. **Ciencia e investigación agraria**, v. 38, n. 1, p. 83-93, 2011.
105. WALSH, D. T. et al. Camelina mutants resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 2, p. 1053-1063, 2012.

106. ALIBHAI, M. F.; STALLINGS, W. C. Closing down on glyphosate inhibition—with a new structure for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 6, p. 2944-2946, 2001.
107. SAMMONS, R. D. et al. Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: identification of an EPSP synthase.glyphosate ternary complex. **Biochemistry**, v. 34, n. 19, p. 6433-6440, 1995.
108. YU, Q. et al. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, v. 230, n. 4, p. 713-723, 2009.
109. DE MORAES, M. C. et al. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: A new approach for ligands identification and characterization. **Journal of Chromatography, A**, v. 1232, n. 6, p. 110-115, 2012.
110. GUIDO, R. V. C. et al. Structural insights into the molecular basis responsible for the effects of immobilization on the kinetic parameters of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and human. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1845-1853, 2010.

## APÊNDICE

### Artigos submetidos pelo grupo de pesquisa teórico-experimental

1. BUENO, C. C.; AMARANTE, A. M.; OLIVEIRA, G. S. et al. Detection of diclofop herbicide using an enzymatic nanobiosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. X:XX, XXX-XXX, 2013.
2. OLIVEIRA, G. S.; LEITE, F.L.; AMARANTE, A. M. et al. Molecular modeling of enzyme attachment on functionalized surface. **Journal of Molecular Modeling**. X:XX, XXX-XXX, 2013.
3. AMARANTE, A. M.; OLIVEIRA, G. S.; CUNHA, R. A.; BUENO, C. C.; FRANCA, E. F.; LEITE, F. L. Development of chemical force microscopy by means of molecular modeling technique. X:XX, XXX-XXX, 2013.

## **ESTUDO PARALELO DA ESTRUTURA DA ACCASE - MODELO RÍGIDO**

Este estudo foi proposto em conjunto com o aluno de mestrado Adriano Moraes Amarante em sua dissertação de mestrado intitulado “DESENVOLVIMENTO DA MICROSCOPIA DE FORÇA QUÍMICA USANDO MODELAGEM MOLECULAR”

### **Modelo Rígido**

Sabe-se que um dos principais fatores que alteram a conformação das enzimas é a flutuação térmica do meio, a determinação da estrutura estável da enzima ACCase foi obtida através de cálculos de homologia (Guex e Peitsch, 1997) relaxada em água através de cálculo de dinâmica molecular. A simulação computacional da enzima ACCase, relaxada em meio aquoso sob condições de  $T = 298\text{K}$ ,  $P = 1\text{ atm}$  e pH neutro, foi realizada durante 10 ns. A simulação mostrou a flutuação conformacional da estrutura da enzima ACC segundo o desvio quadrático médio (RMSD) calculado para os átomos que a compõe. A flutuação conformacional se mostrou relativamente estável para o dímero da enzima ACCase, em torno de 0,3 nm (figura 1)<sup>21</sup> em relação a estrutura cristalográfica.

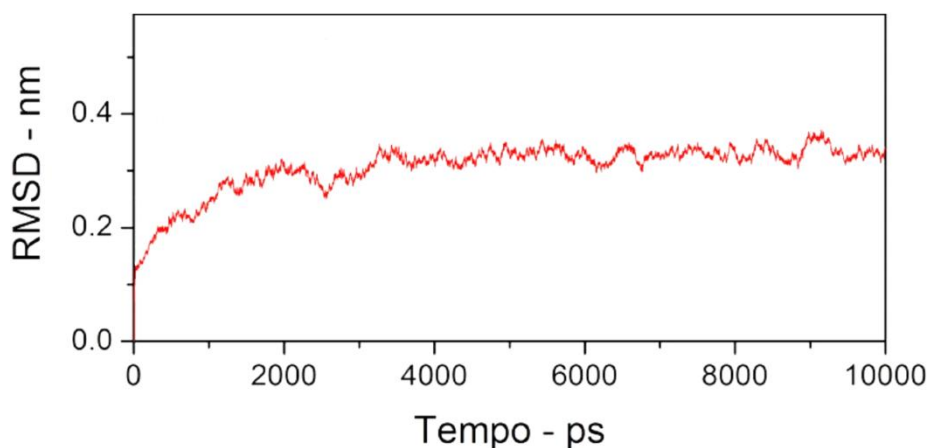


FIGURA 1 - Desvio Quadrático Médio da enzima ACCase relaxada em água, relativo à estrutura cristalográfica.

Dispondo do valor seguro de 0,3 nm de flutuação conformacional da enzima ACCase em meio líquido, pôde-se criar um modelo rígido para a enzima ACCase, informação que será útil no cálculo da interação com a ponta do AFM. O modelo rígido funciona quão bem quanto mais distantes forem as dimensões consideradas do valor mínimo de 0,3 nm, e é uma aproximação feita a partir das principais dimensões consideradas a partir de interações superficiais. A criação do modelo rígido teve a finalidade de facilitar o cálculo das mais prováveis áreas de interação entre superfícies e proporcionar números mais consistentes quanto à predição das probabilidades envolvidas nas possíveis posições e formas com que a enzima pode ser funcionalizada na ponta do AFM.

A figura 2 mostra a representação de superfície da enzima ACCase, nesta representação está incluído o potencial eletrostático da enzima em pH neutro<sup>21</sup> e os grupos  $-NH_2$  (representação de Van der Waals) disponíveis para a funcionalização após o interação entre superfícies, ambos exibem um caráter uniforme de distribuição ao longo da superfície da enzima. Por esse ponto de observação não há regiões preferenciais para a funcionalização. Outro ponto de observação são as regiões indicadas na figura 3, essa figura mostra a representação



técnica das principais dimensões da enzima ACCase aproximadas. Neste modelo rígido as áreas *A*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F* foram as superfícies de interação estudadas.

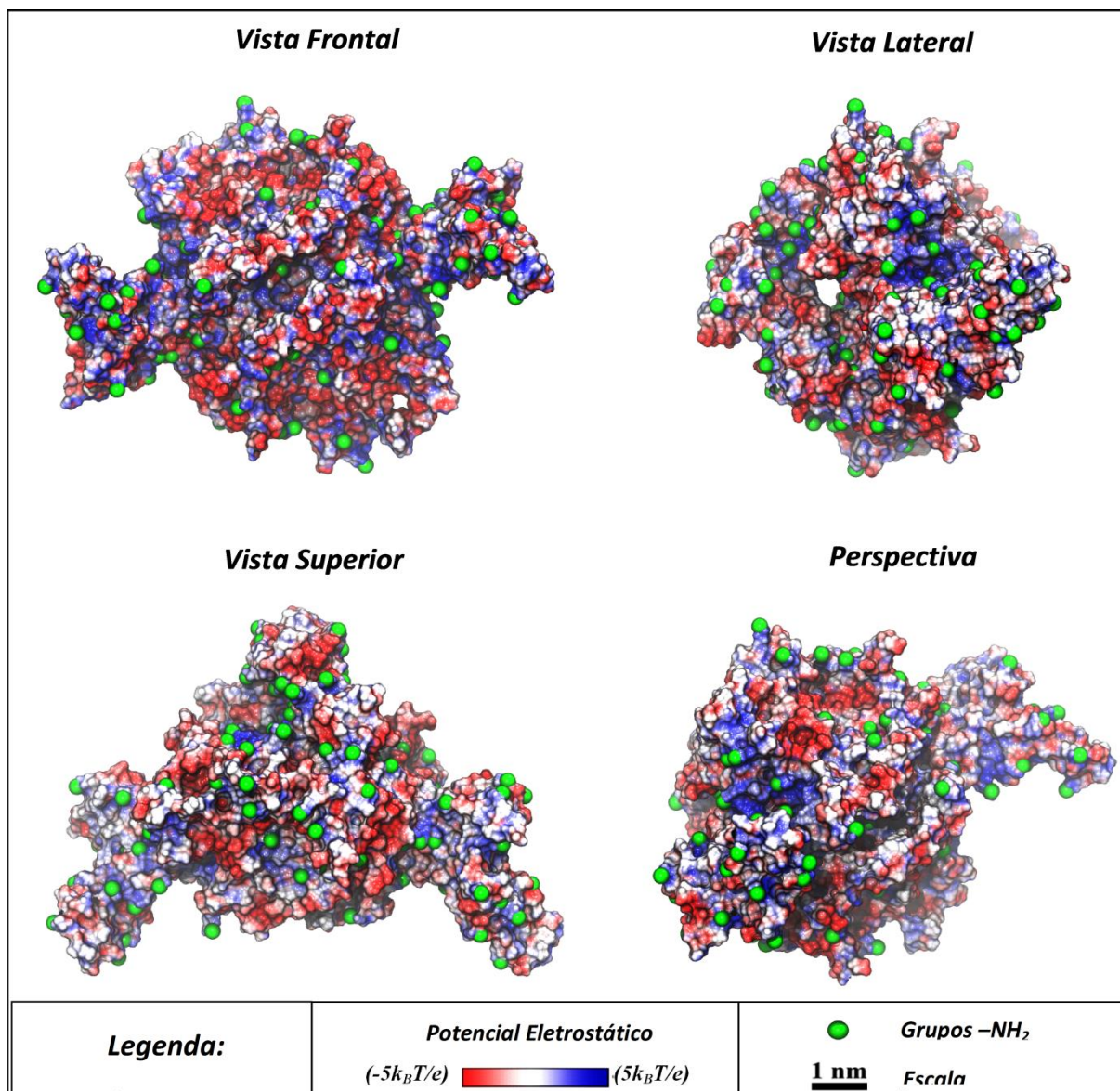


FIGURA 2 – Potencial Eletrostático da superfície da enzima ACCase. As regiões representadas na cor azul são regiões de cargas positivas, as regiões representadas na cor vermelho são regiões de cargas negativas, enquanto as regiões representadas na cor branco são regiões neutras. Nota:  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura e  $e$  a carga elementar.

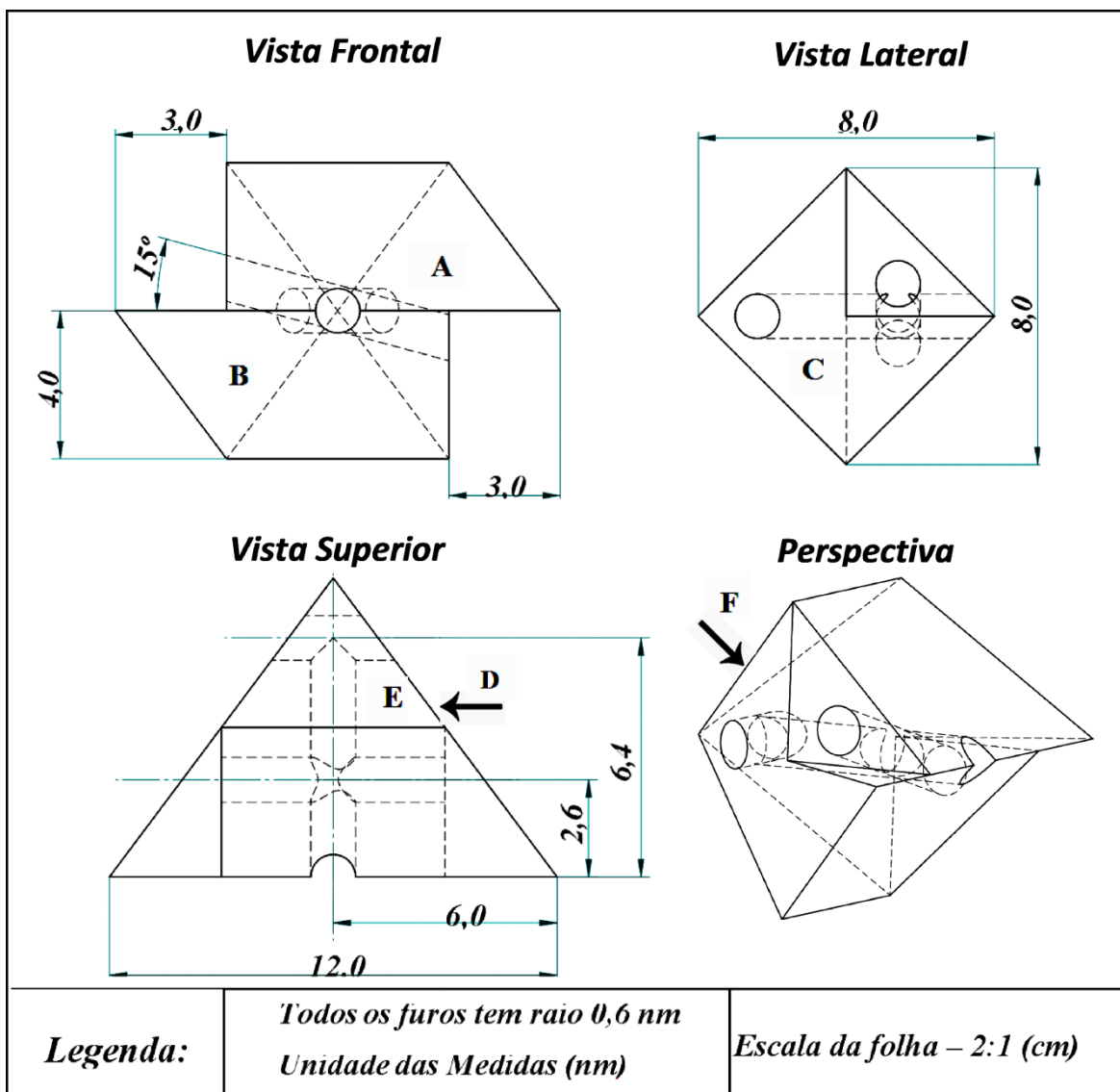


FIGURA 3 – Modelo Rígido da enzima ACCase desenvolvido.

## Probabilidades envolvidas nas áreas de interação

As áreas  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$ ,  $E$  e  $F$  da figura 3 representam todas as possíveis áreas de interação entre a enzima ACCase e a superfície da ponta do AFM, segundo o Modelo Rígido. Devido à simetria do modelo, nota-se que as posições correspondentes às áreas  $A$ ,  $C$ , e  $E$  são as mesmas das áreas  $B$ ,  $D$  e  $F$  respectivamente, o que limita a somente três posições possíveis para a funcionalização da enzima ACCase, segundo o modelo, representadas nas FIG. 4, 5 e 6. Essas três figuras mostram cada uma, uma posição da enzima ACC possível para a funcionalização com sua respectiva probabilidade de ocorrência correspondente a área de interação entre as superfícies  $P(A_n)$  (Enzima e ponta do AFM), calculada como sendo (equação 1):

$$P(A_n) = \frac{A_n}{A_1 + A_2 + A_3} \quad (1)$$

Sendo  $A$  a área de interação e  $n = \{1,2,3\}$  o índice correspondente.

Nas figuras 4, 5 e 6, para cada uma das três posições correspondentes, estão representadas por um vetor a direção da entrada do sítio ativo que pode ou não estar disponível para a detecção do substrato. Os vetores cujas componentes verticais estão apontadas na direção oposta ao substrato (sentido superfície da ponta) indicam uma entrada do sítio ativo indisponível para o mesmo, na qual os resíduos dos aminoácidos correspondentes estão representados na cor vermelho. Os vetores cujas componentes verticais estão apontadas na direção do substrato (sentido oposto à superfície da ponta do AFM) indicam uma entrada do sítio ativo disponível para o mesmo, na qual os resíduos dos aminoácidos correspondentes estão representados na cor violeta. Na figura 4 porém, não se observa entradas dos sítios ativos disponíveis que, segundo a direção da componente vetorial estaria disponível, devido a distância da mesma em relação a superfície da enzima ACCase ser maior do que a altura da

monocamada do substrato de herbicidas diclofop funcionalizados na superfície de mica.

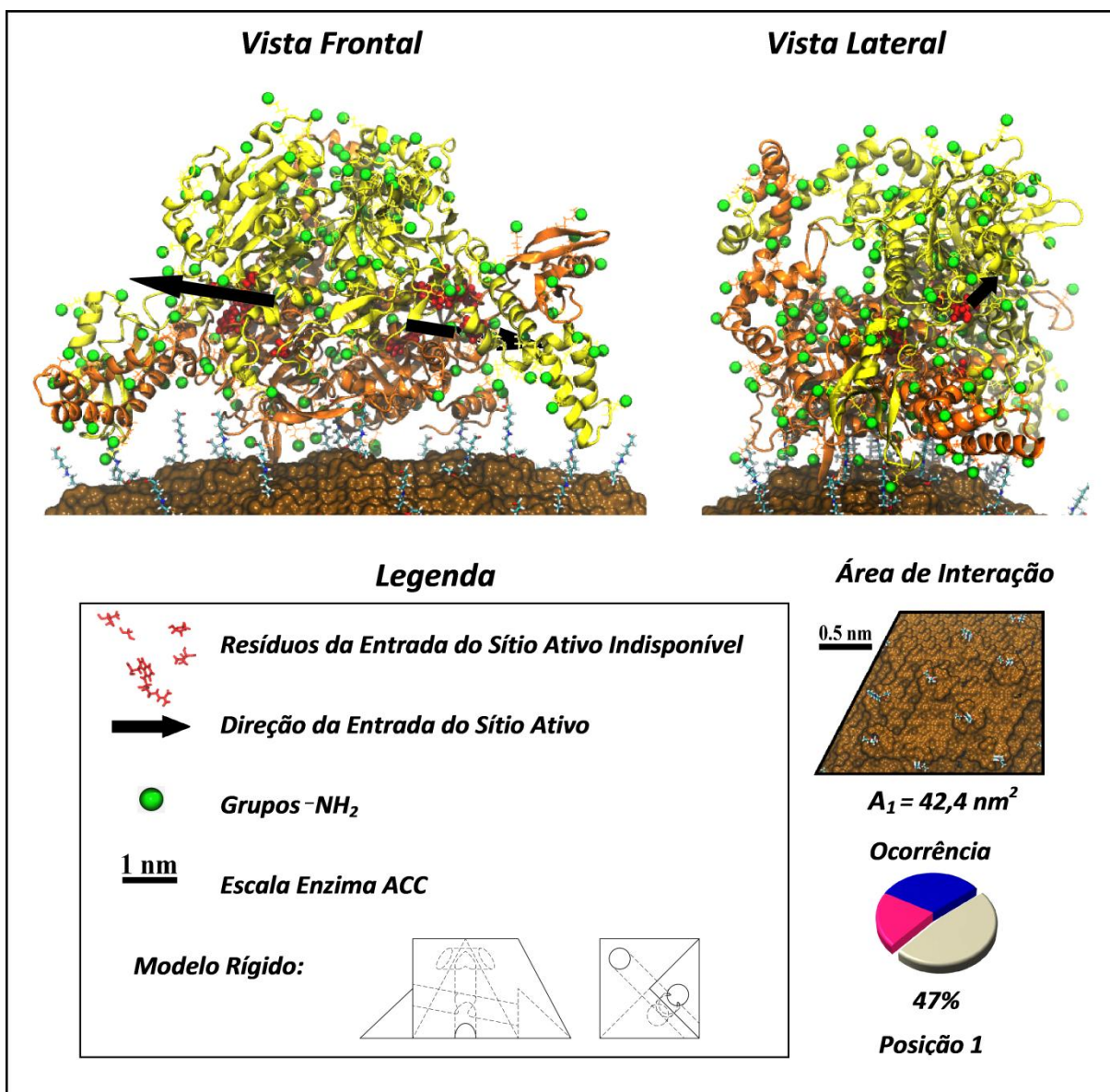


FIGURA 4 – Posição 1. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACCase ser immobilizada na superfície de  $Si_3N_4$  da ponta do AFM previstas pelo Modelo Rígido.



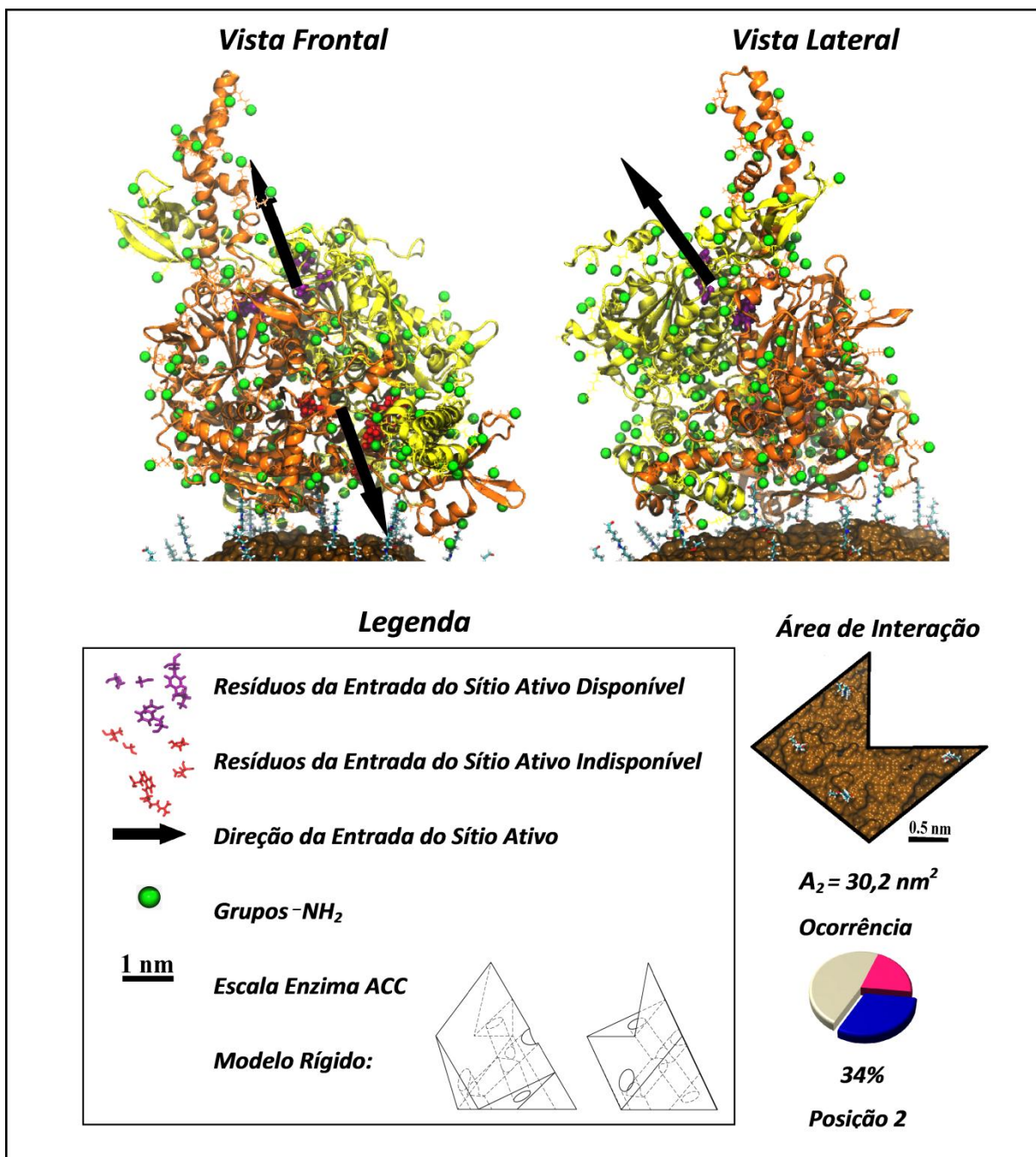


FIGURA 5 – Posição 2. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACCase ser imobilizada na superfície de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> da ponta do AFM previstas pelo Modelo Rígido.

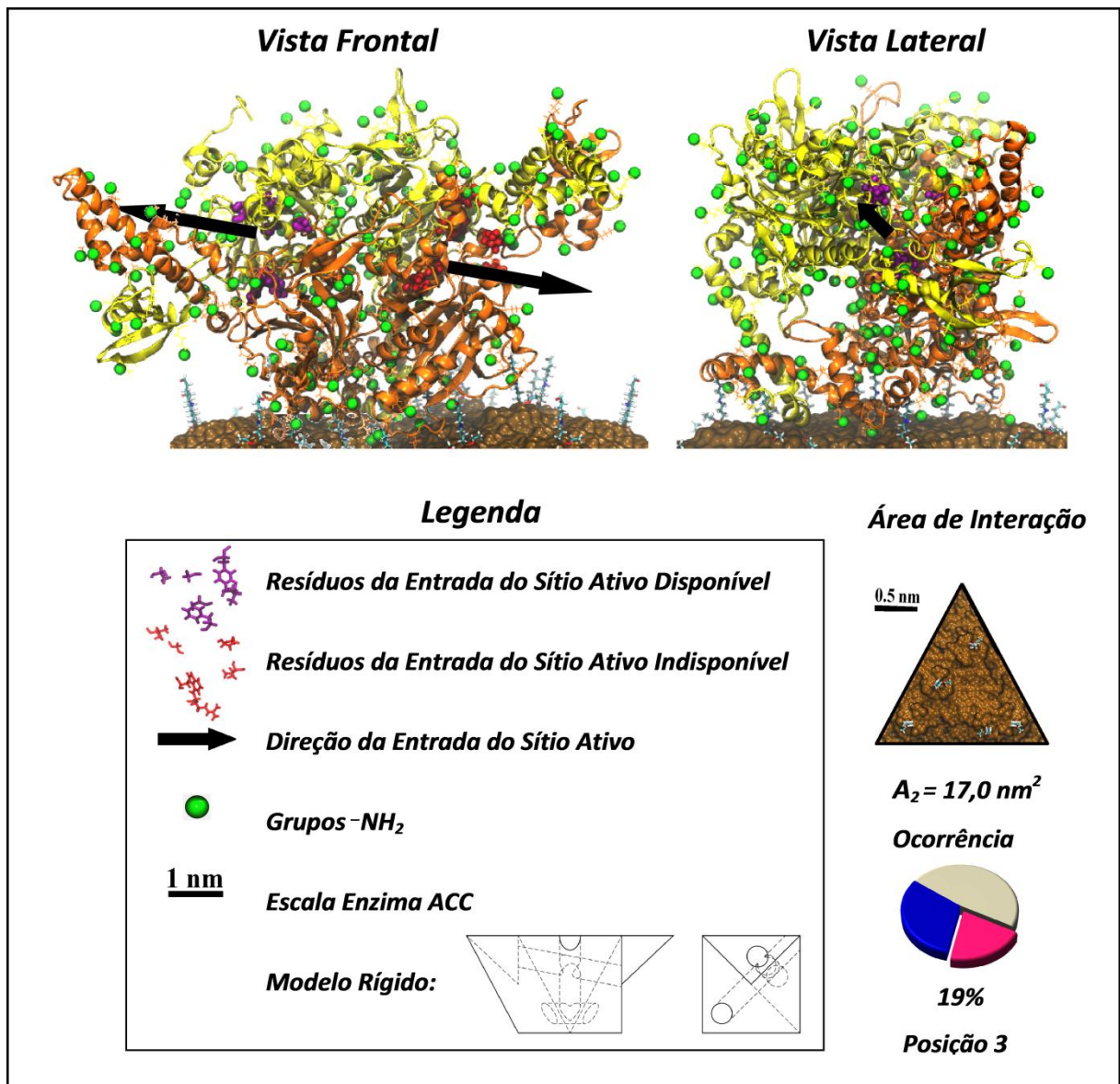


FIGURA 6 – Posição 3. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACCase ser imobilizada na superfície de  $Si_3N_4$  da ponta do AFM previstas pelo modelo rígido.

Uma simulação realizada a partir de cálculos de dinâmica molecular, feita nas mesmas condições termodinâmicas do modelo rígido, mostra que de fato a enzima tende a ajustar naturalmente sua posição na superfície da ponta do AFM para uma das três posições possíveis das figura 4, 5 e 6. Na simulação a enzima foi posicionada de maneira aleatória no instante inicial  $t = 0 \text{ ns}$  (FIG. 7A), e após um período de  $t = 50 \text{ ns}$  (figura7B) se observou que a enzima assumiu naturalmente a posição 2, representada na figura5.

A simulação consistiu em estudar as superfícies de interação entre a enzima ACCase e a superfície da ponta do AFM recoberta por uma monocamada de moléculas APTES+Glutaraldeído, fato que ocorre experimentalmente durante o processo de funcionalização. Ao final deste processo ocorre a ligação covalente entre os grupos  $-NH_2$  disponíveis na superfície da enzima ACCase com a extremidade das moléculas de glutaraldeído.

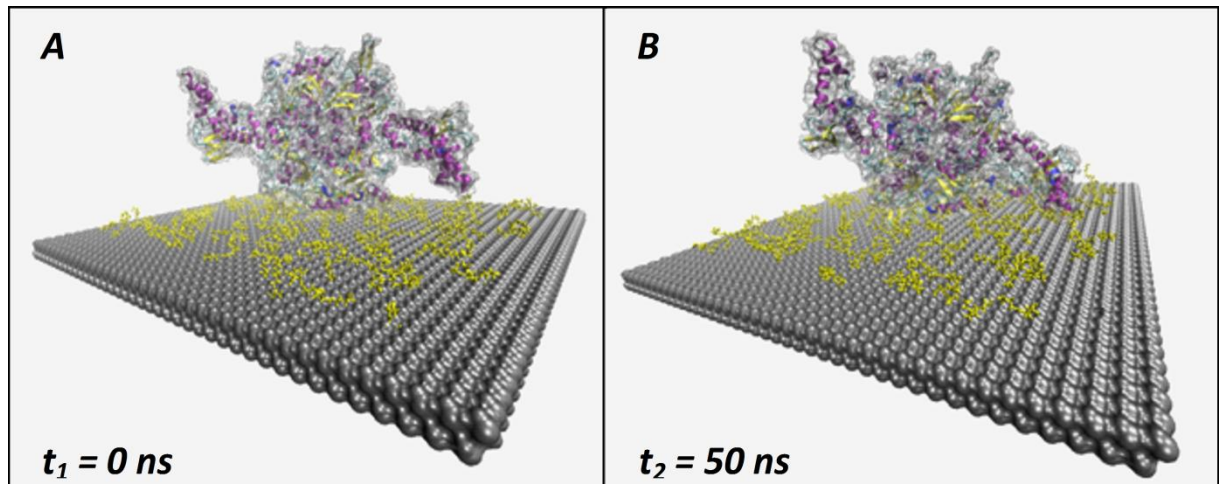


FIGURA 7 – Simulação da interação da enzima ACCase com a superfície de  $Si_3N_4$ , realizada em solução aquosa para cálculos de Dinâmica Molecular.

Sendo assim, a probabilidade da entrada do sítio ativo de uma enzima ACCase funcionalizada estar disponível, é dependente das três posições possíveis para funcionalização das figuras 4, 5 e 6 e deverá ser  $1 - 0,47 = 0,53$  segundo o modelo rígido.

### **Área média ocupada na superfície da ponta do AFM pela enzima ACCase**

Para calcular o número de enzimas úteis (enzimas que podem interagir especificamente com o substrato de herbicidas diclofop) em função do raio da ponta do AFM é necessário saber antes qual é a área média ocupada por uma enzima ACCase funcionalizada na superfície da ponta do AFM.

Estudos realizados mostram que o monômero da enzima ACCase é estruturalmente pouco estável quando tratado isoladamente, o que corrobora a tendência da formação do dímero (estrutura mais estável na natureza)<sup>21</sup> e esta seja a estrutura mais estável na natureza. A energia livre de solvatação ( $-23,36 \cdot 10^3$ )  $\frac{kJ}{mol}$  descrita por Franca et. al.<sup>21</sup> mostra que a enzima ACCase é solúvel em meio aquoso e dado seu respectivo ponto isoelétrico 6,23, valor correspondente ao pH em que existe um equilíbrio entre o balanço de cargas negativas e positivas fazendo com que as forças de interação com o solvente sejam menores, as enzimas ACCase tentem a formar aglomerados em pH neutro dependendo da concentração molar.

As enzimas ACCase podem se ajustar umas nas outras por intermédio de acoplamentos que se mantêm estáveis por forças de natureza eletrostática como é o exemplo dos dois monômeros que compõe a enzima ACCase, e formar aglomerados. Infelizmente não se tem dados cristalográficos na literatura sobre aglomerados de enzimas ACCase, porém, da mesma maneira que só deve existir um acoplamento possível na natureza para os dois monômeros que compõe o dímero da enzima ACCase (dentre todas as estruturas descritas na literatura), só deve haver uma maneira possível de duas enzimas ACCase (dímero) se acoplarem. Este acoplamento forma dois dímeros, mas pode haver outras formas de estas mesmas proteínas se encaixarem sem que haja de fato a formação de novas estruturas multiméricas (figura8), já que esse não é o comportamento encontrado na literatura da enzima ACCase. Por intermédio do Modelo Rígido desenvolvido pôde-se identificar quais são as “peças” que podem se encaixar e descontá-las das áreas de ocupação na superfície da ponta do AFM.



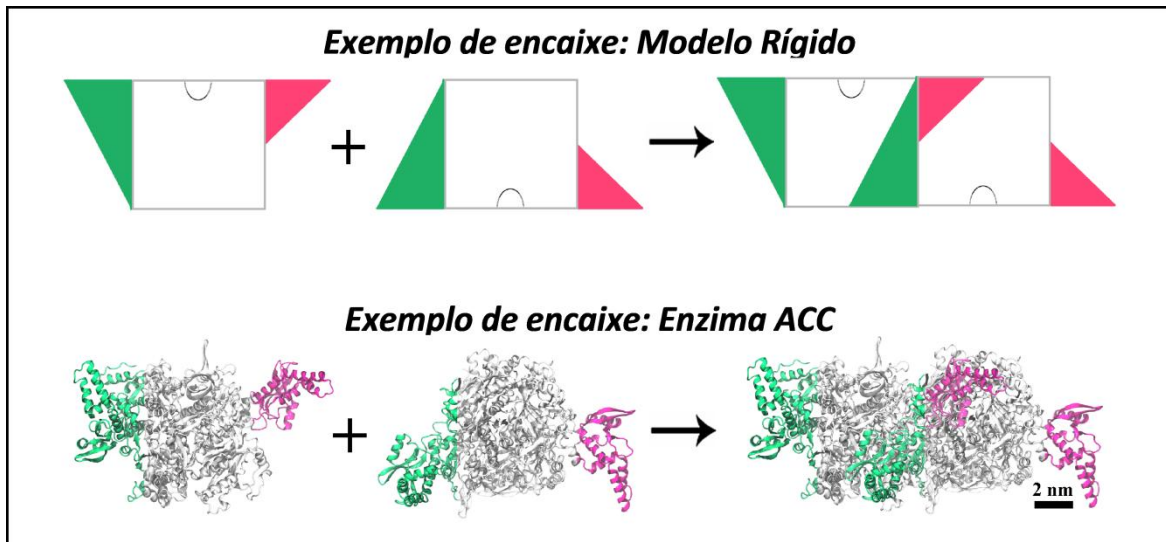


FIGURA 8 – Exemplo de um possível encaixe sem haver a formação de uma nova estrutura multimérica para a enzima ACCase. Encaixe nas posições 1 e 3, correspondentes às FIG. 4 e 6 (Vista superior da enzima e representação pelo modelo rígido).

Sendo assim, a área efetiva ocupada por uma enzima ACCase, segundo o modelo rígido, deve ser a média das projeções das vistas superiores correspondentes cada posição possível ocupada descontado das projeções correspondentes aos encaixes. Considerando que não há espaços vazios entre as projeções das enzimas ACCase aglomeradas, a área média  $A_m = 34,8 \text{ nm}^2$  (com desvio padrão  $2,6 \text{ nm}^2$  para um grau de confiabilidade de 95%.) ocupada por uma enzima ACCase foi calculada como sendo a média das três áreas possíveis de ocupação (figura 21) ponderada pela probabilidade de ocorrência de cada uma, correspondente às três posições das figuras 4, 5 e 6.

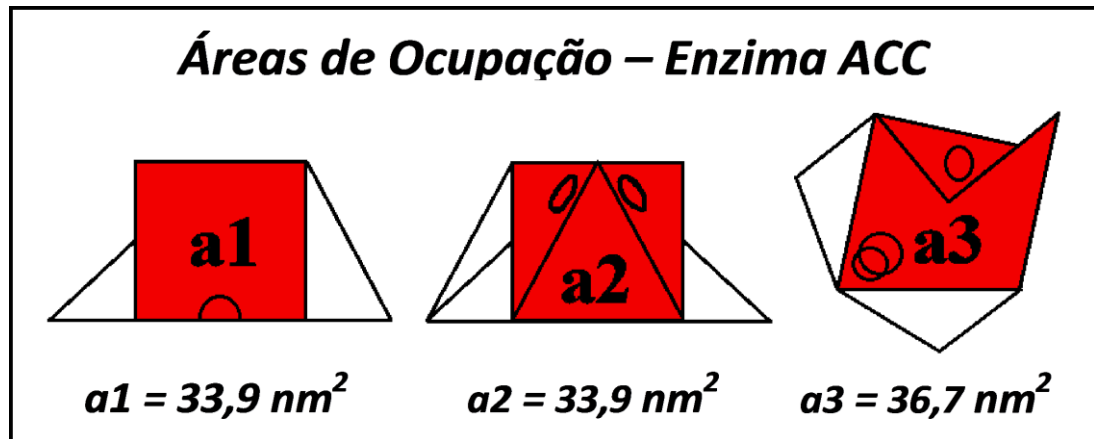


FIGURA 9 – Áreas de ocupação possíveis na superfície da ponta do AFM para a enzima ACCase (representadas na cor vermelho) segundo o Modelo Rígido.

### Número de enzimas úteis na ponta do AFM funcionalizada

O passo seguinte foi a determinação da área da ponta do AFM disponível para agrupar as enzimas úteis, para isso foi estipulado um valor máximo  $d = 2,0 \text{ nm}$  de distância na qual as enzimas ACCase de uma monocamada podem se ligar ao plano esférico da superfície da ponta do AFM em relação ao polo deste (figura10). Esta distância foi estipulada com base na altura da monocamada do substrato de herbicidas diclofop (figura10), tornando a área  $A$  da superfície esférica uma função do raio  $R$  da ponta do AFM, com o parâmetro  $d$  fixado em  $2,0 \text{ nm}$  (equação 2).

$$A = 2\pi dR \quad (2)$$

Cada célula APTES+Diclofop funcionalizada na ponta pode se estender até um comprimento de  $3 \text{ nm}$  depois de complexada a entrada do sítio ativo da enzima ACCase, porém o comprimento mínimo de  $2 \text{ nm}$  deve ser alcançado pela entrada do sítio ativo das enzimas ACCase funcionalizadas na ponta do AFM. Na figura10 uma monocamada de enzimas está representada em um plano 2D de acordo com sua menor dimensão, um quadrado de lado  $P$  segundo o modelo rígido, que corresponde à aresta dos quadrados que as

envolvem. O cálculo para as demais dimensões (revolução em torno do eixo central  $z$ ) é exatamente o mesmo, pois é a localização da entrada do sítio ativo que é levada em consideração. A vista lateral das enzimas corresponde também às vistas laterais que são apresentadas nas figuras 4, 5 e 6.

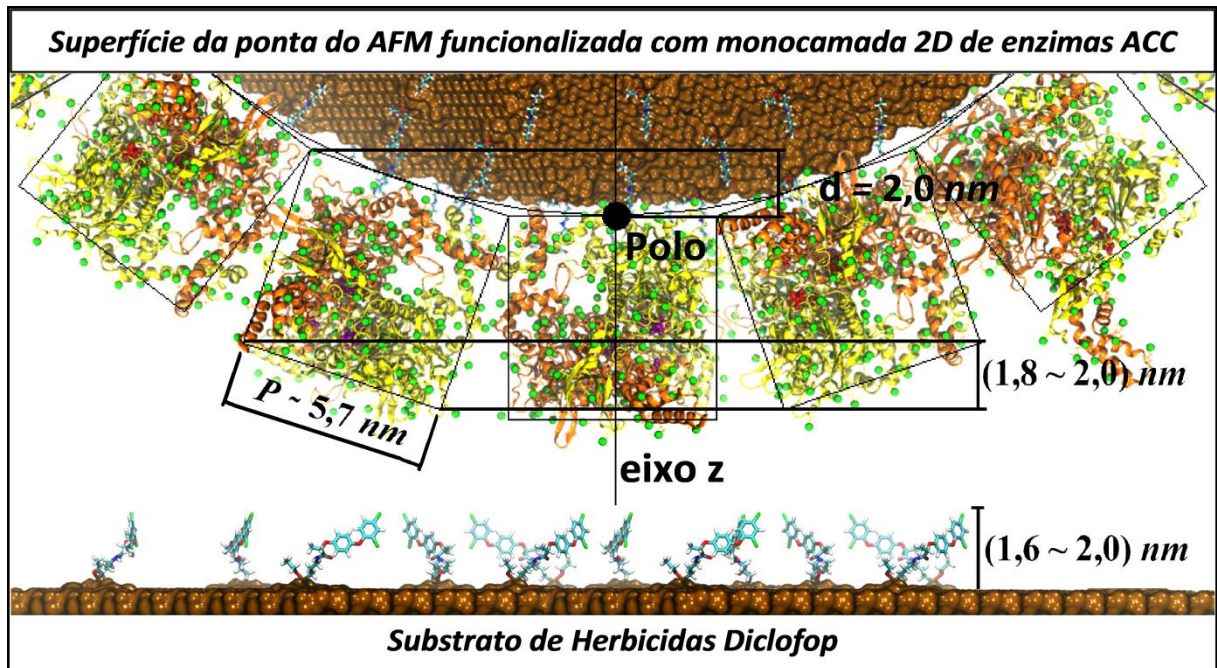


FIGURA 10 – Monocamada 2D de menor dimensão possível de enzimas ACC funcionalizadas na ponta do AFM e distâncias mínimas para que haja interação entre as enzimas e o substrato de herbicidas Diclofop.

De acordo com o modelo sugerido, para pontas de AFM com raio  $<15 \text{ nm}$  o valor do parâmetro  $d$  não fixado fica acima de  $2,0 \text{ nm}$ , o que leva a conclusão de que apenas a enzima que foi funcionalizada em cima do polo da ponta do AFM deve ser útil e apta a interagir especificamente com o substrato de herbicidas diclofop. O valor do raio da ponta do AFM não pode ser inferior à metade do parâmetro  $P$  (aproximadamente  $5,7 \text{ nm}$  para a enzima ACC), pois nesta condição a enzima não tem condições físicas de se aderir ao polo da ponta do AFM, impossibilitando interações específicas com o substrato. Isso fica mais

visível na equação do parâmetro  $d$ , que mostra  $d$  em função de  $R$  para a caixa cúbica de lado  $P$  adjacente à enzima polar da ponta do AFM (enzima funcionalizada no polo da superfície esférica) de raio  $R$  (Esquemático da superfície da circunferência, representando a ponta do AFM, que levou a equação 3.

$$d = R - \sqrt{R^2 - x^2} + \frac{P}{2} |\sin(\arctan\theta)| \quad (3)$$

Sendo  $x^2 = \frac{R^2 \tan^2 \theta}{1 + \tan^2 \theta}$  e  $\tan \theta = -\frac{PR}{R^2 - (\frac{P}{2})^2}$

A curva do parâmetro  $d$  variável em função de  $R$ , para o intervalo  $R = \left[\frac{P}{2}, 15\right]$  nm é apresentada na figura 11.

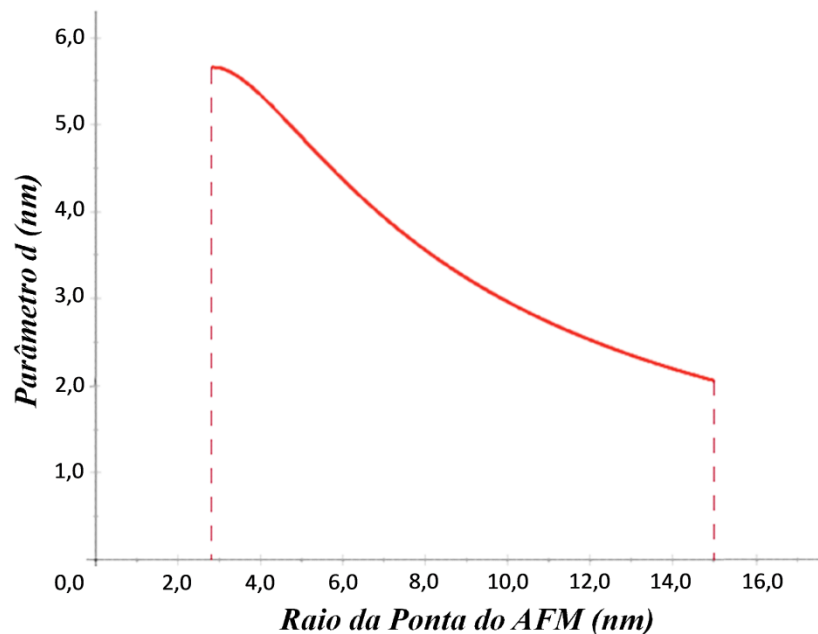


FIGURA 11 - Variação do parâmetro  $d$  de distância em função do intervalo do raio da ponta

Assim, para raios de ponta do AFM com valores superiores a 15 nm não há necessidade do parâmetro  $d$  ser variável e função de  $R$ , o que torna a área  $A$  (disponível para agrupar as enzimas úteis) da superfície da ponta do AFM uma

função apenas de  $R$ . Para valores de  $R$  entre  $P/2$  (aproximadamente 3) e 15 nm, somente a enzima localizada no polo da superfície esférica da ponta do AFM irá interagir especificamente com o substrato.

O número de enzimas úteis  $N$  para pontas de AFM com raio  $>15$  nm deve ser a razão entre a área  $A$  da ponta do AFM disponível para agrupar as enzimas úteis pela área  $A_m$  correspondente a área média da superfície de interação do modelo rígido para a enzima ACCase (equação 4).

$$N = \frac{2\pi dR}{A_m} \quad (4)$$

Para qualquer  $R, N$  pode ser representado pela curva  $R \times N$  da figura 12.

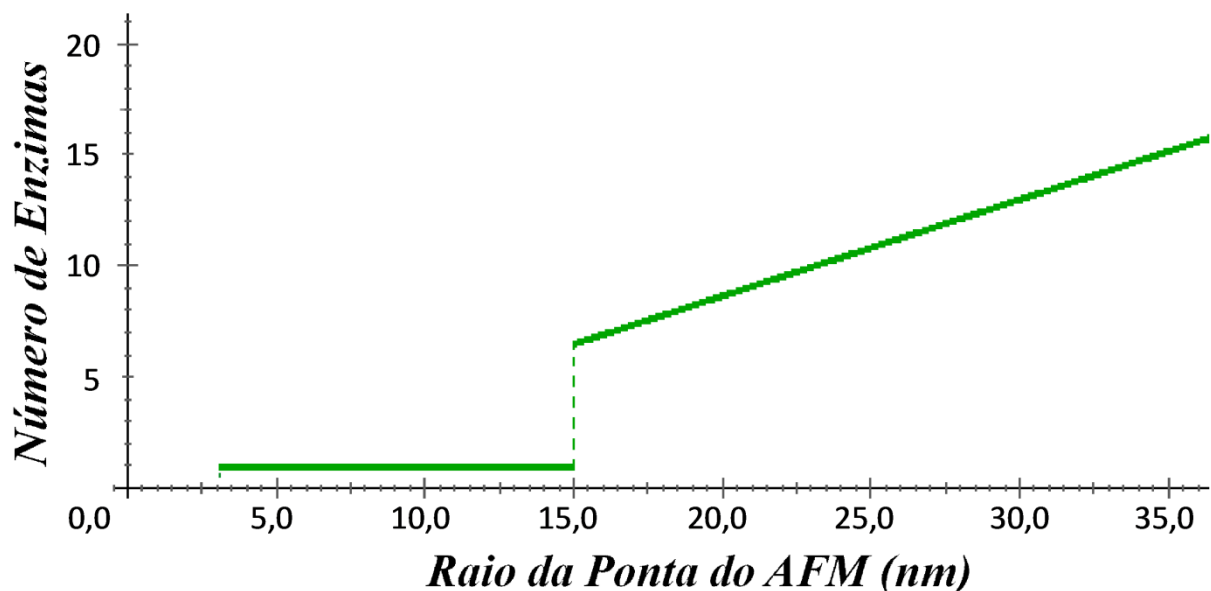


FIGURA 12 – Número de enzimas úteis que podem ser funcionalizadas em função do Raio da ponta do AFM.

O valor do raio da ponta do AFM (utilizada no experimento do nanobiossensor) especificado pelo fabricante é  $R < 20$  nm, enquanto o valor mínimo para que ocorra a interações específicas com o substrato, envolvendo mais de uma enzima ACCase funcionalizada, calculado teoricamente é 15 nm. Essas especificações definem o valor do raio da ponta utilizada experimentalmente

como sendo um valor entre 16 (valor maior que 15 nm) e 20 nm, ou  $(18,0 \pm 2,0)$  nm. Desta forma, o número de enzimas úteis na superfície da ponta do AFM é descrito de acordo com o cálculo em (5).

$$N = \frac{2\pi \cdot 2 \cdot (18,0 \pm 2,0)}{34,8 \pm 2,6} = (6,5 \pm 1,2) \text{ Enzimas} \quad (5)$$

Para o valor do raio da ponta do AFM de 18,0 nm, o parâmetro de profundidade  $d = 2,0$  nm define uma superfície de semiesfera de raio maior 8,2 nm formando uma circunferência. A figura 13 indica a vista superior (ponto de vista do substrato) do polo da ponta do AFM funcionalizada com sete enzimas ACC úteis sendo limitada pela semiesfera de área  $(2\pi \cdot 2 \cdot 18)$ . O arranjo das 7 enzimas dentro das limitações da área da circunferência da FIG. 13 é um arranjo esperado, de acordo com as probabilidades das figuras 4, 5 e 6. A forma como as enzimas se acoplam é uma previsão feita pelo modelo rígido, ainda não comprovada experimentalmente.



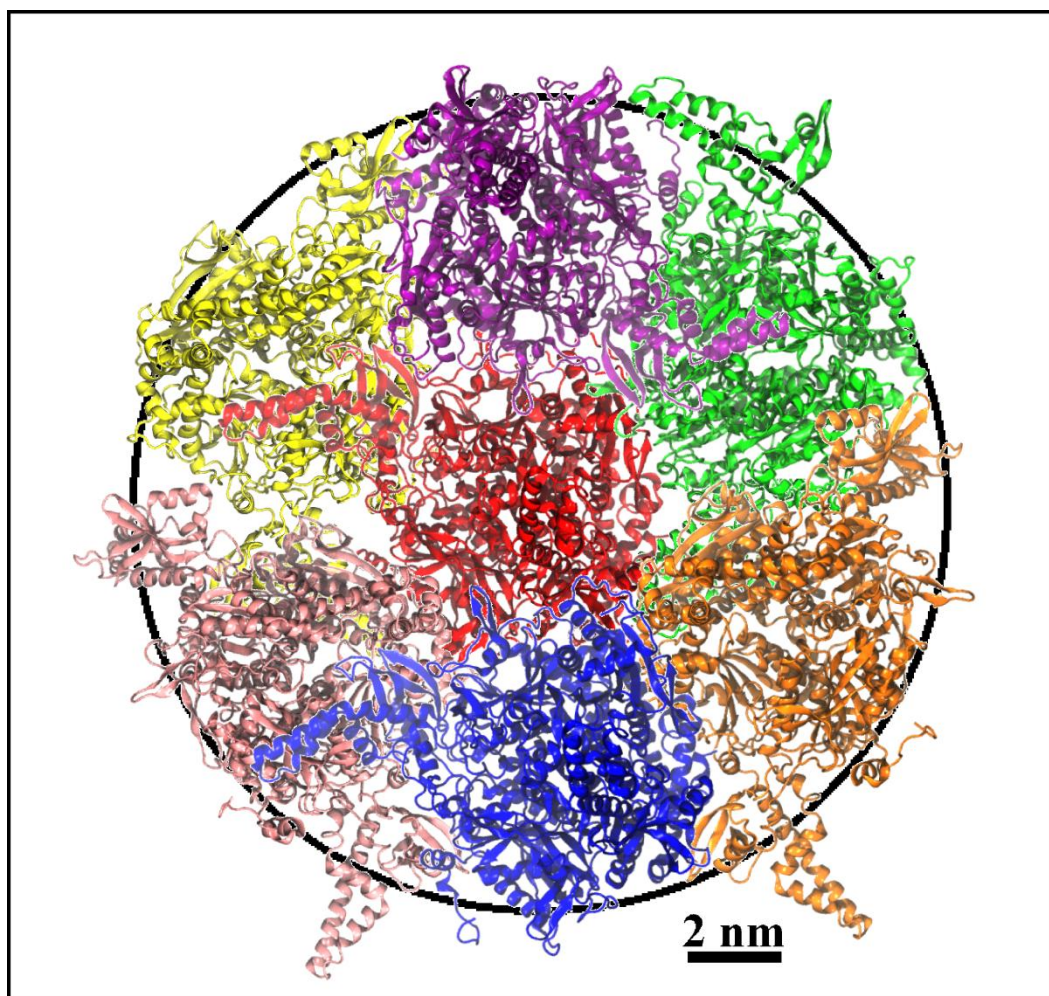


FIGURA 13 – Arranjo esperado de enzimas ACC numa semiesfera de raio maior que 8,2.