



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



**“ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FAD EM
OXIDORREDUTASES”**

RUI FILIPE NOGUEIRA DA SILVA

**São Carlos
2015**

RUI FILIPE NOGUEIRA DA SILVA*

“ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FAD EM OXIDORREDUTASES”

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Profa. Dra. Ignez Caracelli
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

* Bolsista CNPq/Processo 166636/2013-4

São Carlos – SP
2015

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

S586ac Silva, Rui Filipe Nogueira da.
Análise das características estruturais do FAD em
oxidorreduções. / Rui Filipe Nogueira da Silva -- São
Carlos : UFSCar, 2015.
116 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Biotecnologia. 2. Glutathione redutase. 3.
Oxidorreduções. 4. Tripanotona redutase. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rui Filipe Nogueira da Silva, realizada em 11/08/2015:

Profa. Dra. Ignez Caracelli
UFSCar

Profa. Dra. Regina Helena de Almeida Santos
IQSC/USP

Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira
UFSCar

RUI FILIPE NOGUEIRA DA SILVA

“ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FAD EM OXIDORREDUTASES”

Monografia apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ignez Caracelli (DF – UFSCar)

Profa. Dra. Regina Helena de Almeida Santos (IQSC – USP)

Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira (DQ – UFSCar)

São Carlos
2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Etelvina e José, à minha querida irmã Sandra e, sobretudo, à minha fabulosa esposa Sandrina.

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo e de todos, a Deus, pelas capacidades que me facultou, pelas oportunidades que me colocou, e pela tranquilidade nos momentos de dificuldades.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Ignez Caracelli e Professor Doutor Julio Zukerman Schpector, que me acolheram sem reservas e me vão sabendo dar ensinamentos sobre as ciências da vida, e cuja dívida de gratidão nunca conseguirei pagar.

À minha esposa, e eterna namorada, Sandrina Silva, pelo amor, pela companhia, pela paz, pela ternura, pela motivação e pela persistência que me soube e sabe transmitir, em todos os momentos da nossa vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, que me ajudaram a expandir os horizontes do conhecimento.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Cristalografia Estereodinâmica e Modelagem Molecular (LaCrEMM), do Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas (BioMat), e do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais (LSPN) da UFSCar, por me terem recebido de braços abertos e terem partilhado um pouco de si, contribuindo para o meu crescimento.

Ao Professor Kléber Thiago de Oliveira, cuja gentileza e amizade me permitiram quebrar a barreira de um oceano e explorar uma vida diferente.

Ao amigo e colega César Sacco, por ter cedido o programa de mapeamento vetorial e o tempo precioso que lhe levou a ensinar-me a utilizá-lo.

Aos amigos de São Carlos, que ficarão solenemente inscritos na minha história, pelo carinho com que souberam partilhar a sua vida e participar da minha.

Aos meus familiares distantes, que sempre acreditaram no meu valor e me apoiaram em todas as escolhas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa concedida.

Silva, Rui Filipe Nogueira da. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FAD EM OXIDORREDUTASES. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2015.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas oxidorredutases das sub-subclasses glutational redutases (GR), tripanotiona redutases (TR) e sulfidril oxidases (SOX) que são enzimas dependentes de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e contêm um grupo com enxofre como aceitador/doador de cargas, próximo à região isoaloxazina do FAD.

As oxidorredutases são enzimas capazes de catalisar reações redox, necessitando, para tal, de grupos doadores e grupos aceptadores de cargas. O FAD é um cofator das oxidorredutases e participa na catálise enzimática, intermediando a transferência de cargas entre ligantes e a cadeia polipeptídica das proteínas. Os grupos tiol e as ligações dissulfeto existentes nas enzimas estão, em muitos casos, envolvidos nessas transferências de prótons e elétrons em conjunto com o FAD.

Foi realizado o estudo da conformação da região isoaloxazina do FAD e de interações π entre os átomos de enxofre e a flavina do FAD.

Foram analisadas 180 estruturas cristalográficas de oxidorredutases com FAD e ligações dissulfeto obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) o que permitiu relacionar os comprimentos da ligação dissulfeto em proteínas e em pequenas moléculas, classificar deformações da isoaloxazina do FAD, determinar distâncias de interação SG- π e perceber características do FAD que permitem diferenciar as sub-subclasses de GR, TR e SOX.

Palavras-chave: FAD, interações π , dissulfeto, S- π , oxidorredutases, glutational redutase, tripanotiona redutase, sulfidril oxidase.

Silva, Rui Filipe Nogueira da. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FAD EM OXIDORREDUTASES. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2015.

ABSTRACT

In this work, oxidoreductases of the glutathione reductase (GR), trypanothione reductase (TR) and sulfhydryl oxidase (SOX) sub-subclasses that are FAD (flavin adenine dinucleotide) dependent enzymes and contain a group with sulfur as a charge acceptor/donor near the FAD isoalloxazine region were studied. Oxidoreductases are enzymes capable of catalyzing redox reactions, thus requiring donor groups and acceptor groups of charges. FAD is a cofactor of the oxidoreductases and participates in the enzymatic catalysis, brokering the transfer of charges between ligands and the polypeptide chain of the proteins. The thiol groups and disulfide bonds existing in the enzymes are, in many instances, involved in these transfer of protons and electrons together with the FAD. The conformation of the isoalloxazine region of the FAD and the π interactions between the sulfur atoms and the flavin region were studied. The crystal structures of 180 oxidoreductases with FAD and disulfide bonds retrieved from the Protein Data Bank (PDB) were analyzed, which allowed to set up some relationships between the bond lengths of the disulfide bridge in proteins and in small molecules, to determine the existence of deformations of the isoalloxazine moiety of the FAD, to measure the SG- π interaction distances and realize some FAD features that help differentiate the GR, TR and SOX sub-subclasses.

Key Words: FAD, π interactions, disulfide, S- π , oxidoreductases, glutathione reductase, trypanothione reductase, sulfhydryl oxidase.

LISTA DE FIGURAS

| Capítulo 1 – Introdução | | página |
|--------------------------------|--|---------------|
| Figura 1.1 | Ligação peptídica entre dois aminoácidos. R_1 e R_2 representam as cadeias laterais dos dois aminoácidos ligados. | 3 |
| Figura 1.2 | Classificação da estrutura das proteínas. As estruturas terciária e quaternária apresentam o exemplo da enzima oxidoredutase com o código PDB 2YQU: (c) uma subunidade isolada da enzima; (d) as duas subunidades na unidade biológica da enzima. O FAD é um cofator não proteico que é incluído na proteína durante o enovelamento global. | 7 |
| Figura 1.3 | Reação de formação e quebra de uma ligação peptídica. Os átomos que originam a molécula de água estão coloridos de rosa. O grupo amida formado está sombreado a verde. Adaptado de NELSON, D.; COX, M. 2008. | 10 |
| Figura 1.4 | Representação dos isômeros <i>trans</i> e <i>cis</i> de um resíduo de prolina, numa cadeia polipeptídica. Adaptado de NELSON, D.; COX, M. 2008. | 11 |
| Figura 1.5 | Esquema geral da reação de formação e quebra de uma ligação dissulfeto entre duas cisteínas (CYS_1 e CYS_2). | 12 |
| Figura 1.6 | Representação da ligação dissulfeto na região catalítica de uma enzima. PDB-ID: 1AOG. | 13 |
| Figura 1.7 | Exemplo de uma ponte salina entre um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de arginina em 1AOG. A distância entre os sistemas interagindo é de 3,05 Å. | 15 |
| Figura 1.8 | Representação dos descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio. D - átomo eletronegativo ligado covalentemente ao hidrogênio (doador). H - átomo de hidrogênio. A - átomo eletronegativo acceptor do hidrogênio (na figura, está representado um par isolado de elétrons de A na direção de H). | 15 |
| Figura 1.9 | Representação do orbital π ligante no etileno (esquerda) e um orbital π ligante do benzeno (direita). No etileno, os dois elétrons π estão localizados entre os átomos de carbono. No benzeno, os 6 elétrons π estão delocalizados nas 6 ligações covalentes entre os átomos de carbono. Imagens adaptadas de CAREY, F. A.; GIULIANO, R. M., 2011. | 17 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figura 1.10 | Três classes de interações π - π : A – <i>face-to-face</i> ; B – <i>parallel-displaced</i> ; C – <i>T-shaped</i> . D representa os descritores geométricos que intervêm numa interação LP- π : Cg – centroide do anel aromático; V_1 – vetor normal ao anel aromático no centroide; V_2 – vetor que liga a posição do LP com Cg; α – ângulo entre V_1 e V_2 ; d – distância do LP ao Cg; M – elemento metálico (ou outro, com LP). | 19 |
| Figura 1.11 | Classificação das interações π : a – localizada; b – semi-localizada; c – delocalizada. A letra X pode representar um átomo/íon, um par de elétrons, ou um centroide de um sistema aromático. (Adaptado de Caracelli, I., <i>et al</i> , 2013.) | 19 |
| Figura 1.12 | Representação da reação catalisada pelas enzimas GR. Salienta-se a necessidade do NADH. | 21 |
| Figura 1.13 | Representação do mecanismo de atuação de glutathione dissulfeto redutases. (Adaptado de VOET, D.; VOET, J. 1995). | 22 |
| Figura 1.14 | Representação da reação catalisada pelas enzimas TR. Salienta-se a necessidade do NADPH. | 23 |
| Figura 1.15 | Representação do flavina adenina dinucleotídeo – FAD – reduzido. Os átomos de hidrogênio não estão representados. | 26 |
| Figura 1.16 | Representação da molécula FAD, salientando os dois nucleotídeos ligados pelos grupos fosfato. | 26 |
| Figura 1.17 | Representação da região isoaloxazina do FAD reduzido. Os átomos estão numerados de acordo com a designação atribuída nos arquivos do <i>Protein Data Bank</i> . As letras U, P e B correspondem a uma classificação atribuída, no presente trabalho, aos anéis uracílico, pirazínico e dimetilbenzênico, respetivamente. | 27 |
| Figura 1.18 | Representação da região isoaloxazina do FAD oxidado. Em comparação com a FIGURA 1.17, os átomos N5 e N1 encontram-se sem os átomos de hidrogênio. | 27 |
| Figura 1.19 | Nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD. Os átomos de hidrogênio não estão representados. | 30 |

Capítulo 2 – Materiais e métodos

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 2.1 | Variação anual, desde 1975, do número de estruturas depositadas no PDB obtidas por difração de raios X. O número 96 768 é válido para o dia 25/03/2015. | 34 |
| Figura 2.2 | Representação da distribuição das estruturas de enzimas depositadas no PDB por classes. 17.4% das estruturas de enzimas correspondem a oxidoreductases. (http://www.rcsb.org/pdb/ Acessado em 27/07/2015) | 34 |

Figura 2.3 Representação exemplificativa dos descritores geométricos utilizados no cálculo das interações SG- π : **Ct** – Centroide do anel aromático; **SG** – Átomo de enxofre na posição gama; $\vec{\alpha}$ – Vetor normal ao plano do anel aromático em Ct; $\vec{SG} - \vec{\pi}$ – Vetor que liga SG a Ct; θ – Ângulo entre $\vec{\alpha}$ e $\vec{SG} - \vec{\pi}$; **Ct'** – Ponto médio da ligação C-C no anel aromático que se encontra mais próximo de SG; $\vec{SG} - \vec{Ct'}$ – Vetor que liga SG a Ct'; χ_3 – Ângulo diedro da ligação dissulfeto. O plano do anel aromático está representado pela figura sombreada **P**. **38**

Figura 2.4 Representação do FAD e dos respectivos centroides utilizados no cálculo vetorial. Em branco encontram-se desenhados os centroides dos anéis das regiões isoaloxazina e adenina do FAD (Ct1 a Ct5). Em roxo, mostram-se os centroides médios entre os anéis da isoaloxazina do FAD (Cm12 e Cm23). **38**

Capítulo 3 – Resultados e Discussão página

Figura 3.1 Representação gráfica da percentagem das estruturas analisadas (180) com interações do tipo SG- π (102) em verde, sem interações SG- π (66) em amarelo, e sem átomos de enxofre envolvidos em interações SG- π (12) em cinzento. **43**

Figura 3.2 Detalhe de interação SG-H $\cdots\pi$. A distância de 1,853 Å permite considerar uma ligação de hidrogênio semi-localizada entre o átomo de enxofre e o centroide CmC7-C8 da isoaloxazina do FAD. O código PDB da estrutura é 2Q0L. **44**

Figura 3.3 Detalhe de interação SG(LP) $\cdots\pi$. As distâncias apresentadas mostram uma proximidade maior do átomo de enxofre para o centroide da ligação dupla C4X-C10 e para o átomo C4X da isoaloxazina do FAD. O código PDB da estrutura é 1JR8. **44**

Figura 3.4 Exemplo de uma ligação dissulfeto incorretamente determinada pelo programa de cálculo, colorida em vermelho (distâncias em Å). O código PDB deste exemplo é 3DK4. **45**

Figura 3.5 Exemplo de possível interação do tipo S(LP)- π entre um átomo SG em dissulfeto e o sistema indólico de um triptofano. O código PDB deste exemplo é 3M31. **46**

Figura 3.6 Distribuição das distâncias de interação S- π , de acordo com o tipo de interação. **48**

Figura 3.7 Dois exemplos das conformações mais extremas do FAD encontradas no decurso do trabalho. Na esquerda, FAD “distendido”, com distância de 18.50 Å entre o anel B e o anel de seis membros da adenina (PDB-ID: 2EQ6). Na direita, FAD “em U”, com distância de 11.30 Å entre o anel B e o anel de seis membros da adenina (PDB-ID: 1JR8). **49**

- Figura 3.8** O olho e a seta no centro-topo da imagem representam a posição de observação da região isoaloxazina do FAD. O anel U fica na parte superior do campo de observação, enquanto o anel B fica na parte inferior do campo. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **50**
- Figura 3.9** Representação da deformação “planar” da região isoaloxazina do FAD. A linha azul desenhada em frente à isoaloxazina representa a coplanaridade dos anéis U, P e B. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **50**
- Figura 3.10** Representação da deformação “curva” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os planos dos anéis U, P e B. Pode perceber-se a flexão dos anéis U e B para a região posterior da isoaloxazina. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **51**
- Figura 3.11** Representação da deformação “dobra” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os dois planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel B, o anel U e metade do anel P encontram-se fletidos para a região posterior da isoaloxazina. Os átomos de H não estão representados. **51**
- Figura 3.12** Representação da deformação “torção” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os três planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel P, o plano do anel U encontra-se torcionado em sentido horário e o plano do anel P encontra-se torcionado em sentido anti-horário (setas pretas). Os átomos de hidrogênio não estão representados. **52**
- Figura 3.13** Representação da deformação “curva-torção” da região isoaloxazina do FAD, classificada como “outras”. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os três planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel P, o plano do anel U encontra-se torcionado em sentido horário e o plano do anel P encontra-se torcionado em sentido anti-horário (setas pretas). Os átomos de hidrogênio não estão representados. **53**
- Figura 3.14** Representação da deformação, sem designação atribuída, da região isoaloxazina do FAD. Os três anéis estão muito deformados, dificultando a classificação relativa das deformações. Os átomos N5 e N1 estão desprotonados, o que pode contribuir para a deformação observada. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **53**
- Figura 3.15** Comparação do número de estruturas (e do número de FADs) em cada sub-subclasse de oxidorreductases com as deformações observadas. **55**

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figura 3.16 | Representação da deformação “butterfly” da região isoaloxazina do FAD. Os átomos de carbono do FAD da estrutura com código PDB-ID 1ZK7 estão coloridos de cinzento. Os átomos de carbono do FAD da estrutura com código PDB-ID 2Q0L estão coloridos de preto. Os átomos de hidrogênio não estão representados. | 56 |
| Figura 3.17 | Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em GR. Os espaços em branco no eixo das abcissas correspondem a uma segunda molécula do FAD da estrutura anterior no eixo. | 57 |
| Figura 3.18 | Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em GR. | 58 |
| Figura 3.19 | Detalhe da região isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 1K4Q. Pode-se observar a presença de uma ligação dupla entre os átomos N5-C4X e C10-N1. Apenas o átomo de hidrogênio da hidroxila de TYR197 está representado. A ligação C4X-C10 é simples. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. | 60 |
| Figura 3.20 | Detalhe da região isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 3SQP. Apenas o átomo de hidrogênio da hidroxila de TYR197 está representado. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. | 61 |
| Figura 3.21 | Correlação entre as distâncias C4-N3 e N1-C10 em 22 FAD de GR. $R = 0.812$. | 61 |
| Figura 3.22 | Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em TR. Os espaços em branco no eixo das abcissas correspondem a mais do que uma molécula do FAD da estrutura anterior no eixo. | 62 |
| Figura 3.23 | Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em TR. | 63 |
| Figura 3.24 | Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 1FEB. A imagem da esquerda corresponde ao FAD da cadeia A de 1FEB. A imagem da direita corresponde ao FAD da cadeia B de 1FEB. Apenas os átomos de hidrogênio de CA de GLY55 estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. | 65 |

- Figura 3.25** Detalhe da região isoaloxazina de quatro FAD da estrutura PDB-ID 1FEA. Superior esquerda: FAD da cadeia A. Superior direita: FAD da cadeia B. Inferior esquerda: FAD da cadeia C. Inferior direita: FAD da cadeia D. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. **66**
- Figura 3.26** Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 1AOG. Esquerda: FAD da cadeia A. Direita: FAD da cadeia B. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. **67**
- Figura 3.27** Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 1BZL. Esquerda: FAD da cadeia A. Direita: FAD da cadeia B. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos. **67**
- Figura 3.28** Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em SOX. Os espaços em branco no eixo das abcissas, entre os códigos PDB, correspondem a várias moléculas do FAD na estrutura com código anterior no eixo. **69**
- Figura 3.29** Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em SOX. **70**
- Figura 3.30** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3W4Y. Os dois átomos SG, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo) e a cadeia lateral do resíduo de triptofano TRP132. O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **72**
- Figura 3.31** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 4E0H. Os dois átomos SG, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **73**
- Figura 3.32** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3U2L. O átomo SG encontra-se a efetuar ligação de hidrogênio SH- π com o centroide Cm23 (roxo), ou com Ct36 (centroide do anel U) do FAD (branco). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **74**

- Figura 3.33** A ligação de hidrogênio entre SG de CYS145 e Cm23 ou Ct36, da isoaloxazina do FAD em na estrutura PDB-ID 3U2L. A distância de H para Cm23 (roxo) é 1.99 Å, enquanto a distância de H para Ct36 (anel U, branco) é 1.88 Å. Apenas o hidrogênio envolvido na interação está representado. **75**
- Figura 3.34** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3U2M. Não existe qualquer interação SG- π próxima da região isoaloxazina do FAD. O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **75**
- Figura 3.35** Detalhe de um FAD da estrutura PDB-ID 3R7C. Os átomos SG de CYS62 e CYS65, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com os centroides Ct26 e Ct36 do FAD, respectivamente. O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **76**
- Figura 3.36** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3QCP. O átomo SG de CYS353 encontra-se a efetuar interação S(LP)- π com o centroide Ct26 (anel P) do FAD (branco). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **77**
- Figura 3.37** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3MBG. O átomo SG de CYS353 encontra-se a efetuar interação S(LP)- π com o centroide Ct26 (anel P) do FAD (branco). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **78**
- Figura 3.38** Ilustração da grande deformação do anel B do FAD em 3MBG. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **79**
- Figura 3.39** Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3TK0. O átomo SG de CYS145 encontra-se a efetuar ligação de hidrogênio SH- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados. **79**
- Figura 3.40** O átomo N3 do FAD em 3TK0 encontra-se desprotonado, resultando na ligação dupla N3=C4. Apenas se apresenta o átomo de hidrogênio de SG (CYS145). **80**
- Figura 3.41** Correlação entre as distâncias C5X-C6 e C6-C7 em 22 FAD de SOX. R = 0,971. **81**
- Figura 3.42** Correlação entre as distâncias N5-C4X e C4-N3 em 22 FAD de SOX. R = 0,960. **82**

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figura 3.43 | Correlação entre as distâncias C4X-C4 e C4-N3 em 22 FAD de SOX. $R = -0,860$. | 82 |
| Figura 3.44 | Distribuição dos 1632 comprimentos de ligação (Å) S-S em estruturas cristalográficas de pequenas moléculas depositadas no CSD. | 83 |
| Figura 3.45 | Distribuição dos 475 comprimentos de ligação (Å) S-S em 168 estruturas cristalográficas de proteínas oxidoredutases depositadas no PDB. | 84 |
| Figura 3.46 | Representação da ligação dissulfeto “atrás da isoaloxazina” do FAD (PDB-ID: 2C3D). | 85 |
| Figura 3.47 | Possível interação S(LP)-N(LP) com uma histidina (PDB-ID: 2WPF). A imagem também mostra duas potenciais ligações de hidrogênio com átomos de carbono do anel B da isoaloxazina. Apenas os hidrogênios envolvidos nas interações estão representados. | 86 |
| Figura 3.48 | Ligação dissulfeto na “frente” da isoaloxazina do FAD (PDB-ID: 1RP4). | 87 |
| Figura 3.49 | Representação da interação SG(LP)- π (FAD)- π (NAI). PDB-ID: 1ZMD. | 87 |

LISTA DE TABELAS

| Capítulo 1 – Introdução | página |
|--|---------------|
| Tabela 1.1 Nome e código de três letras e uma letra para os aminoácidos/resíduos de aminoácidos. A estrutura bidimensional dos aminoácidos/resíduos é apresentada na configuração neutra. Apenas estão representados os átomos H ligados a N, O, S e Se | 4 |
| Tabela 1.2 Comprimentos padrão de ligações covalentes entre átomos de carbono e entre átomos de carbono e nitrogênio | 28 |
| Capítulo 2 – Materiais e métodos | |
| Tabela 2.1 Parâmetros de cálculo das interações SG- π no programa de cálculo vetorial | 38 |
| Tabela 2.2 Valores máximos que originaram informação visual das distâncias e dos ângulos | 39 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | |
| Tabela 3.1 Interações S- π encontradas na análise de 102 estruturas do PDB | 48 |
| Tabela 3.2 Distribuição das interações por centroide da isoaloxazina do FAD interagindo com S | 48 |
| Tabela 3.3 Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de GR | 54 |
| Tabela 3.4 Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de TR | 54 |
| Tabela 3.5 Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de SOX | 54 |
| Tabela 3.6 Comparação dos comprimentos de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD em GR | 59 |
| Tabela 3.7 Comparação dos comprimentos médio, máximo e mínimo, de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD em TR | 64 |
| Tabela 3.8 Comparação dos comprimentos médio, máximo e mínimo, de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD, em SOX | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ° | <i>Grau</i> |
| Å | <i>Angström</i> |
| Anel B | <i>Anel dimetilbenzênico do FAD</i> |
| Anel P | <i>Anel pirazínico do FAD</i> |
| Anel U | <i>Anel uracílico do FAD</i> |
| BioMat | <i>Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas</i> |
| CA | <i>Carbono alfa</i> |
| Cm | <i>Centroide médio</i> |
| CSD | <i>Cambridge Structural Database</i> |
| Ct | <i>Centroide</i> |
| CYS | <i>Cisteína</i> |
| DSV | <i>Discovery Studio Visualizer</i> |
| EC | <i>Enzyme Classification number</i> |
| FAD | <i>Flavina Adenina Dinucleotídeo</i> |
| GLY | <i>Glicina</i> |
| GR | <i>Glutationa dissulfeto redutase</i> |
| H | <i>Hidrogênio</i> |
| HB | <i>Ligação de hidrogênio (do inglês Hydrogen Bond)</i> |
| HIS | <i>Histidina</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LaCrEMM | <i>Laboratório de Cristalografia Estereodinâmica e Modelagem Molecular</i> |
| LP | <i>Lone pair(s) – par(es) isolado(s) de elétrons</i> |
| NAD | <i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo</i> |
| NE | <i>Nitrogênio épsilon</i> |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PDB-ID | <i>Código de estrutura do PDB</i> |
| PHE | <i>Fenilalanina</i> |
| SG | <i>Enxofre gama</i> |
| SH | <i>Grupo tiol</i> |
| SOX | <i>Sulfidril oxidase</i> |
| TR | <i>Tripanotiona dissulfeto redutase</i> |
| TRP | <i>Triptofano</i> |
| TYR | <i>Tirosina</i> |

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A1** Tabela de descrição das estruturas de 102 oxidoredutases com interações S- π com o FAD e designação das interações: S(LP)- π , ou SH- π , ou outras.
- Apêndice A2** Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em GR.
- Apêndice A3** Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em TR.
- Apêndice A4** Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em SOX.
- Apêndice A5** Distâncias S-FAD medidas nas estruturas do PDB com interações S(LP)- π .

APRESENTAÇÃO

Este trabalho se insere nas linhas de pesquisa do Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas (BioMat) do Departamento de Física e do Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular (LaCrEMM) ambos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As pesquisas desenvolvidas nestes grupos envolvem o estudo de moléculas e de biomoléculas, sempre com enfoque estrutural, com o intuito de entender e caracterizar as interações intermoleculares que servirão de base para a proposição e/ou entendimento de mecanismos de ação de biomoléculas.

Em trabalhos anteriores dos grupos de pesquisa foram estudados elementos como Se e Te (Caracelli, Zukerman-Schpector & Tielink, 2012; Caracelli et al., 2014), Sb e Bi (Caracelli et al., 2013), Au (Caracelli, Zukerman-Schpector & Tielink, 2013), In, Ga e Tl (Caracelli et al., 2014) envolvidos em interações π em sistemas biológicos. Como o número de dados estruturais e parâmetros envolvidos nas interações π é grande, foi desenvolvido um programa que permite a determinação e mapeamento dos centros geométricos (centroides) dos grupos aromáticos e o cálculo de distâncias, ângulos e ângulos diedros a átomos e/ou outros sistemas π . Isto possibilitou um estudo completo de interações π em proteínas e DNA e não somente no sítio ativo, como é feito sistematicamente (Sacco, 2013).

Este trabalho envolveu a garimpagem de bancos de dados de estruturas de moléculas orgânicas e de biomoléculas para embasar um estudo estrutural sobre o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) em enzimas da família das oxidoredutases e suas interações com átomos de S, preferencialmente aqueles envolvidos em ligações dissulfeto, já que o FAD está envolvido no mecanismo de ação estas enzimas. Os estudos realizados estão descritos da seguinte forma: o Capítulo 1 apresenta uma breve introdução sobre as estruturas de proteínas e das interações nas enzimas estudadas. O Capítulo 2 contempla os materiais e métodos, o que inclui uma descrição do sistema de

obtenção das coordenadas das proteínas (*Protein Data Bank* – PDB), o mapeamento vetorial que permitiu calcular centroides de sistemas π e distâncias/ângulos envolvidos nas interações com o enxofre, e a visualização molecular, que permite analisar os dados.

No Capítulo 3, são apresentados e discutidos os resultados dos cálculos e uma análise das conformações do FAD e sua correlação com as classes de enzimas estudadas. No Capítulo 4, é apresentada uma visão geral do trabalho e as conclusões e, finalmente, no Capítulo 5 estão as referências bibliográficas.

Nos apêndices estão organizados os dados referentes à mineração de dados e aos cálculos de interações, bem como tabelas onde os dados obtidos/calculados estão organizados.

SUMÁRIO

| | página |
|---|---------------|
| Resumo | I |
| Abstract | II |
| Lista de Figuras | III |
| Lista de Tabelas | XI |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | XII |
| Lista de Apêndices | XIII |
| Apresentação | XIV |
| | |
| Capítulo 1 – Introdução | 1 |
| 1.1 Proteínas | 2 |
| 1.2 Ligações Covalentes nas Proteínas | 10 |
| 1.2.1 Ligações Peptídicas | 10 |
| 1.2.2 Ligações Dissulfeto | 11 |
| 1.3 Interações Não Covalentes nas Proteínas | 14 |
| 1.3.1 Pontes Salinas (Pares Iônicos) | 14 |
| 1.3.2 Ligações de Hidrogênio | 15 |
| 1.3.3 Interações π | 17 |
| 1.4 Oxidorredutases | 20 |
| 1.4.1 Glutathiona Dissulfeto Redutases (GR) | 20 |
| 1.4.2 Tripanotiona Dissulfeto Redutases (TR) | 22 |
| 1.4.3 Sulfidril Oxidases | 23 |
| 1.5 Ligantes | 25 |
| 1.5.1 Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) | 25 |
| 1.5.2 Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) | 29 |
| 1.6 Objetivos | 31 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 2 – Materiais e métodos | 32 |
| 2.1 Banco de Dados/RCSB Protein Data Bank (PDB) | 32 |
| 2.2 Visualização Molecular | 35 |
| 2.3 Cálculo Vetorial | 37 |
| 2.4 Métodos de Análise | 39 |
| | |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | 43 |
| 3.1 Estruturas em que o S Pode Efetuar Interações SH- π ou S(LP)- π com o FAD (Isoaloxazina) | 43 |
| 3.1.1 Distâncias S- π em Interações com FAD | 46 |
| 3.2 Conformações do FAD | 49 |
| 3.3 Deformações da Região Isoaloxazina do FAD | 50 |
| 3.3.1 Deformação da Isoaloxazina do FAD em GR, TR e SOX | 53 |
| 3.3.2 Deformação “Butterfly” da Região Isoaloxazina do FAD | 56 |
| 3.4 Comprimentos de Ligação da Região Isoaloxazina do FAD (GR, TR, SOX) | 56 |
| 3.4.1 Glutathiona Redutases (GR) | 56 |
| 3.4.2 Tripanotiona Redutases (TR) | 62 |
| 3.4.3 Sulfidril Oxidases (SOX) | 68 |
| 3.5 Comprimentos das Ligações Dissulfeto | 83 |
| 3.6 Posição Relativa da Ligação Dissulfeto em Relação à Isoaloxazina | 85 |
| 3.7 Interações SG- π (NAD) | 87 |
| | |
| Capítulo 4 – Conclusões | 88 |
| Capítulo 5 – Referências Bibliográficas | 92 |
| Apêndices | 97 |

1. INTRODUÇÃO

A Vida, no nosso planeta, assume numerosas manifestações. A enorme diversidade de seres vivos conflui numa impressionantemente pequena variedade de estruturas biomoleculares simples: ácidos nucleicos, protídeos, lipídios e glicídios, comuns a todos os organismos e microrganismos conhecidos. Embora com modificações estruturais e/ou funcionais, biomoléculas muito semelhantes estão presentes em grupos de organismos muito diferentes. Se, por um lado, as biomoléculas interagem entre si para realizar as respectivas funções (Cui et al. 2015), por outro lado, as interações que ocorrem dentro de cada biomolécula são, também, de grande importância para a estabilidade molecular. As interações intramoleculares e intermoleculares são as responsáveis pela manutenção da estrutura e das funções de todas as biomoléculas. Toda a atuação de todas as biomoléculas no meio fisiológico é determinada por energias de ligações e de interações, entre si e com outras moléculas do meio.

De acordo com uma linha do nosso Grupo de Pesquisa, a coleta de dados de estruturas cristalográficas de biomoléculas, bem como a respetiva análise e possível comparação com outros dados, já obtidos ou passíveis de serem obtidos, foi uma abordagem com o interesse de procurar padrões nas estruturas e traduzi-los em dados válidos, para posteriores estudos de Biofísica Estrutural e Bioquímica Estrutural.

O presente trabalho apresenta como foram procuradas possíveis interações entre ligantes e proteínas, descrevendo algumas situações que definiram um padrão e, portanto, mereceram exploração mais detalhada. Apresenta-se, ainda, uma análise estatística básica de alguns dados obtidos, permitindo futuras comparações com novos dados em bancos de dados. De forma crítica, também se salientam alguns casos em que os dados utilizados possuem um possível erro experimental “a montante”, pelo que não são passíveis de uma análise criteriosa, em conjunto com outros dados.

1.1. PROTEÍNAS

As proteínas são biomoléculas presentes em todos os seres vivos, que, na sua constituição básica, contêm resíduos de aminoácidos ligados em cadeia por ligações peptídicas. As proteínas são macromoléculas e, de forma simples, podemos considerá-las como polímeros de aminoácidos. Apesar de, em todos os seres vivos, apenas existirem 22 aminoácidos proteinogênicos (HASTINGS et al., 2013), isto é, codificados no DNA e transcritos do RNA nos seres vivos, a sua organização nas proteínas leva a diferenças estruturais muito significativas.

Ligados ao átomo de carbono alfa (C_{α} ou CA), em todos os resíduos de aminoácidos da sequência polipeptídica, estão um átomo de hidrogênio e a cadeia lateral -R (FIGURA 1.1), específica de cada aminoácido. A designação dos grupos ligados ao carbono alfa (CA), em cada resíduo de aminoácido é: átomo de hidrogênio (-H); grupo amina (-NH-); grupo carbonila (-CO-); e cadeia lateral (-R). Os átomos da cadeia lateral são usualmente designados como beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ) (CARACELLI & ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2009). As informações dos arquivos de texto nos vários bancos de dados de estruturas cristalográficas seguem a designação mais simples: A – alfa; B – beta; G – gama; D – delta; E – épsilon; e Z – zeta.

As ligações peptídicas são um tipo de ligação covalente entre o átomo de nitrogênio (N) ligado ao carbono alfa (CA) de um aminoácido e um átomo de carbono (C) da carbonila ligado ao CA de outro aminoácido, formando um grupo amida (R-CO-NH-R'), como mostra a FIGURA 1.1 Trata-se de uma ligação com comprimento mais curto (1,32 Å) do que o comprimento da ligação C-N nas aminas (1,46 Å), pois a ligação tem caráter parcial de ligação dupla, devido a ressonância entre os elétrons do *lone pair* (LP) do nitrogênio da amina, e isso a torna planar e rígida (NELSON & COX, 2008).

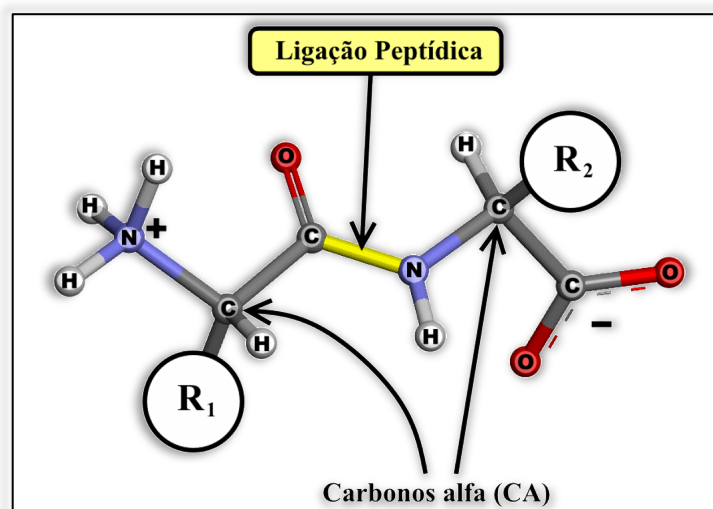


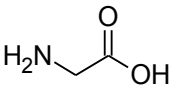
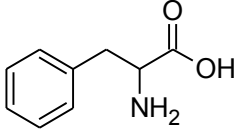
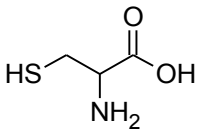
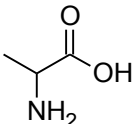
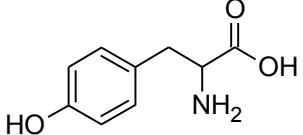
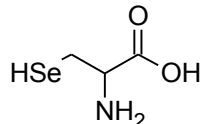
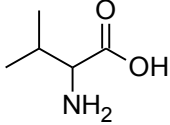
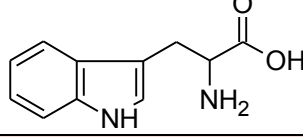
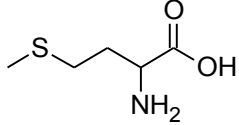
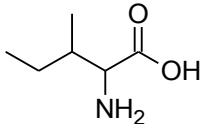
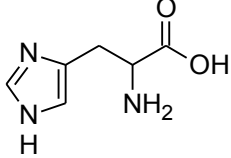
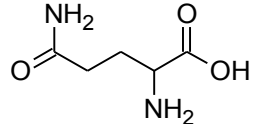
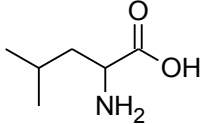
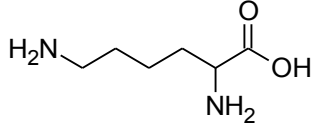
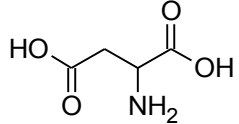
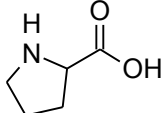
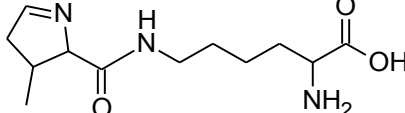
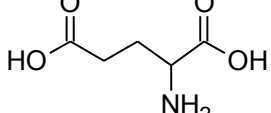
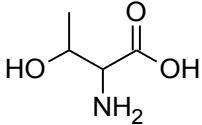
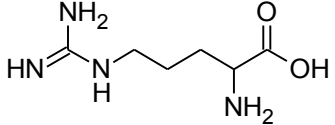
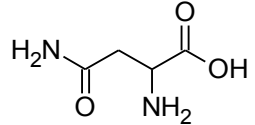
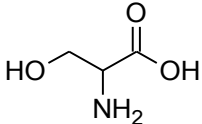
FIGURA 1.1. Ligação peptídica entre dois aminoácidos. R_1 e R_2 representam as cadeias laterais dos dois aminoácidos ligados.

Os diferentes grupos R possuem propriedades físico-químicas diferentes entre si, pois a sua dimensão e composição atômica são específicas de cada aminoácido/resíduo. A TABELA 1.1 apresenta a estrutura dos 22 aminoácidos. Assim, em meio fisiológico, existem aminoácidos com cadeia lateral carregada (LYS, ARG, ASN, GLU, HIS), aminoácidos com cadeia lateral polar não carregada (SER, THR, CYS, SEL, ASP, GLN, PYL, TYR, TRP), e aminoácidos com cadeia lateral apolar (GLY, ALA, VAL, ILE, LEU, PRO, MET, PHE) (VOET, VOET, 1995).

Todos os aminoácidos são α -aminoácidos, pois possuem os grupos amina e carboxila ligados ao átomo CA. O átomo CA é um centro quiral em todos os aminoácidos/resíduos de aminoácidos, exceto no caso da glicina. De acordo com IUPAC, 2006-, centro quiral é todo aquele que tiver ligados a si quatro grupos diferentes. O grupo R da glicina é um átomo de hidrogênio, o que faz com que o CA tenha dois grupos H ligados a si, logo, não é um centro quiral.

Todos os aminoácidos proteínogênicos são sintetizados nos organismos como L-aminoácidos. Esta designação decorre do fato que, quando observados sob luz polarizada, eles desviam o plano da luz polarizada para a esquerda (VOET, VOET, 1995).

TABELA 1.1. Nome e código de três letras e uma letra para os aminoácidos/resíduos de aminoácidos. A estrutura bidimensional dos aminoácidos/resíduos é apresentada na configuração neutra. Apenas estão representados os átomos H ligados a N, O, S e Se

| | | |
|---|---|---|
| Glicina (GLY) (G) | Fenilalanina (PHE) (F) | Cisteína (CYS) (C) |
|  |  |  |
| Alanina (ALA) (A) | Tirosina (TYR) (Y) | Selenocisteína (SEL) (U) |
|  |  |  |
| Valina (VAL) (V) | Triptofano (TRP) (W) | Metionina (MET) (M) |
|  |  |  |
| Isoleucina (ILE) (I) | Histidina (HIS) (H) | Glutamina (GLN) (Q) |
|  |  |  |
| Leucina (LEU) (L) | Lisina (LYS) (K) | Ácido Aspártico (ASP) (D) |
|  |  |  |
| Prolina (PRO) (P) | Pirrolisina (PYL) (O) | Ácido Glutâmico (GLU) (E) |
|  |  |  |
| Treonina (THR) (T) | Arginina (ARG) (R) | Asparagina (ASN) (N) |
|  |  |  |
| Serina (SER) (S) | | |
|  | | |

Quando integrado na estrutura de uma proteína, cada aminoácido passa a designar-se resíduo de aminoácido, pois já não possui os grupos α -amino e α -carboxílico livres. Como a ligação peptídica ocorre sempre nos átomos N e C_1 ligados ao CA, de cada aminoácido, isso leva à formação de uma sequência

de átomos, nas cadeias polipeptídicas, comum a todas as proteínas: ...-N-CA-C₁-N-CA-C₁-N-CA-C₁-... O modo como as cadeias laterais (-R) interagem na proteína e entre a proteína e outras moléculas interfere com a estrutura terciária e quaternária da proteína, bem como com a atividade da proteína (NELSON, COX, 2008).

As proteínas podem ser classificadas de acordo com a função que apresentam nos sistemas biológicos. Alguns exemplos de funções biológicas das proteínas são a catálise de reações metabólicas, realizada pelas enzimas, o transporte de substâncias pelo organismo e através das membranas celulares, realizado pelas proteínas transportadoras, a emissão e propagação de sinais nas células, realizada pelas proteínas sinalizadoras, e diversas funções estruturais. (LODISH et al., 2003). As enzimas são um grupo de proteínas que catalisa reações químicas no meio biológico e são, portanto, classificadas de acordo com as reações em que intervêm (BERG, TYMOCZKO & STRYER, 2002).

Para serem biomoléculas funcionais, as proteínas podem, ou não, ter associadas outras moléculas, de natureza química diferente, não proteica. Quando essas moléculas são incorporadas na proteína durante o seu enovelamento, fazendo obrigatoriamente parte da proteína funcional, designam-se cofatores. Um famoso exemplo de um cofator é o grupo heme, na hemoglobina. Se as moléculas só interagem com a proteína no momento da reação por ela operada, libertando-se em seguida e não estando permanentemente ligadas à proteína, designam-se coenzimas. Ainda, moléculas que interagem com a proteína resultando na diminuição da sua atividade designam-se inibidores e outras moléculas que interagem com a proteína aumentando a sua atividade catalítica designam-se ativadores. Às porções das enzimas que não possuem os cofatores integrados se dá o nome de apoenzimas. Quando as enzimas estão com os cofatores presentes e são funcionais, se designam holoenzimas (NELSON, COX, 2008).

Dependendo da sua função, as proteínas podem estar associadas a outras biomoléculas, como glicídios e/ou lipídios, sendo designadas, respetivamente, glicoproteínas e lipoproteínas e realizando uma ação específica no local do organismo onde se encontram.

As proteínas, e as enzimas, podem ser classificadas, quanto à sua organização estrutural, em quatro níveis diferentes (FIGURA 1.2):

- Estrutura primária – apenas se considera a sequência de aminoácidos (FIGURA 1.2a);
- Estrutura secundária – se considera o enovelamento local das cadeias/fitas polipeptídicas (a FIGURA 1.2b apresenta um motivo clássico da estrutura secundária, a α -hélice); as ligações de hidrogênio mantêm a estrutura da hélice, ao mesmo tempo que lhe conferem alguma flexibilidade; as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (não representadas) ficam orientadas para o exterior da hélice;
- Estrutura terciária – se considera o enovelamento global das cadeias/fitas e as ligações dissulfeto entre cisteínas (FIGURA 1.2c); as interações entre as cadeias laterais R dos resíduos de aminoácidos entre si e com o solvente (água) são responsáveis pelo arranjo tridimensional da estrutura;
- Estrutura quaternária – se considera as interações entre subunidades de estrutura terciária (FIGURA 1.2d).

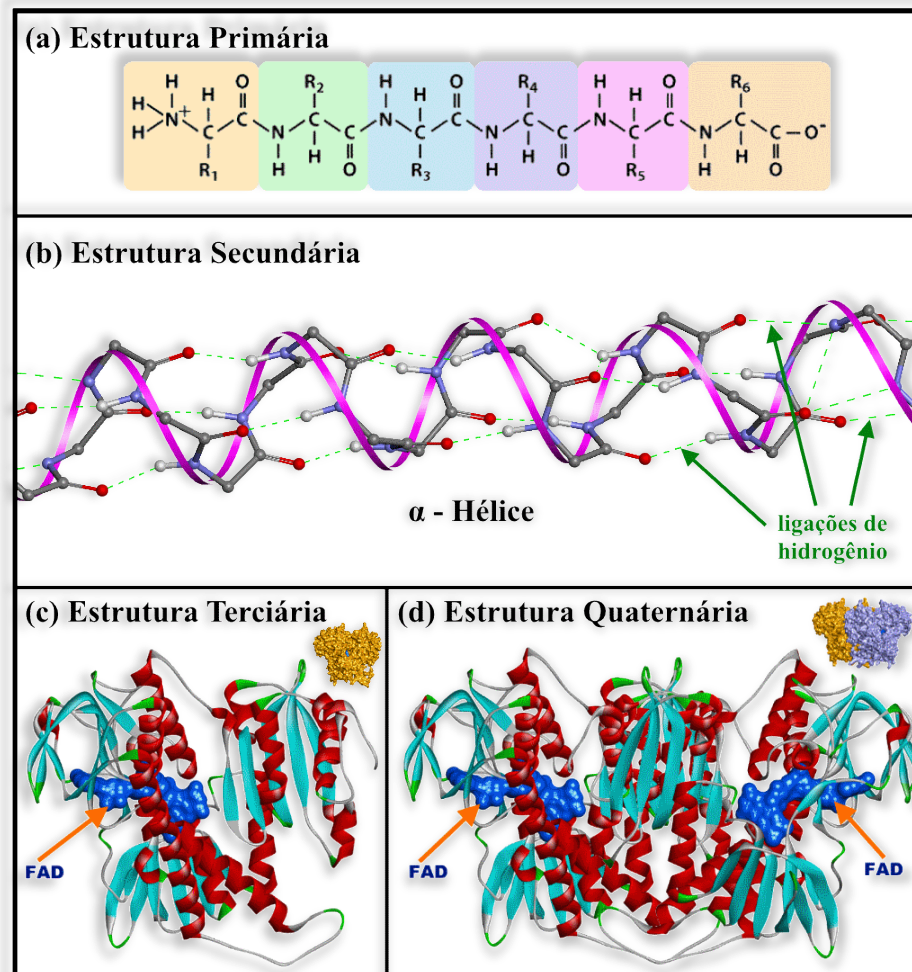


FIGURA 1.2. Classificação da estrutura das proteínas. As estruturas terciária e quaternária apresentam o exemplo da enzima oxidoreductase com o código PDB 2YQU: (c) uma subunidade isolada da enzima; (d) as duas subunidades na unidade biológica da enzima. O FAD é um cofator não proteico que é incluído na proteína durante o enovelamento global.

Numerosas doenças estão relacionadas com o funcionamento inadequado de proteínas específicas, mas também com a sua inibição ou sobre expressão. Também o enovelamento (inglês: *fold*ing) das proteínas, processo muito estudado, mas elusivo, pode estar na origem de vários distúrbios genéticos humanos (LODISH et al., 2003). Podemos considerar dois níveis de enovelamento das proteínas: o local e o global. Ambos estão intimamente relacionados com a sequência de resíduos de aminoácidos que origina a estrutura primária. O enovelamento local decorre do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios da fita principal da estrutura primária e os átomos de oxigênio da carbonila do carbono C_1 , ao longo da mesma fita: $R-N-H \cdots O=C_1-R'$. Esse enovelamento resulta em

dois motivos clássicos de estrutura secundária, as hélices α e as folhas β . Ambos ocorrem comumente nas proteínas e são importantes para que estas adquiram a sua função. A desnaturação por aumento da temperatura quebra as ligações de hidrogênio que mantêm as fitas nos motivos adequados, o que resulta num refazer dessas ligações desorganizado, quando a temperatura baixa. Há outros motivos de estrutura secundária, como outras hélices, *turns* (curvas) e *loops* (voltas), com funções específicas na ação das proteínas. Quando estes motivos são desfeitos, ou modificados pela presença de substâncias não proteicas estranhas, ocorre diminuição da atividade/função da proteína – inibição.

O segundo tipo de enovelamento, o global, ocorre durante a organização da estrutura terciária da proteína. Os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais polares e/ou carregadas ficam, geralmente, voltados para o meio aquoso onde a proteína enovela. Os resíduos com cadeias laterais apolares não carregadas ficam, geralmente, voltados para cavidades internas na proteína. Formam-se, também, as ligações dissulfeto, entre resíduos de cisteína, por oxidação dos grupos tiol das cadeias laterais de duas cisteínas próximas espacialmente (embora possam estar muito separadas na sequência polipeptídica – estrutura primária). Ainda se formam algumas interações do tipo ponte salina e ligações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos próximos espacialmente. Todas estas interações promovem a estabilidade da estrutura da proteína e levam à manutenção de uma estrutura funcional no meio fisiológico.

Muitas proteínas envolvidas em processos metabólicos são enzimas. A função das enzimas é realizar a catálise de reações que, espontaneamente no meio fisiológico, demorariam demasiado tempo a ocorrer, ou não ocorreriam favoravelmente. A inibição da atuação enzimática é um processo pelo qual as enzimas são impedidas de realizar a catálise das reações que lhes são específicas, ou têm a sua atividade reduzida. Essa inibição pode ser reversível ou irreversível. A inibição está, geralmente, associada à formação de interações entre elementos das proteínas, aminoácidos ou cofatores, e substâncias

extrínsecas à proteína designadas inibidores, bem como à desnaturação por variação da temperatura (NELSON, COX, 2008). A formação de ligações dos aminoácidos ou dos cofatores nas proteínas com inibidores pode alterar a forma das proteínas em locais específicos, nomeadamente no lugar onde ocorre a reação catalítica, designado sítio ativo. Essa alteração leva à incompatibilidade na ligação dos substratos ao sítio ativo por impedimento estérico ou numa posição desfavorável à reação. Também pode ocorrer inibição proteica em locais diferentes do sítio ativo da proteína, o que pode levar à alteração da conformação da proteína e/ou à alteração de potencial elétrico entre regiões da proteína, resultando em inibição. A inibição reversível ocorre quando as interações entre a proteína e o inibidor são fracas ou levam à formação de um complexo proteína-inibidor instável, resultando na potencial regeneração da proteína funcional. A inibição irreversível ocorre quando o complexo proteína-inibidor é mais estável do que a proteína funcional e resulta, geralmente, do estabelecimento de ligações covalentes estáveis entre os elementos da proteína e o inibidor. A desnaturação por aumento da temperatura também caracteriza inibição irreversível, pois as ligações de hidrogênio que mantêm as estruturas secundária, terciária e quaternária, bem como as ligações dissulfeto, são desfeitas e o seu restabelecimento, caso ocorra, é aleatório, o que resulta, geralmente, numa proteína disfuncional.

As interações que se estabelecem entre os diferentes resíduos de aminoácidos nas proteínas são determinantes para a sua função e estrutura. De todas as ligações e interações existentes, destacamos, além da ligação peptídica descrita acima, as ligações dissulfeto, as pontes salinas, as ligações de hidrogênio, e as interações π .

1.2. LIGAÇÕES COVALENTES NAS PROTEÍNAS

As únicas ligações covalentes que são formadas entre os resíduos de aminoácidos são as ligações peptídicas e as ligações dissulfeto. Na cadeia polipeptídica principal das proteínas, o incremento de aminoácidos ocorre mediante a formação de uma ligação peptídica. A ligação dissulfeto ocorre aquando da reação entre a cadeia lateral polar, não carregada de duas cisteínas, na mesma cadeia polipeptídica, ou em cadeias polipeptídicas diferentes.

1.2.1. LIGAÇÕES PEPTÍDICAS

As ligações peptídicas nas proteínas são ligações covalentes entre o terminal amina de um aminoácido e o terminal carboxila de outro aminoácido. Trata-se de uma reação de condensação, em que se liberta uma molécula de água por cada ligação peptídica formada (FIGURA 1.3).

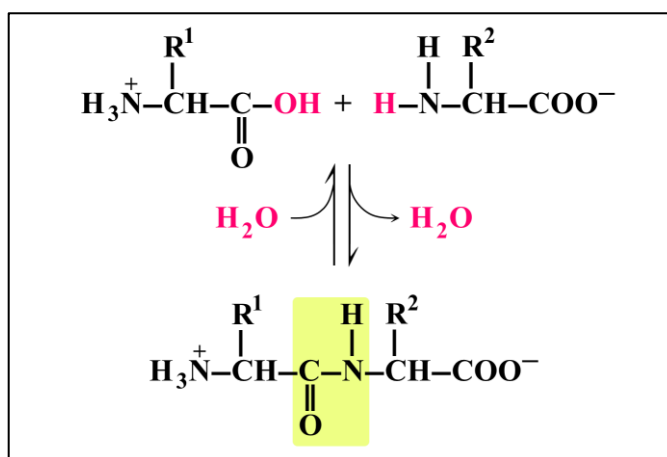


FIGURA 1.3. Reação de formação e quebra de uma ligação peptídica. Os átomos que originam a molécula de água estão coloridos de rosa. O grupo amida formado está sombreado a verde. Adaptado de NELSON, COX, 2008.

A ligação peptídica origina um grupo funcional amida, com uma ligação C-N rígida, pois possui caráter parcial de ligação dupla, devido à ressonância dos elétrons do *lone pair* do nitrogênio. O estabelecimento de ligações peptídicas entre os grupos α -amino e α -carboxílico dos aminoácidos é o responsável pela formação de cadeias polipeptídicas, que podem formar

proteínas. As ligações peptídicas podem originar isômeros *cis*, ou *trans* nos resíduos contíguos ao nitrogênio e ao C₁ da ligação peptídica. Os isômeros *trans* são os mais comuns nas proteínas de origem biológica (mais de 99,95% exceto no caso da prolina). A FIGURA 1.4 apresenta o caso da prolina, com a representação dos seus isômeros *trans* e *cis*.

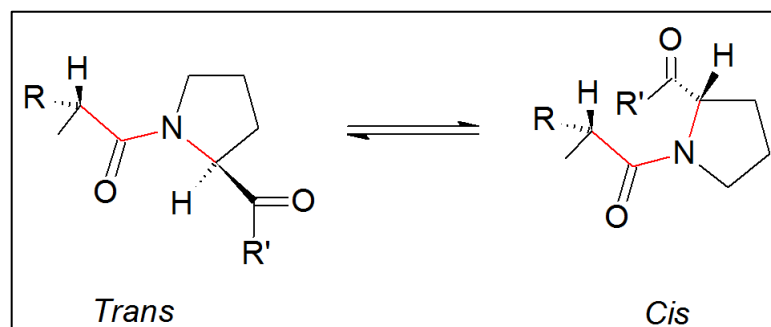


FIGURA 1.4. Representação dos isômeros *trans* e *cis* de um resíduo de prolina, numa cadeia polipeptídica. Adaptado de NELSON & COX, 2008.

No caso da prolina, cerca de 6,0% dos isômeros nas proteínas são *cis* (NELSON & COX, 2008).

1.2.2. LIGAÇÕES DISSULFETO

As ligações dissulfeto são ligações covalentes entre dois átomos de enxofre e, nas proteínas, ocorrem entre as cadeias laterais dos resíduos de cisteínas (CYS, ou C). As ligações dissulfeto são ligações entre o átomo SG (enxofre gama) de uma cisteína e o átomo SG de outra, formando uma ligação (CYS₁)-SG-SG-(CYS₂). Para que possam ser formadas as ligações dissulfeto, as cadeias laterais dos resíduos de cisteínas, com grupos tiol (-SH), devem estar espacialmente próximas. Como, na estrutura primária, muitas vezes os resíduos de cisteína estão afastados de vários resíduos de outros aminoácidos (na ordem de dezenas, ou mais), estas ligações -SG-SG- só se formam durante o enovelamento global, quando é organizada a estrutura terciária das proteínas. As ligações dissulfeto ocorrem quando os grupos tiol de cisteínas espacialmente próximas sofrem oxidação, como representado pela equação da FIGURA 1.5.

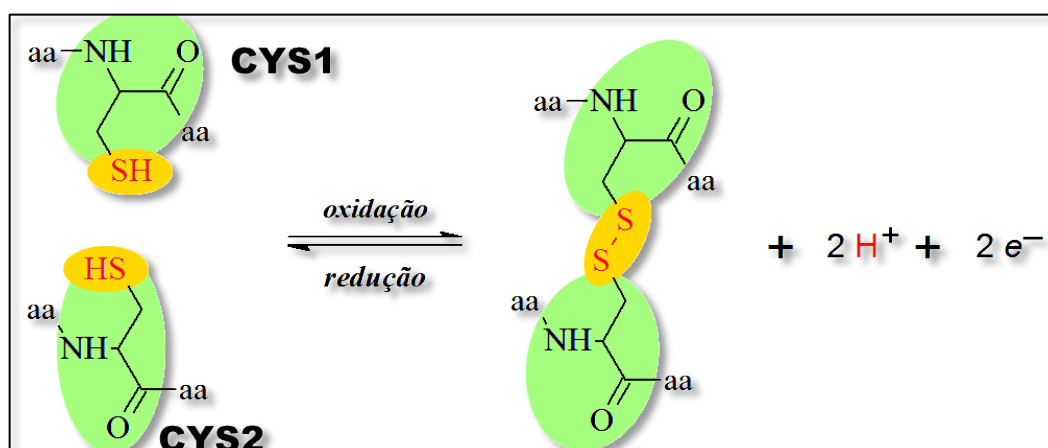


FIGURA 1.5. Esquema geral da reação de formação e quebra de uma ligação dissulfeto entre duas cisteínas (CYS₁ e CYS₂).

O pK_a do grupo tiol da cisteína é 8,14. Em pH fisiológico (pH = 7,0), a cisteína se encontra na forma de tiol (R-SH). Quando o pH > 8,14, a forma ionizada (R-S⁻) predomina. Dessa forma, a posição da cisteína na estrutura tridimensional da proteína e o pH do meio envolvente da cisteína determinam a sua suscetibilidade a formar ligações dissulfeto.

Também podemos observar a formação de ligações dissulfeto entre as cadeias laterais dos resíduos de cisteína e outras moléculas, não proteicas (substratos ou inibidores).

A distância média S₁-S₂ numa ligação dissulfeto comum é de 2,08 Å, correspondente à soma dos raios covalentes (1,04 Å para S) (ATKINS, P.; DE PAULA, J. 2010). Podem, no entanto, surgir ligações dissulfeto com comprimentos diferentes. Por exemplo, na FIGURA 1.6, o comprimento da ligação SG-SG é de 1,99 Å, 0,09 Å mais curto do que a soma dos raios covalentes.

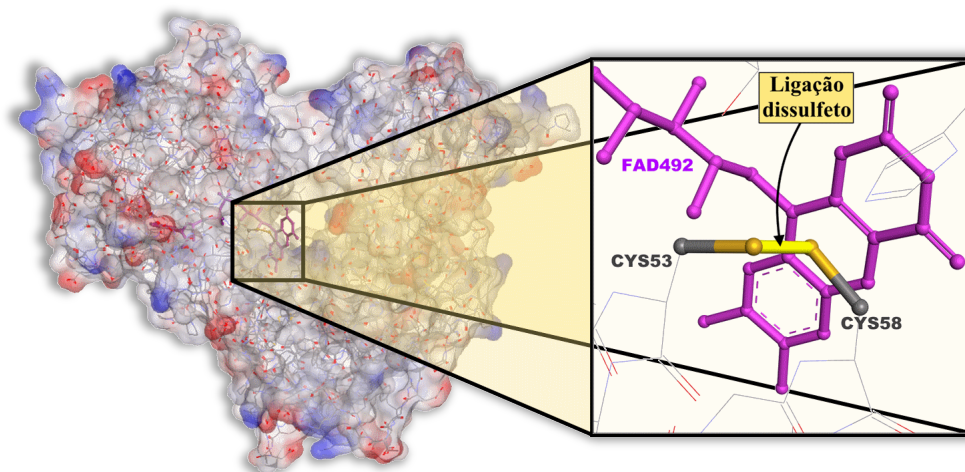


FIGURA 1.6. Representação da ligação dissulfeto na região catalítica de uma enzima. PDB-ID: 1AOG.

Em algumas enzimas, as ligações dissulfeto realizam a oxirredução de substratos no meio fisiológico e são de enorme importância para a manutenção de níveis regulados de substâncias oxidantes e redutoras no meio biológico. Por exemplo, a enzima glutathione redutase tem como substrato a molécula de glutathione, que é uma das moléculas responsáveis pela redução de moléculas oxidantes presentes no meio fisiológico (DEPONTE, 2013).

Os átomos de enxofre, tanto nos grupos tiol, como em ligações dissulfeto, também podem estabelecer interações não covalentes com os resíduos de aminoácidos vizinhos e com moléculas espacialmente próximas. Essas interações podem ser ligações de hidrogênio (por exemplo: S-H \cdots O ou S-H \cdots N) ou interações π (S-H \cdots π , ou S(LP) \cdots π).

1.3. INTERAÇÕES NÃO COVALENTES NAS PROTEÍNAS

Além das ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos das proteínas, as interações não covalentes são muito importantes, tanto na formação da estrutura tridimensional da proteína, como nas interações que pode estabelecer com o solvente e com outras moléculas no meio. Podemos distinguir entre pontes salinas, ligações de hidrogênio e interações π .

1.3.1. PONTES SALINAS (PARES IÔNICOS)

As pontes salinas são interações eletrostáticas entre resíduos pares iônicos, isto é, quando dois grupos eletricamente carregados com cargas opostas se encontram espacialmente próximos, eles interagem devido à atração eletrostática entre si. São um tipo de interações classificadas como fracas (a energia de cada interação pode atingir 25 kJ/mol) (KUMAR & NUSSINOV, 1999 e ERMONDI & CARON, 2006). Nas proteínas, no entanto, as pontes salinas podem existir em números muito variados, o que eleva a importância destas interações para a estabilização da estrutura das proteínas e de outras biomoléculas. Como se trata de interações eletrostáticas entre grupos carregados, apenas os resíduos de aminoácidos com a cadeia lateral ionizada podem interagir por pontes salinas. Assim, as pontes salinas podem ser, normalmente, encontradas entre o ânion carboxilato (RCOO^-) de um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico, e o cátion amônio (RNH_3^+) de um resíduo de lisina ou o cátion guanidinium ($\text{RNHC}(\text{NH}_2)_2^+$) de um resíduo de arginina (FIGURA 1.7). Os resíduos com cadeias laterais não carregadas, mas ionizáveis, histidina, tirosina, serina e cisteína, também podem estabelecer interações por pontes salinas, embora isso esteja dependente do pK_a do meio (ANSLYN & DOUGHERTY, 2005).

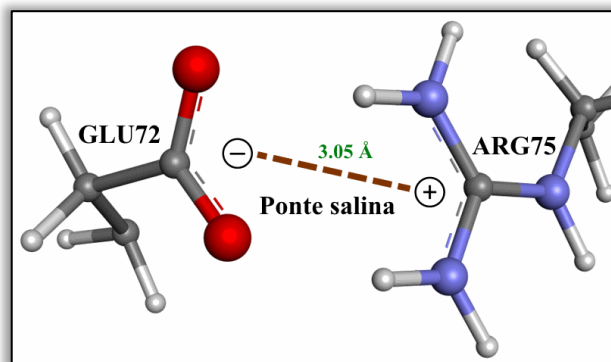


FIGURA 1.7. Exemplo de uma ponte salina entre um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de arginina em 1AOG. A distância entre os sistemas interagindo é de 3,05 Å.

1.3.2. LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO

De acordo com a IUPAC, uma ligação de hidrogênio (HB, do inglês *hydrogen bond*) é uma interação entre um átomo eletronegativo e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo relativamente eletronegativo (IUPAC, 2006; ARUNAN et al. 2011).

Existem diferentes formas de descrever as ligações de hidrogênio. A caracterização clássica destas ligações consiste em quatro descritores geométricos, mostrados na FIGURA 1.8: a distância D-H (d_1); a distância H...A (d_2); a distância D...A (d_3); e o ângulo D-H...A (ϕ). A distância d_3 é, tipicamente, 2,5-3,2 Å, e os ângulos ϕ comuns em ligações de hidrogênio variam entre 130° e 180° (ERMONDI & CARON, 2006).

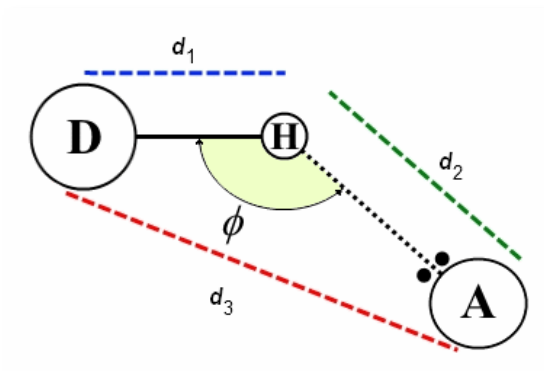


FIGURA 1.8. Representação dos descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio. **D**- átomo eletronegativo ligado covalentemente ao hidrogênio (doador). **H**- átomo de hidrogênio. **A**- átomo eletronegativo aceptor do hidrogênio (na figura, está representado um par isolado de elétrons de A na direção de H).

As ligações de hidrogênio são um tipo de interações existentes nas biomoléculas que são de enorme importância para o reconhecimento molecular, e são importantes para garantir a estabilidade e a flexibilidade das estruturas das biomoléculas.

Podemos classificar as ligações de hidrogênio em quatro classes, de acordo com o centro eletronegativo interagindo com o átomo de hidrogênio: (a) HB entre o átomo de hidrogênio e átomos neutros de elevada eletronegatividade (C, N, O, F, P, S, Cl, Se, Br e I); (b) HB entre o átomo de hidrogênio e átomos neutros de baixa eletronegatividade; (c) HB entre o átomo de hidrogênio e sistemas π (ligações duplas, ligações triplas e sistemas ressonantes ou aromáticos); (d) HB entre o átomo de hidrogênio e grupos carregados, ou quando o átomo de hidrogênio está ligado covalentemente a grupos carregados. As ligações de hidrogênio classificadas como (d) são as mais fortes, sendo comumente designadas HB iônicas (ERMONDI & CARON, 2006).

Cada ligação de hidrogênio é uma interação de baixa energia. No entanto, nas macromoléculas, como as proteínas e os ácidos nucleicos, as ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares existem em grande número, tornando importante considerar a sua contribuição para a análise estrutural das biomoléculas. Como se trata de interações fracas, a energia necessária para criar e desfazer uma ligação de hidrogênio é baixa (4-60 kJ/mol), como descrito por ERMONDI & CARON, 2006, em comparação com ligações covalentes (por exemplo: H-H \approx 436 kJ/mol; C-H \approx 412 kJ/mol; C-C \approx 348 kJ/mol) (ATKINS & DE PAULA, 2010; MURRAY, 1977). Porque são muito mais fáceis de formar e quebrar, as ligações de hidrogênio são muito importantes em funções como, por exemplo, o reconhecimento molecular, a formação e manutenção da estrutura helicoidal dos ácidos nucleicos, a catálise enzimática, ou mesmo o próprio enovelamento das proteínas e a sua agregação na estrutura quaternária. Também é importante referir que as moléculas de água, que é o solvente principal do meio fisiológico, são moléculas polares,

permitindo a existência de uma superfície de solvatação em volta das proteínas, mantida por ligações de hidrogênio. Há, ainda, casos em que moléculas de água intervêm nas reações de catálise enzimática, como é o caso da ação da enzima anidrase carbônica (VOET, VOET, 1995).

As ligações de hidrogênio são, assim, interações fundamentais para a estrutura e a função de biomoléculas.

1.3.3. INTERAÇÕES π

Como referem ERMONDI e CARON, 2006, as interações π (π) são um tipo de interação eletrostática fraca (5-80 kJ/mol) que estão presentes nas biomoléculas. A sua influência nas interações intramoleculares e intermoleculares tem vindo a ser descrita desde a década de 1950, após a descrição da estrutura cristalográfica do benzeno por COX, 1958.

Uma ligação π é uma ligação covalente em que dois orbitais atômicos p , um de cada átomo ligado, se sobrepõem no espaço. Essa sobreposição ocorre fora do eixo da ligação sigma (σ) entre os dois átomos ligados (FIGURA 1.9).

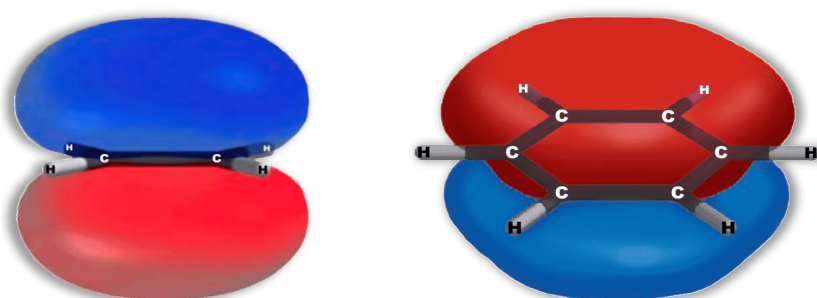


FIGURA 1.9. Representação do orbital π ligante no etileno (esquerda) e um orbital π ligante do benzeno (direita). No etileno, os dois elétrons π estão localizados entre os átomos de carbono. No benzeno, os 6 elétrons π estão delocalizados nas 6 ligações covalentes entre os átomos de carbono. Imagens adaptadas de CAREY & GIULIANO, 2011.

Com a ligação π se cria uma grande densidade eletrônica na região da ligação entre os átomos envolvidos, resultando num aumento da carga negativa dessa região. Cada átomo de um sistema aromático se encontra

hibridizado sp^2 , contendo um orbital p perpendicular ao plano das ligações. A sobreposição desses orbitais p resulta no sistema π de elétrons delocalizados em todo o anel (CAREY & GIULIANO, 2011). Essa delocalização é característica dos sistemas π aromáticos.

As interações π ocorrem quando um sistema com elétrons delocalizados (π) interage com outro sistema com elétrons delocalizados (interação π - π) ou com um sistema com elétrons isolados (*lone pair*- π) (CARACELLI et al, 2013). Ainda podem ser consideradas as interações X-H \cdots π , que são um tipo de interações designadas ligações de hidrogênio fracas, não convencionais, quando X é um átomo com elevada eletronegatividade, em que o sistema π atua como acceptor da ligação de hidrogênio (MALONE et al., 1997).

Quando se considera a estrutura funcional das proteínas (estruturas terciária e quaternária), torna-se ainda mais importante o estudo das interações π - π e *lone pair*(LP)- π . Isto porque o enovelamento das proteínas leva a um empacotamento dos resíduos de aminoácidos e à aproximação dos átomos e sistemas aromáticos entre si. Essa proximidade permite movimentos de rotação nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, de forma que a estrutura da proteína atinja um estado de mais baixa energia, que será o estado conformacional mais estável da molécula no meio fisiológico.

As interações π - π podem ser classificadas de acordo com a orientação dos sistemas interagindo (FIGURA 1.10A, B, C). Assim, podemos ter sistemas π interagindo face-a-face (FIGURA 1.10A), sistemas π interagindo paralelamente, mas deslocados dos eixos normais aos anéis (FIGURA 1.10B), e em forma de T (FIGURA 1.10C). As interações LP- π se caracterizam pelos descritores apresentados na FIGURA 1.10D.

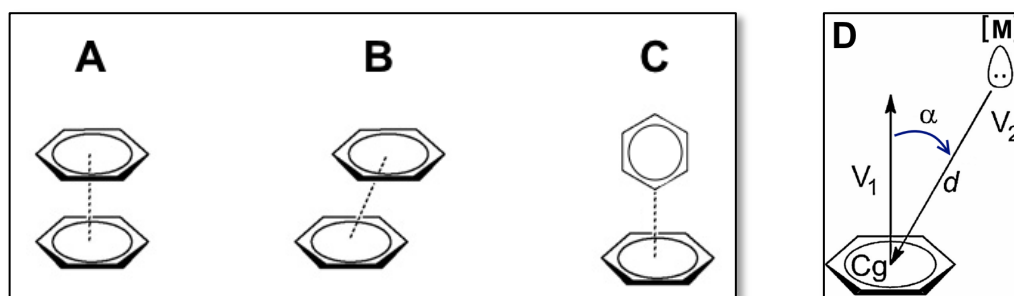


FIGURA 1.10. Três classes de interações π - π : **A** – *face-to-face*; **B** – *parallel-displaced*; **C** – *T-shaped*. **D** representa os descritores geométricos que intervêm numa interação LP- π : Cg – centroide do anel aromático; V_1 – vetor normal ao anel aromático no centroide; V_2 – vetor que liga a posição do LP com Cg; α – ângulo entre V_1 e V_2 ; d – distância do LP ao Cg; M – elemento metálico (ou outro, com LP).

As interações π também podem ser classificadas de acordo com a orientação da reta que une os centroides dos sistemas interagindo. De acordo com a descrição usada por CARACELLI et al., 2013 para as interações $\text{Au} \cdots \pi(\text{areno})$, quando se verifica uma interação LP- π ou X-H $\cdots \pi$, se o vetor da interação aponta para um átomo específico do sistema aromático, a interação é designada localizada. Se o vetor da interação aponta para o centroide do anel, como ilustrado na FIGURA 1.10C e D, a interação é designada delocalizada. Ainda, quando o vetor da interação aponta para uma região entre dois átomos ligados covalentemente, quer em sistemas aromáticos, quer em ligações múltiplas, a interação é designada semi-localizada (CARACELLI et al., 2013).

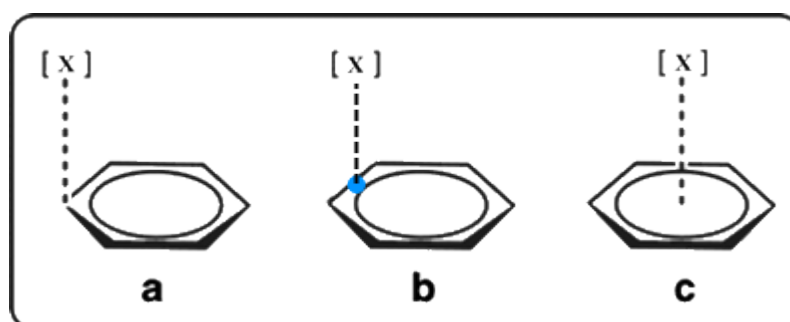


FIGURA 1.11. Classificação das interações π : **a** – localizada; **b** – semi-localizada; **c** – delocalizada. A letra X pode representar um átomo/íon, um par de elétrons, ou um centroide de um sistema aromático. (Adaptado de CARACELLI et al., 2013.)

A descrição geométrica das interações π não é um método rígido de classificação das interações, pois tanto os ângulos diédricos dos sistemas interagindo, como o seu deslocamento relativo podem assumir valores diferentes. É, no entanto, uma aproximação satisfatória aos casos que ocorrem nas biomoléculas e nos sistemas biológicos.

1.4. OXIDORREDUTASES

As oxidorredutases são uma classe de enzimas que realizam a catálise de reações de oxidação e/ou redução de moléculas. O número da classificação de enzimas que designa esta classe é EC 1 e inclui numerosas subclasses e sub-subclasses de enzimas que transferem elétrons, íons hidreto e átomos de H entre substratos ou entre substratos e as enzimas (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, acessado em 24/03/2015). As diferentes subclasses de oxidorredutases atuam em diferentes grupos funcionais dos substratos. Três exemplos de sub-subclasses de enzimas oxidorredutases são as glutaciona dissulfeto redutases (GR), EC 1.8.1.7, as tripanotiona dissulfeto redutases (TR), EC 1.8.1.12, e as sulfidril oxidases (SOX), EC 1.8.3.2. Os mecanismos de atuação enzimática das GR e TR e SOX estão bem estudados (DEPONTE, 2013; KRAUTH-SIEGEL & SCHONECK, 1995; HECKLER, 2008). Tanto GR como TR e SOX catalisam reações em que uma ligação dissulfeto é estabelecida ou desfeita. Estes três grupos de enzimas possuem um cofator em comum, que é o dinucleotídeo de flavina adenina (FAD), com a região isoaloxazina próxima de uma ligação dissulfeto envolvida no mecanismo catalítico destes três grupos de enzimas. Também pode estar presente nestas enzimas uma coenzima que pode funcionar como aceptor de elétrons e prótons nos mecanismos catalíticos, ou nos processos de transferência de cargas na enzima, o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD).

1.4.1. GLUTATIONA DISSULFETO REDUTASES (GR)

A glutaciona dissulfeto redutase é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula de glutaciona dissulfeto (GSSG) em duas moléculas de glutaciona (GSH). Uma representação simples da reação catalisada pelas GR é apresentada na FIGURA 1.12.

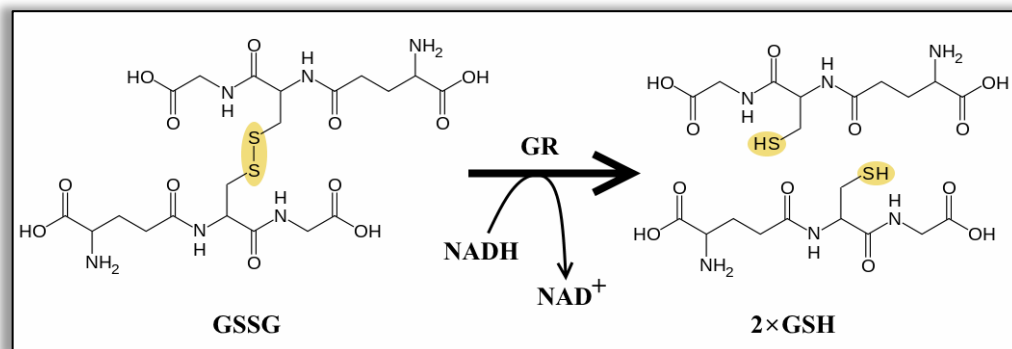


FIGURA 1.12. Representação da reação catalisada pelas enzimas GR. Salienta-se a necessidade do NADH.

A enzima GR é um dímero funcional em que as duas subunidades são iguais – homodímero. Cada subunidade é composta por 478 resíduos de aminoácidos (apoenzima) e uma molécula do cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Os sítios catalíticos (dois, no total) localizam-se na interface entre os monômeros, sendo que cada sítio catalítico é formado por resíduos de aminoácidos das duas subunidades. Cada um dos sítios catalíticos da enzima inclui uma ligação dissulfeto próxima à região da flavina do FAD, com o qual existe transferência de prótons durante a catálise enzimática (KARPLUS & SCHULZ, 1997). Trata-se de uma enzima dependente de NAD para realizar a catálise enzimática, no entanto, este apenas se posiciona no sítio ativo no momento da reação, não estando permanentemente ligado à enzima, como sucede com FAD.

Uma representação simples do mecanismo de atuação das enzimas glutathiona dissulfeto redutases (GR) é apresentado na FIGURA 1.13.

Uma molécula de FAD está posicionada entre as cadeias polipeptídicas dos dois monômeros, representadas por fitas verdes. A ligação dissulfeto encontra-se próxima do FAD e é quebrada quando NAD se encontra na região oposta da isoaloxazina do FAD.

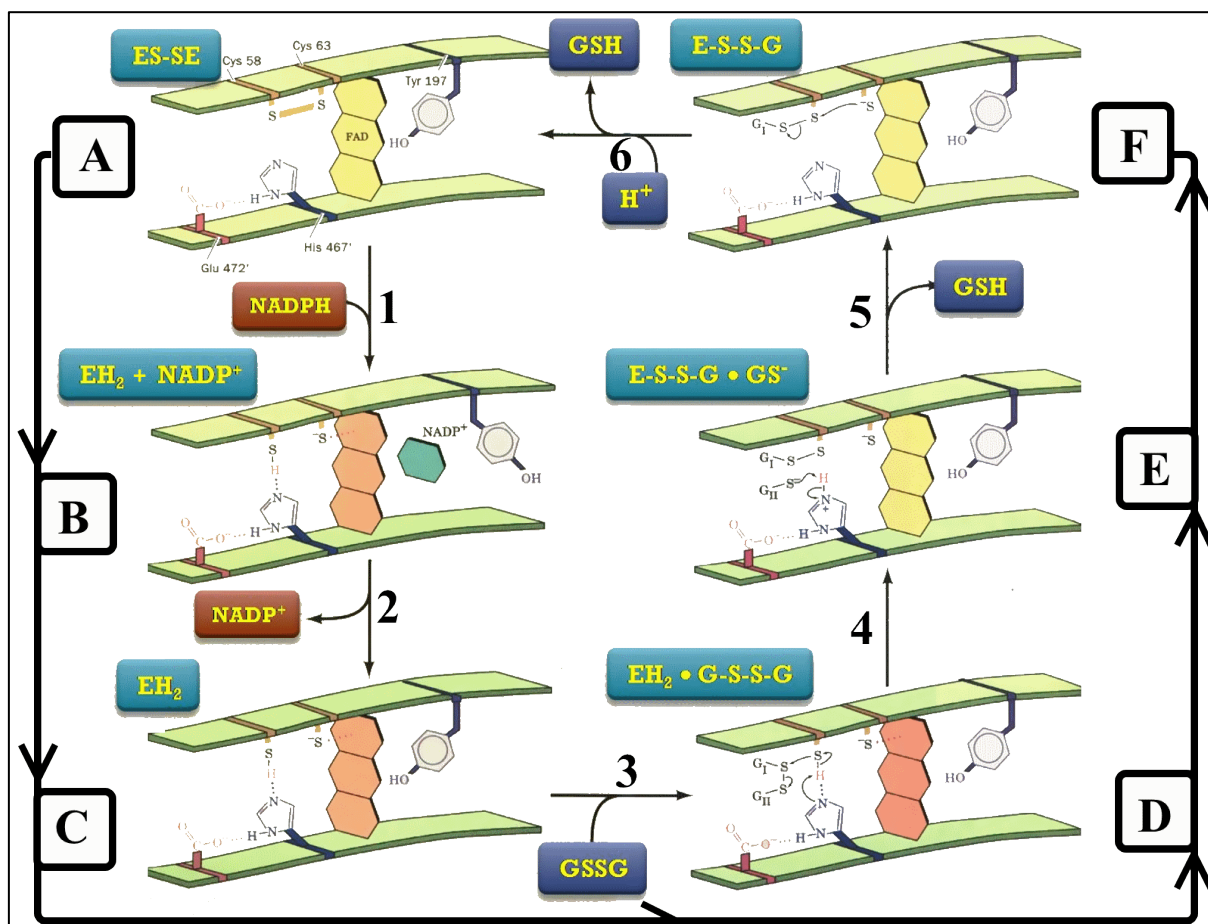


FIGURA 1.13. Representação do mecanismo de atuação de glutationa dissulfeto redutases. (Adaptado de VOET, & VOET, 1995).

Ao longo da reação, uma molécula de glutationa dissulfeto (GSSG) é reduzida a glutationa (GSH), originando duas moléculas de GSH (VOET & VOET, 1995). Este mecanismo permite entender a importância da ligação dissulfeto e das interações que os átomos de enxofre proximais têm para a atuação enzimática. De salientar que, na FIGURA 1.13, o mecanismo propõe uma interação entre SG proximal (CYS63) e FAD, em B, C e D, com o FAD reduzido.

1.4.2. TRIPANOTIONA DISSULFETO REDUTASES (TR)

A tripanotiona dissulfeto redutase é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula de tripanotiona dissulfeto em uma molécula de tripanotiona ditiol (FIGURA 1.14). A função executada pelas TR em

Trypanosoma sp. é muito similar à função realizada pelas GR no ser humano (BOND et al., 1999).

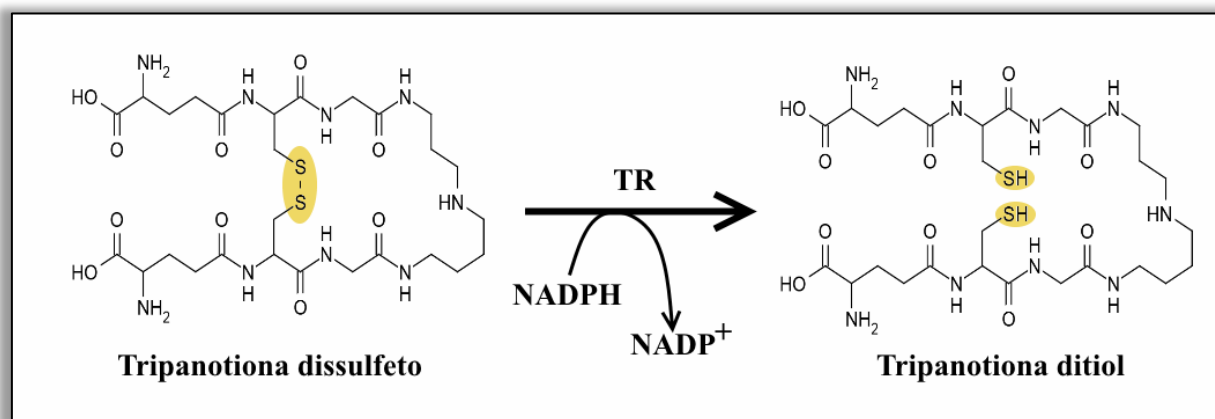


FIGURA 1.14. Representação da reação catalisada pelas enzimas TR. Salienta-se a necessidade do NADPH.

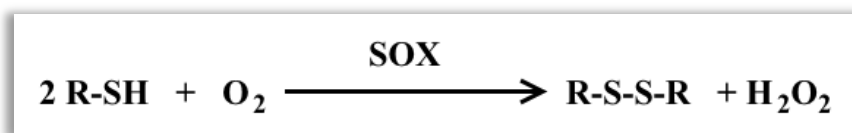
A enzima é um dímero funcional em que as duas subunidades são iguais – homodímero. Cada subunidade é composta por 487 resíduos de aminoácidos (apoenzima) e uma molécula do cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Os sítios catalíticos (dois, no total) localizam-se na interface entre os monômeros, sendo que cada sítio catalítico é formado por resíduos de aminoácidos das duas subunidades. Cada um dos sítios catalíticos da enzima inclui uma ligação dissulfeto próxima à região da flavina do FAD, com o qual existe transferência de prótons durante a catálise enzimática. Trata-se de uma enzima dependente de NAD para realizar a catálise enzimática, no entanto, este apenas se posiciona no sítio ativo no momento da reação, não estando permanentemente ligado à enzima, como sucede com FAD (VEGA-TEIJIDO et al., 2006).

1.4.3. SULFIDRIL OXIDASES (SOX)

As ligações dissulfeto são de vital importância no meio fisiológico, sendo cruciais para a conformação tridimensional e papel biológico de vários polipeptídeos. Elas fazem parte dos mecanismos redox capazes de controlar funções proteicas, regulando vários processos de sobrevivência celular

(BULLEID & ELLGAARD, 2011). Os mecanismos de formação/quebra das ligações dissulfeto nos seres vivos podem, então, ocorrer no meio intracelular e/ou extracelular, sendo regulados por proteínas, nomeadamente as sulfidril oxidases (SOX). Estas são enzimas responsáveis pela formação de ligações dissulfeto (GROSS et al., 2006) em meio fisiológico e são conhecidas desde 1956, onde MANDELS, 1956, reportou a primeira SOX, detectada em esporos de fungos.

As SOX são capazes de oxidar os grupos sulfidril livres nas proteínas, bem como pequenas moléculas que contêm tiol na sua estrutura, utilizando o oxigênio molecular como um aceitador de elétrons. O oxigênio molecular é reduzido a peróxido de hidrogênio, como mostra a Equação (ALON et al., 2010)



As SOX foram, primeiramente, estudadas como participantes do enovelamento oxidativo de proteínas em vertebrados (DAS, K. C. 2004), mas o seu interesse foi ofuscado pelo estudo do enovelamento oxidativo proteico em *Escherichia Coli* e leveduras. Até ao presente, a classificação das SOX tem-se revelado um pouco confusa. Geralmente, as SOX específicas da glutathiona (GSH) são classificadas como glutathiona oxidases, enquanto que as enzimas menos específicas são classificadas como tiol oxidases. No entanto, a especificidade dos SOX não é rigorosa e varia de pequenos compostos como o ditiotreitól até aos grupos tiol nas proteínas.

Ao contrário das GR e TR, as SOX não são dependentes de NAD/NADH para a sua função, mas, como são enzimas FAD-dependentes e atuam sobre grupos com enxofre, podem possuir algumas características semelhantes às GR e TR.

1.5. LIGANTES

Todos os átomos, íons e moléculas que interagem com a parte proteica das proteínas, podem ser designados de “ligantes”. Essa é a designação utilizada no PDB para nomear todas essas substâncias. Cada ligante tem uma nomenclatura individual, de acordo com a estrutura química ou bioquímica. Os ligantes podem ser substratos, cofatores, coenzimas, inibidores, sais, ou mesmo substâncias utilizadas no processo de cristalização das proteínas.

Os ligantes que foram mais importantes para o desenvolvimento do presente trabalho foram o flavina adenina dinucleotídeo – FAD –, um cofator, e o nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD –, uma coenzima. Além destes, foram analisados os substratos e inibidores presentes nas estruturas que continham FAD e NAD, tanto nas formas reduzidas, como nas formas oxidadas, ou em estados intermédios.

1.5.1. FLAVINA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (FAD)

O FAD é um cofator proteico que está presente em muitas classes de proteínas. É uma molécula orgânica composta por cinco regiões bem definidas: uma região flavina; uma região ribitol; uma região fosfato; uma região ribose cíclica; e uma região adenina (FIGURA 1.15). Como as regiões adenina, ribose e fosfato são comuns aos ácidos nucleicos, a molécula é designada analogamente de dinucleotídeo (FIGURA 1.16). Por se tratar de um cofator, o FAD está sempre presente nas proteínas que o utilizam, sendo integrado na apoenzima durante o seu enovelamento (SCHULZ, SCHIRMER & PAI, 1982).

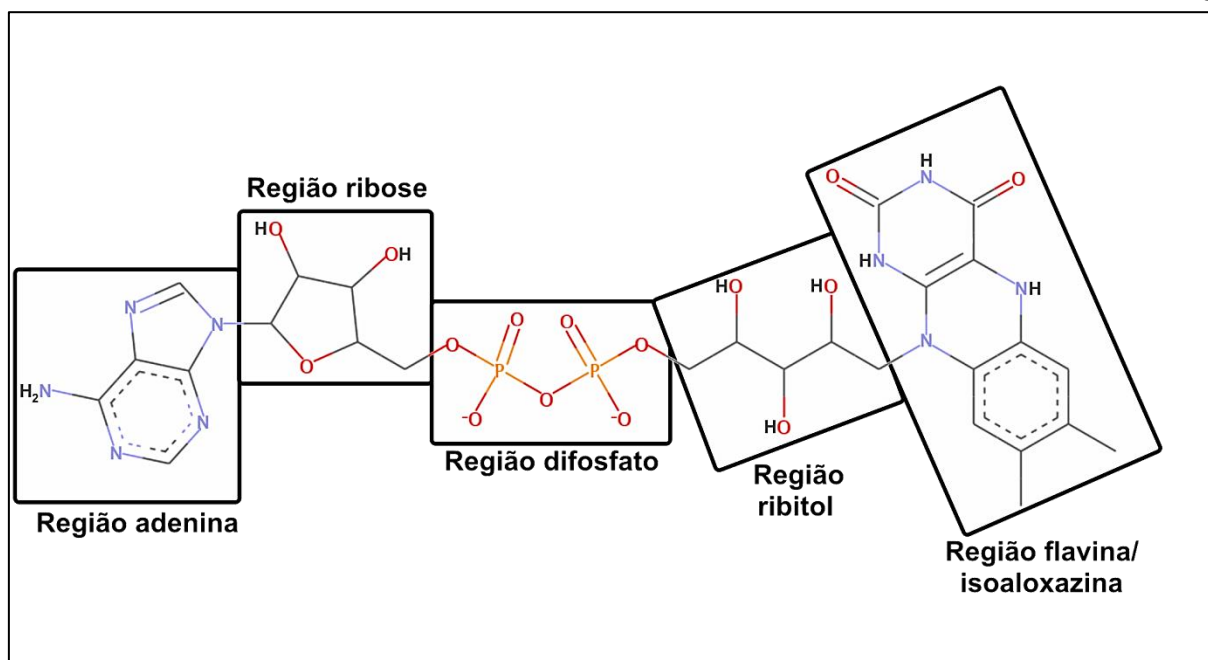


FIGURA 1.15. Representação do flavina adenina dinucleotídeo – FAD – reduzido.

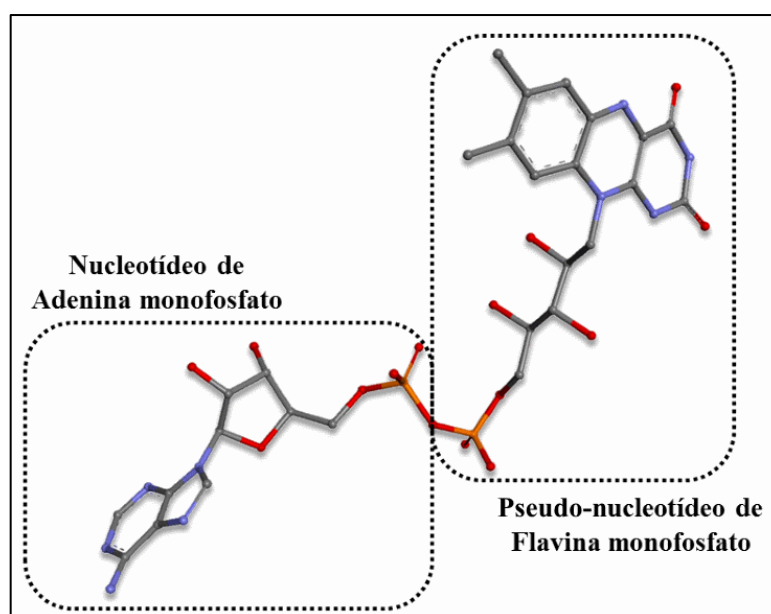


FIGURA 1.16. Representação da molécula FAD, salientando os dois nucleotídeos ligados pelos grupos fosfato.

Uma das regiões importantes nas reações catalisadas por oxidorreduções com FAD como cofator, é a região da flavina, composta por três anéis fundidos: um anel uracílico (U), um anel dimetilbenzênico (B) e um anel pirazínico (P) central. Essa região é designada isoaloxazina (FIGURA 1.17) e está ligada pelo átomo N10 à ribose do nucleotídeo de flavina. Os átomos de nitrogênio N1 e N5 podem ser protonados/desprotonados em reações redox,

permitindo a transferência de prótons e elétrons entre diferentes moléculas, nas reações enzimáticas dependentes de FAD (DEPONTE, 2013).

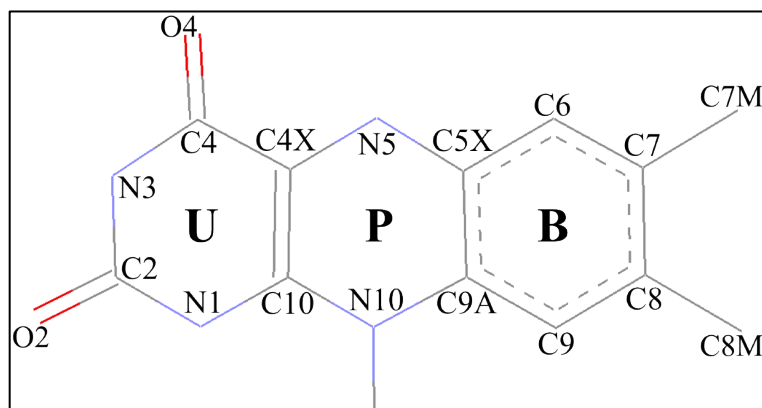


FIGURA 1.17. Representação da região isoaloxazina do FAD reduzido. Os átomos estão numerados de acordo com a designação atribuída nos arquivos do *Protein Data Bank*. As letras U, P e B correspondem a uma classificação atribuída, no presente trabalho, aos anéis uracílico, pirazínico e dimetilbenzênico, respectivamente.

No caso da molécula de FAD com os átomos N1 e N5 oxidados (FAD oxidado – FIGURA 1.18), as ligações N5–C4X, C4X–C10 e C10–N1, dos anéis U e P da isoaloxazina variam entre ligações simples C–N, ligações simples C–C, ligação dupla C–C e ligação aromática C–C no anel B.

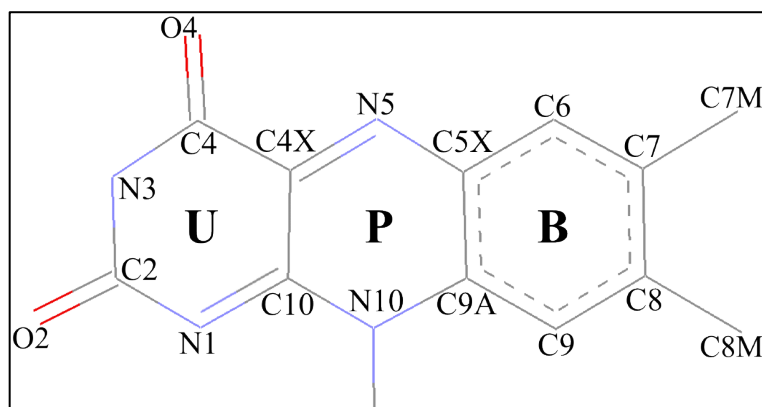


FIGURA 1.18. Representação da região isoaloxazina do FAD oxidado. Em comparação com a FIGURA 1.17, os átomos N5 e N1 encontram-se sem os átomos de hidrogênio.

A medição das distâncias atômicas entre os átomos envolvidos em ligações covalentes é um método de prever a ordem da ligação. Os valores padrão para os comprimentos dessas ligações são os descritos na TABELA 1.2 (ALLEN, 1987).

TABELA 1.2. Comprimentos padrão de ligações covalentes entre átomos de carbono e entre átomos de carbono e nitrogênio

| Ligação | Comprimento |
|--------------|-------------|
| C–C | 1,54 Å |
| C=C | 1,34 Å |
| C \cdots C | 1,39 Å |
| C–N | 1,47 Å |
| C=N | 1,28 Å |

Como a região isoaloxazina do FAD pode interagir com outros sistemas de ambos os lados do plano definido pelos anéis U-P-B, há um sistema de classificação que permite definir essas regiões do espaço, de acordo com regras estabelecidas em Química Orgânica. Essas regras ditam que, ao visualizarmos a representação de um átomo de carbono hibridizado sp^2 perpendicularmente ao plano da dupla ligação, se as prioridades de Cahn-Ingold-Prelog dos três grupos ligados a esse carbono diminuem no sentido horário, então estamos a observar a ligação dupla do lado *re*. No caso de as prioridades de Cahn-Ingold-Prelog diminuïrem no sentido anti-horário, então estamos a observar a dupla ligação do lado *si*. De acordo com esta classificação, a observação do átomo C4X na FIGURA 1.17, hibridizado sp^2 , permite dizer que a representação da isoaloxazina é feita olhando do lado *si*.

Devido à delocalização dos elétrons dos *lone pairs* dos átomos de nitrogênio, podem ocorrer deformações na conformação da isoaloxazina do FAD, tanto na forma oxidada, como na forma reduzida. Uma deformação clássica da isoaloxazina do FAD descrita em diversas fontes bibliográficas é designada “butterfly”, por analogia da dobra da região isoaloxazina, segundo o eixo N5-N10, com o movimento das asas de uma borboleta (DIAZ et al., 1996, KAO et al., 2008, VERMA et al., 2013).

1.5.2. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (NAD)

O NAD (FIGURA 1.19) é uma coenzima que está associada a reações redox nas enzimas (HUNG, Y. P. *et al.* 2011). Esta molécula orgânica é composta por cinco regiões distintas: uma região nicotinamida; uma região ribose cíclica; uma região fosfato; outra região ribose; e uma região adenina. Trata-se de um verdadeiro dinucleotídeo, pois um nucleotídeo contém a base nitrogenada adenina e uma ribose e o outro nucleotídeo contém a nicotinamida e outra ribose. As riboses estão ligadas pelos grupos fosfato, na região central da molécula.

O NAD pode assumir duas formas: forma reduzida, como mostrado na FIGURA 1.19, designando-se NADH; ou forma oxidada, com o anel da região nicotinamida aromático, designando-se NAD^+ (VOET & VOET, 1995). O código PDB da forma reduzida NADH é NAI, enquanto o código PDB da forma oxidada NAD^+ é NAD. Há, ainda, variações da estrutura correspondentes à fosforilação da região ribose da adenina, podendo se tratar de NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida, e NADP^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada. Para efeitos de simplificação, as referências ao nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD – no presente trabalho reportam-se à forma reduzida NADH.

Por se tratar de uma coenzima, o NAD não está sempre ligado à proteína, ao contrário do FAD. Encontra-se no meio fisiológico e é acoplado à proteína no momento da reação. No caso das oxidorreduções com FAD e NAD, o posicionamento do NAD é tal que o anel da região nicotinamida se posiciona paralelamente ao sistema isoaloxazina do FAD, permitindo a transferência de cargas entre ambos e integrando o mecanismo catalítico da enzima (LI et al., 1995).

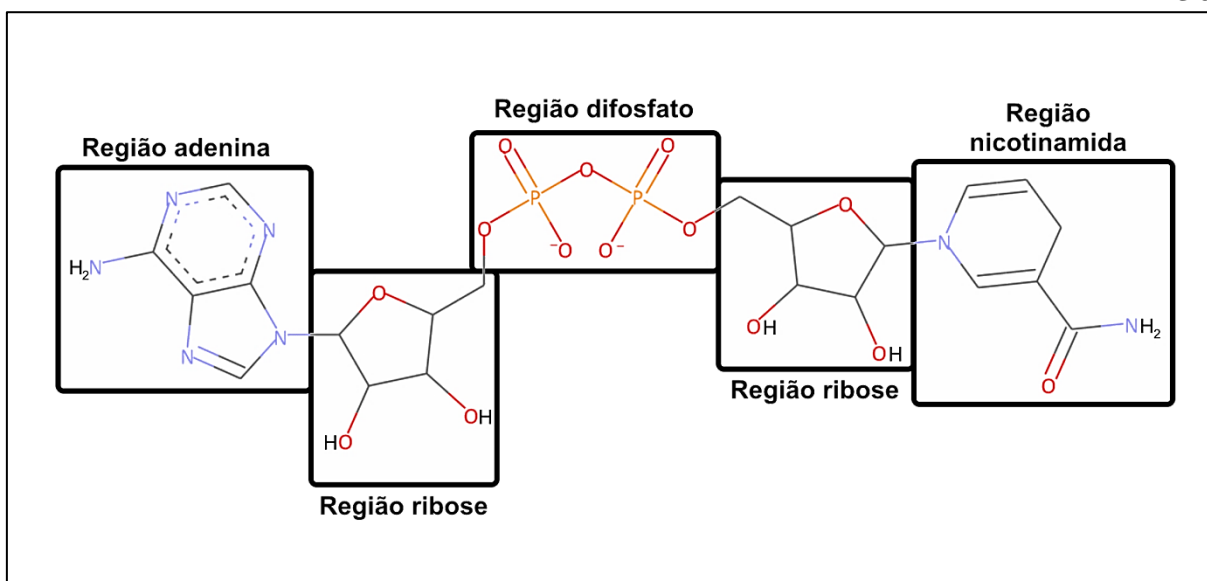


FIGURA 1.19. Nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD - na forma reduzida.

1.6. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é o de analisar a estrutura do FAD, uma vez que esta molécula atua como cofator em diversas classes de enzimas. Como se trata de uma pesquisa com viés estrutural, foram selecionadas estruturas tridimensionais do PDB, contendo FAD.

Como o número de estruturas tridimensionais com FAD é muito alto (1431 estruturas, em 20/02/2014), foram selecionadas algumas classes de enzimas, de forma que fosse possível observar e relacionar estrutura e função.

Os objetivos específicos foram:

- encontrar interações entre as enzimas oxidoredutases analisadas e os ligantes FAD e NAD;
- organizar os dados obtidos, criando uma base de dados, de forma a identificar características potencialmente únicas, com vista a uma futura aplicação em cálculos de Modelagem Molecular, *Docking* e de Dinâmica Molecular;
- analisar as estruturas de três sub-subclasses de oxidoredutases, na procura de interações do tipo *lone pair- π* entre os átomos de enxofre dos aminoácidos cisteína e sistemas aromáticos próximos;
- relacionar possíveis alterações na estrutura tridimensional das proteínas, próximo dos átomos de enxofre dos aminoácidos cisteína das oxidoredutases analisadas, com a presença ou a ausência de diferentes ligantes;
- verificar a existência de variações conformacionais na estrutura da isoaloxazina do flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nos estados oxidado, reduzido, e em estados intermediários encontrados nas estruturas de Glutathione dissulfeto redutases, Tripanotiona dissulfeto redutases e Sulfidril oxidases.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. BANCO DE DADOS/RCSB PROTEIN DATA BANK (PDB)

O RCBS Protein Data Bank (PDB) é um banco de dados estruturais de proteínas e ácidos nucleicos, global e de acesso gratuito, e um repositório das estruturas criado em 1971 no Brookhaven National Laboratory e tornado público através da *World Wide Web* em 2003. Em 24 de março de 2015, o repositório mantinha informações de 107.436 estruturas biológicas macromoleculares, sendo atualizado semanalmente às quartas-feiras a 00:00 UTC (www.rcsb.org. Acessado em 24/03/2015). Tem se afirmado como um recurso-chave nos processos de desenvolvimento de novos fármacos, biocombustíveis e nanomateriais.

Além da biblioteca de dados estruturais, o PDB também contém ligações para os artigos científicos onde as estruturas foram publicadas, caso tenham sido publicadas em artigos de revistas científicas, ligações para páginas da internet com informações acerca das estruturas, das proteínas, dos ligantes e de visualizadores 3D. Ainda, o PDB inclui alguns visualizadores online das estruturas em 3D e 2D, através de campos em JAVA, bem como numerosas informações acerca de proteínas de interesse no recurso educacional PDB-101.

O PDB permite a visualização e a transferência dos arquivos de dados de cada estrutura em diversos formatos, permitindo o tratamento dos dados de forma individualizada, por qualquer pesquisador, no seu próprio computador. O programa utilizado para a visualização e a análise das estruturas do PDB possibilita a transferência e a leitura dos dados dos arquivos com extensão .pdb e a conversão para arquivos com outras extensões.

Assim, devido à enorme quantidade de dados armazenados no PDB, é de interesse analisar comparativamente as estruturas semelhantes, sobretudo as

obtidas de forma semelhante, com o interesse de encontrar padrões estruturais, ou outros, nomeadamente os padrões associados à presença ou ausência de substratos, inibidores, ou outros ligantes nas estruturas. Essa análise comparativa também pode elucidar os mecanismos de atuação enzimática, fornecendo uma visualização de momentos específicos no decorrer das reações.

As estruturas de biomoléculas depositadas no PDB são classificadas com um código de 4 dígitos, sendo o primeiro dígito numérico e os três dígitos seguintes alfanuméricos (por exemplo: 3SQP – estrutura de glutathione reductase humana complexada com piocianina, um agente com atividade antimalárica). No caso dos ligantes, todos são classificados com um código de três dígitos alfanuméricos (por exemplo, a estrutura 3SQP possui quatro ligantes diferentes – 3J8, FAD, GOL e SO4 – e o ligante designado 3J8 corresponde à molécula 5-metilfenazin-1(5H)-ona, ou piocianina).

Os métodos experimentais de obtenção e determinação das estruturas tridimensionais das proteínas no PDB são variados, no entanto a difração de raios X é, de longe, o mais significativo, de fato cerca de 90% das estruturas existentes no PDB foram determinadas experimentalmente por este método, o que resulta em 95 768 estruturas como mostrado na FIGURA 2.1 (<http://www.rcsb.org/pdb/>. Acessado em 25/03/2015).

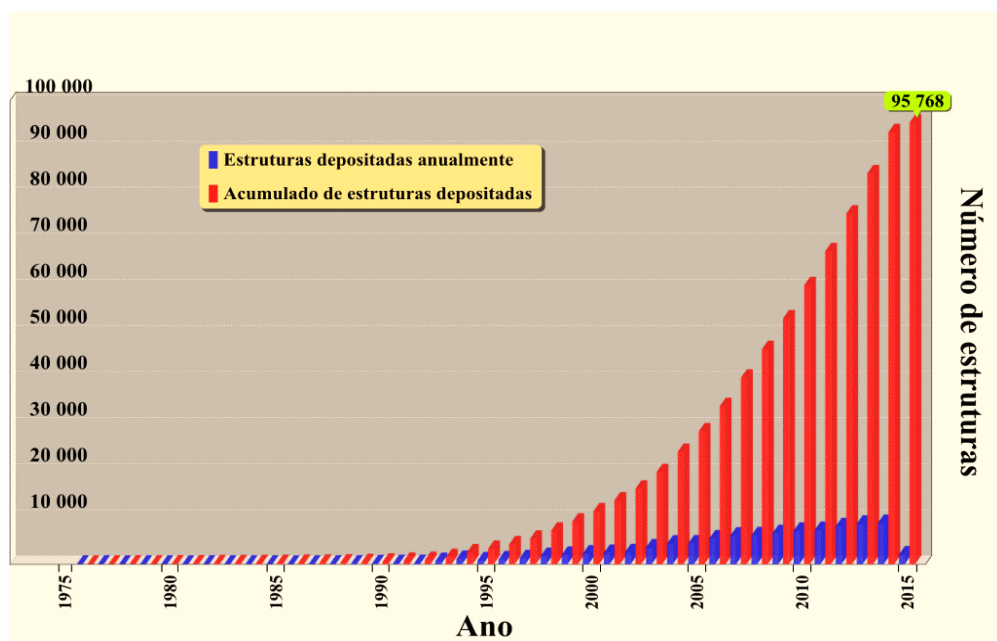


FIGURA 2.1. Variação anual, desde 1975, do número de estruturas depositadas no PDB obtidas por difração de raios X. O número 96 768 é válido para o dia 25/03/2015.

Entre as estruturas depositadas no PDB, cerca de 60% são enzimas as quais estão diferenciadas por sua função em classes, conforme mostra a FIGURA 2.2.

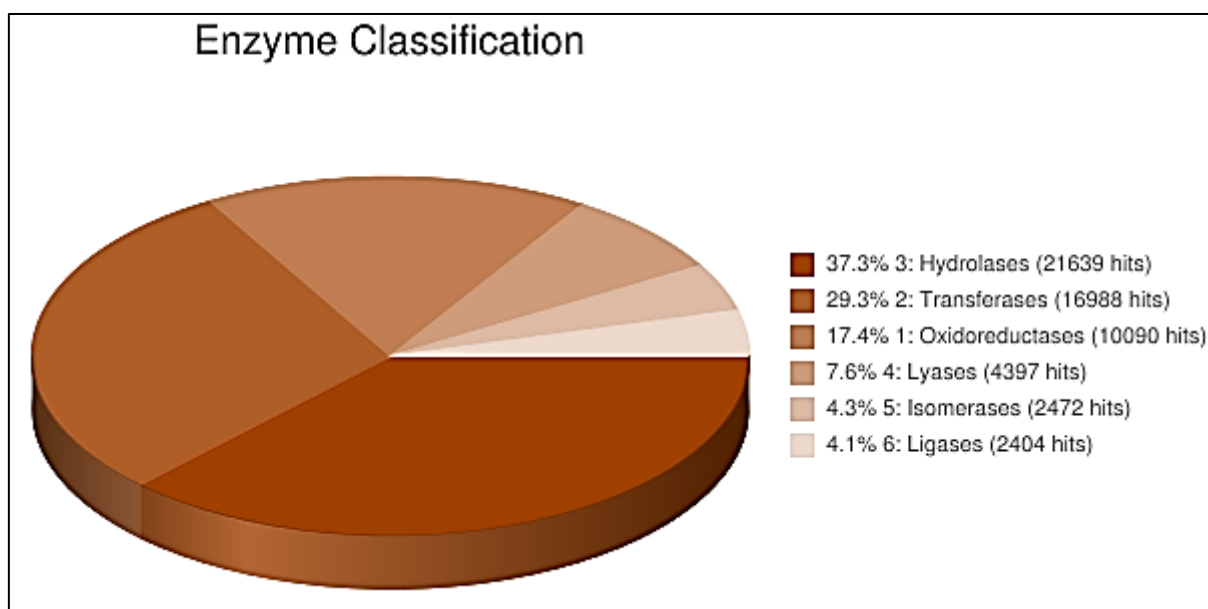


FIGURA 2.2. Representação da distribuição das estruturas de enzimas depositadas no PDB por classes. 17,4% das estruturas de enzimas correspondem a oxidorreductases. (<http://www.rcsb.org/pdb/> Acessado em 27/07/2015)

Neste trabalho, foram selecionadas as oxidoredutases, que constituem cerca de 17% das enzimas. Na data da coleta de dados, isto significou um total de 8876 enzimas. Como uma parte importante do trabalho depende de visualização molecular, foi necessário reduzir o universo de estudo. Dessa forma o foco central foram as oxidoredutases, com código EC 1.8: enzimas oxidoredutases atuando num grupo de doadores com enxofre. Como, ainda assim, se obteve um número de estruturas superior a 400, foi decidido trabalhar com estruturas com FAD, que possuíssem pelo menos uma ligação dissulfeto, e cuja resolução fosse elevada. Foi definido um teto de resolução de 2.5 Å para as estruturas obtidas por técnicas de difração de raio X. Desta forma, o número inicial de estruturas analisadas neste trabalho foi de 162. Como o PDB atualiza o número de estruturas depositadas semanalmente, foram adicionadas ao material de estudo mais 6 estruturas, depositadas até Setembro de 2014, totalizando 168 estruturas de trabalho.

Mais tarde, direcionando o trabalho para as enzimas Glutathione dissulfeto redutases (EC 1.8.1.7,) Tripanotiona dissulfeto redutases (EC 1.8.1.12) e Sulfidril oxidases (EC 1.8.3.2), acrescentaram-se 12 estruturas o que levou o número de estruturas analisadas neste trabalho para 180. Essas 180 estruturas correspondiam, no momento de definição do presente trabalho, a cerca de 2% das enzimas oxidoredutases.

2.2. VISUALIZAÇÃO MOLECULAR

Para visualização molecular das estruturas e confirmação visual dos cálculos efetuados, foi utilizado o software Biovia/Accelrys Discovery Studio Visualizer – versão 3.5 (DSV). Este é um de múltiplos programas de visualização molecular de utilização gratuita disponíveis na Internet, sendo um dos programas comumente utilizados pelo Grupo de Pesquisa no BioMat e no LaCrEMM.

O DSV é um programa de visualização 3D de macromoléculas que permite observar e alterar as estruturas depositadas no PDB ou estruturas em geral que estejam em formato .pdb. O programa também é capaz de modificar a representação atômica, desenhar superfícies de ocupação com diferentes características, calcular e medir ângulos e distâncias entre átomos, sobrepor estruturas e determinar ligações de hidrogênio e interações π . Ainda é possível calcular algumas propriedades biofísicas das estruturas, ou de porções delas, e prever propriedades de sequências modificadas (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/>. Acessado em 24/03/2015.). O fato de permitir medir distâncias e ângulos entre átomos, sistemas de átomos, ou ligações, bem como permitir calcular e por em evidência centroides de diversos sistemas π bem como efetuar cálculos geométricos com eles, foram as características do DSV que determinaram a sua utilização no presente trabalho. Além disso, os parâmetros de cálculo de interações do DSV podem ser modificados pelo utilizador, permitindo a otimização do trabalho e a visualização.

O DSV foi, ainda, utilizado para fazer a conversão entre os arquivos com extensão .pdb, transferidos do PDB, em arquivos com extensão .mol2, passíveis de serem lidos pelo programa de cálculo vetorial descrito na Seção 2.3. Também foi importante para fazer a verificação visual do cálculo e da colocação correta dos centroides dos sistemas cíclicos aromáticos determinados pelo programa de cálculo vetorial. Serviu, ainda, para efetuar a marcação das distâncias e dos ângulos entre a reta normal ao plano dos sistemas aromáticos e os átomos SG das cisteínas em dissulfeto.

Os parâmetros utilizados no DSV foram personalizados para confirmar os cálculos e explorar a análise da estrutura, diferentes combinações dos parâmetros foram executadas, como a monitoração de átomos vizinhos a um átomo ou um conjunto de átomos, a visualização de uma superfície de interação da enzima e/ou dos ligantes, a monitoração de distâncias entre átomo e dos

ângulos entre ligações e interações, a visualização dos átomos e da estrutura da enzima em estilos diferentes, a visualização das moléculas de água cocrystalizadas na estrutura, entre outros.

A deformação da região isoaloxazina do FAD foi determinada visualmente, usando o programa DSV.

2.3. CÁLCULO VETORIAL

O cálculo vetorial foi realizado com um programa desenvolvido pelo Professor Antônio César da Silva Sacco – FATEC – Tatuí (Sacco, 2013). Esse programa permitiu calcular e marcar centroides (Ct) em sistemas cíclicos aromáticos e identificar átomos de enxofre gama (SG) das cisteínas nas pontes dissulfeto. Este programa também permitiu calcular as distâncias e os ângulos entre as retas normais aos sistemas cíclicos aromáticos ($\vec{\alpha}$) nos centroides representados e os átomos SG das cisteínas das pontes dissulfeto. Também foi possível calcular os pontos geométricos médios em ligações covalentes de ordem de ligação superior a 1 nos ligantes e em sistemas aromáticos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos nas enzimas. Desta forma foi possível calcular as distâncias desses pontos aos átomos SG das pontes dissulfeto. Na FIGURA 2.3 estão representados os descritores geométricos que serviram de base ao cálculo das distâncias e dos ângulos dos átomos de enxofre aos sistemas π . A FIGURA 2.4 mostra a representação dos centroides do FAD utilizados nos cálculos vetoriais. Os parâmetros geométricos utilizados no cálculo das interações SG- π foram os apresentados na TABELA 2.1. Para todos os resultados de cálculo cujos valores estavam dentro dos limites estabelecidos para os diferentes parâmetros, o programa devolvia a informação “Possível interação π ”.

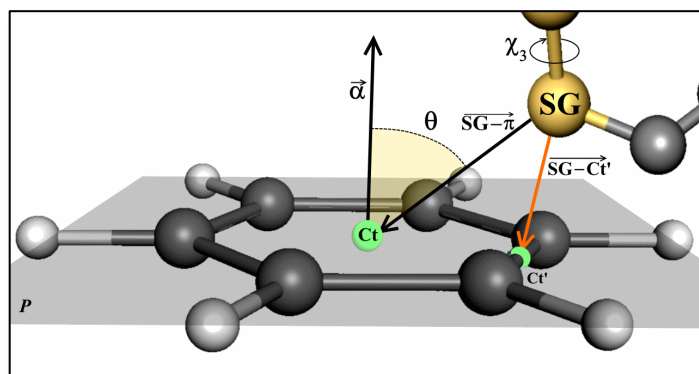


FIGURA 2.3. Representação exemplificativa dos descritores geométricos utilizados no cálculo das interações SG- π : Ct – Centróide do anel aromático; SG – Átomo de enxofre na posição gama; $\vec{\alpha}$ – Vetor normal ao plano do anel aromático em Ct; $\overrightarrow{SG-\pi}$ – Vetor que liga SG a Ct; θ – Ângulo entre $\vec{\alpha}$ e $\overrightarrow{SG-\pi}$; Ct' – Ponto médio da ligação C-C no anel aromático que se encontra mais próximo de SG; $\overrightarrow{SG-Ct'}$ – Vetor que liga SG a Ct'; χ_3 – Ângulo diedro da ligação dissulfeto. O plano do anel aromático está representado pela figura sombreada *P*.

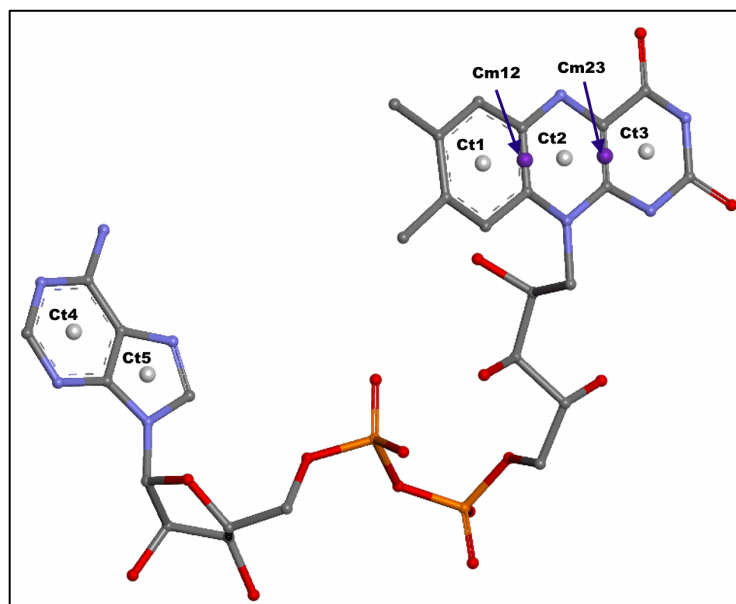


FIGURA 2.4. Representação do FAD e dos respectivos centros utilizados no cálculo vetorial. Em cinza claro encontram-se desenhados os centros dos anéis das regiões isoaloxazina e adenina do FAD (Ct1 a Ct5). Em roxo, mostram-se os centros médios das ligações covalentes estudadas (Cm12 e Cm23).

TABELA 2.1. Parâmetros de cálculo das interações SG- π no programa de cálculo vetorial

| Parâmetro | Mínimo | Máximo |
|---|---------|---------|
| Comprimento da ligação dissulfeto (SG-SG) | 1,8 (Å) | 2,5 (Å) |
| Ângulo diedro χ_3 | 0° | 180° |
| Distância $\pi \cdots SG$ | 2,5 (Å) | 4,8 (Å) |
| Ângulo entre o vetor $\pi \rightarrow SG$ e o vetor normal α | 0° | 30° |

Para os valores em que a distância $\pi \cdots \text{SG}$ fosse superior a 4,8 Å e inferior a 7,0 Å, o programa apresentava os valores da distância e do ângulo, para julgamento do pesquisador. O limite de 7,0 Å foi determinado arbitrariamente como uma distância-limite para o programa apresentar dados para análise visual. Além de 5,0 Å considera-se que não existem interações $\pi \cdots \text{SG}$. Esses parâmetros-limite para as distâncias e ângulos estão descritos na TABELA 2.2.

| TABELA 2.2. Valores máximos que originaram informação visual das distâncias e dos ângulos | | |
|---|---------|---------|
| Parâmetro | Mínimo | Máximo |
| Distância $\pi \cdots \text{SG}$ | 2,5 (Å) | 7,0 (Å) |
| Ângulo entre o vetor $\pi \rightarrow \text{SG}$ e o vetor normal α | 0° | 30° |

O mesmo programa foi utilizado para medir as distâncias das ligações covalentes entre os átomos de carbono e nitrogênio na isoaloxazina do FAD.

2.4. MÉTODOS DE ANÁLISE

Os procedimentos para análise das 180 estruturas foram realizados seguindo as seguintes etapas:

- i.* Transferir os dados da estrutura do PDB, no formato de arquivo com extensão .pdb.
- ii.* Abrir o arquivo .pdb com o programa Biovia/Accelrys Discovery Studio Visualizer.
- iii.* Salvar o arquivo em formato .mol2 no computador.
- iv.* Abrir o arquivo .mol2 com o programa Microsoft Excel.
- v.* Selecionar cada aminoácido e ligante com anéis aromáticos e realizar o cálculo dos centroides de todos os anéis aromáticos.
- vi.* Selecionar todos os centroides e calcular as distâncias e os ângulos aos átomos SG nas pontes dissulfeto.

- vii. Transferir os resultados para outro arquivo .xlsx e salvar como arquivo .txt.
- viii. Alterar a extensão do arquivo .txt para .mol2.
- ix. Verificar visualmente no Discovery Studio Visualizer se os centroides dos anéis aromáticos dos aminoácidos e ligantes foram bem calculados e representados e se as distâncias e ângulos registrados foram corretamente calculados.
- x. Elaborar relatórios com os resultados obtidos.

Inicialmente, foram analisadas 168 estruturas do PDB relativas às oxidoredutases com FAD como cofator, com pelo menos uma ligação dissulfeto, obtidas por difração de raios X com resolução até 2,5 Å.

Posteriormente, foi analisada em maior detalhe a sub-subclasse de oxidoredutases glutaciona dissulfeto reductases (EC 1.8.1.7) de *Homo sapiens*, correspondendo a 22 estruturas do PDB.

Em seguida, foi analisada em maior detalhe a sub-subclasse de oxidoredutases tripanotiona dissulfeto reductases (EC 1.8.1.12), correspondendo a 15 estruturas do PDB.

Por fim, foi analisada em maior detalhe a sub-subclasse de oxidoredutases sulfidril oxidases (EC 1.8.3.2) correspondendo a 22 estruturas do PDB.

As “queries” de pesquisa das estruturas no PDB foram as seguintes:
Oxidoredutases (25/03/2014, atualizada até 24/11/2014)

“Chemical ID: FAD and Polymeric type is Any and Experimental Method is X-RAY and ENZYMECLASSIFICATION is 1: Oxidoreductases and CloseContactsQuery: derivedStructConn.count.comparator=between derivedStructConn.count.min=1 derivedStructConn.count.max=200 and Resolution is between 0.0 and 2.5”.

Glutationa dissulfeto reductases (24/11/2014)

“EnzymeClassificationTree Search for 1.8.1.7: Glutathione-disulfide reductase and TAXONOMY is just Homo sapiens (human) and Resolution is between 0.0 and 2.5”.

Tripanotiona dissulfeto reductases (24/11/2014)

“EnzymeClassificationTree Search for 1.8.1.12: Trypanothione-disulfide reductase and Resolution is between 0.0 and 2.5”.

Sulfidril oxidases (24/11/2014)

“Enzyme Classification Search : EC=1.8.3.2 and CloseContactsQuery: derivedStructConn.count.comparator=between derivedStructConn.count.min=1 derivedStructConn.count.max=200 and Chemical ID(s): FAD and Polymeric type is Any and Resolution is between 0.0 and 2.5”.

As buscas efetuadas nas sub-subclasses EC 1.8.1.7, EC 1.8.1.12 e EC 1.8.3.2 produziram mais 12 resultados, além das 168 estruturas analisadas inicialmente, totalizando 180 estruturas para serem analisadas. Esses 12 resultados não se encontravam incluídos na pesquisa inicial, pois não tinham descritas ligações dissulfeto.

A seleção das sub-subclasses analisadas em maior detalhe foi efetuada com base na observação de características comuns a determinadas sub-subclasses nas 168. Assim, verificaram-se semelhanças estruturais em algumas enzimas que eram classificadas no PDB como glutaciona reductases (GR), outras características eram semelhantes entre enzimas classificadas no PDB como tripanotiona reductases (TR), e algumas características eram semelhantes entre estruturas classificadas no PDB como sulfidril oxidases (SOX).

Os elementos estruturais semelhantes, observados no decorrer do trabalho, que levaram à análise mais detalhada das GR, TR e SOX, foram as seguintes:

- posição e a conformação do FAD nas proteínas;
- a presença de substratos, inibidores e NAD semelhantes nas estruturas e a posição e orientação das ligações dissulfeto e das cisteínas próximas à região isoaloxazina do FAD;
- número (quantidade) de estruturas de cada sub-subclasse.

Todas as estruturas contendo pelo menos uma ligação dissulfeto descrita no arquivo do PDB foram consideradas, independentemente de ser uma ligação dissulfeto na enzima ou em um ligante. O descarte das estruturas que não possuíam ligações dissulfeto na enzima foi feito visualmente, observando a estrutura tridimensional das moléculas.

O limite superior de 2,5 Å para a resolução foi escolhido de forma a obter um conjunto de estruturas com relativamente alta resolução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo, é apresentada a análise das estruturas tridimensionais obtidas do PDB que contêm FAD. Neste estudo, foram avaliadas as ligações covalentes dos anéis da isoaloxazina do FAD, que é onde ocorre a transferência de elétrons nos mecanismos catalíticos das enzimas estudadas. Em seguida, descreve-se a molécula do FAD inserida nas enzimas FAD-dependentes glutatona redutase (GR), tripanotona redutase (TR) e sulfidril oxidase (SOX), e que possuem um grupo tiol relacionado com sua atividade catalítica.

3.1. ESTRUTURAS EM QUE O ENXOFRE PODE EFETUAR INTERAÇÕES SH- π OU S(LP)- π COM O FAD (ISOALOXAZINA)

A análise das 180 estruturas cristalográficas escolhidas como descrito no Capítulo 2 e depositadas no PDB produziu os resultados apresentados na FIGURA 3.1.

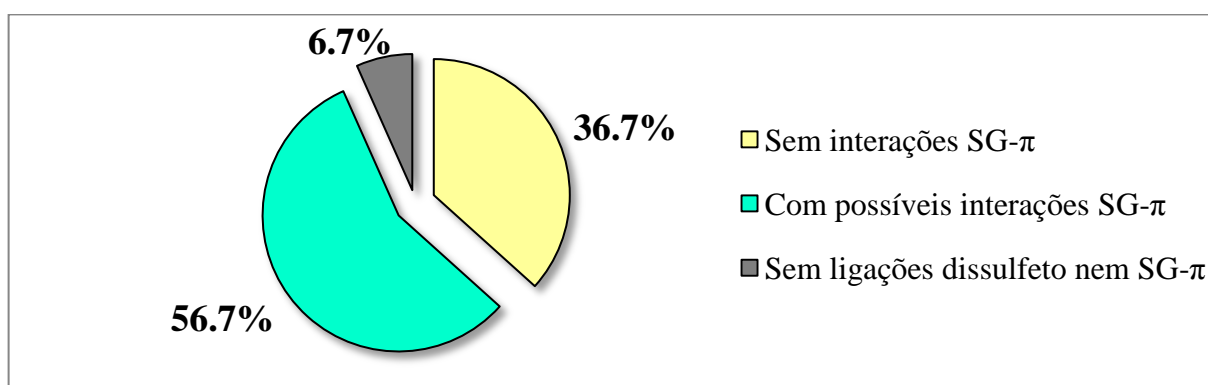


FIGURA 3.1. Representação gráfica da percentagem das estruturas analisadas (180) com interações do tipo SG- π (102) em verde, sem interações SG- π (66) em amarelo, e sem átomos de enxofre envolvidos em interações SG- π (12) em cinzento.

Das 180 estruturas que foram analisadas, 102 foram classificadas pois apresentavam interações SG- π envolvendo um átomo de enxofre próximo a isoaloxazina do FAD. Essa quantidade corresponde a 56,7% das estruturas.

Foram encontradas interações π do tipo ligação de hidrogênio SG-H $\cdots\pi$ (FIGURA 3.2) e interações do tipo SG(*lone pair*)- π (LP- π) (FIGURA 3.3).

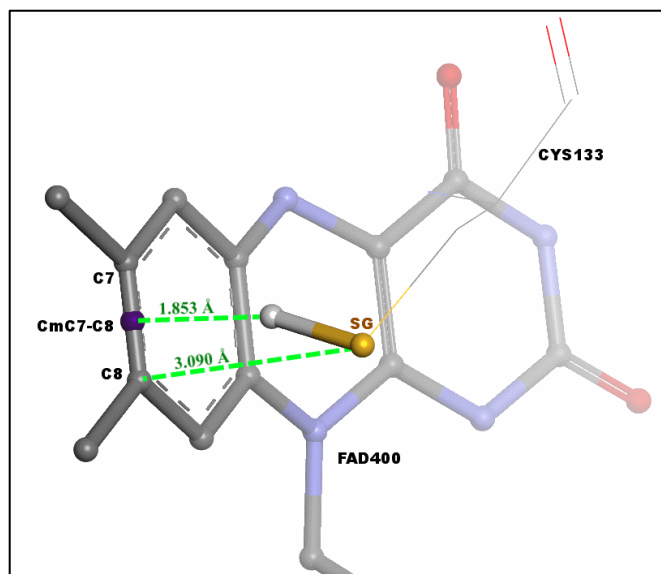


FIGURA 3.2. Detalhe de interação SG-H $\cdots\pi$. A distância de 1,85 Å permite considerar uma ligação de hidrogênio semi-localizada entre o átomo de enxofre e o centroide CmC7-C8 da isoaloxazina do FAD. O código PDB da estrutura é 2Q0L.

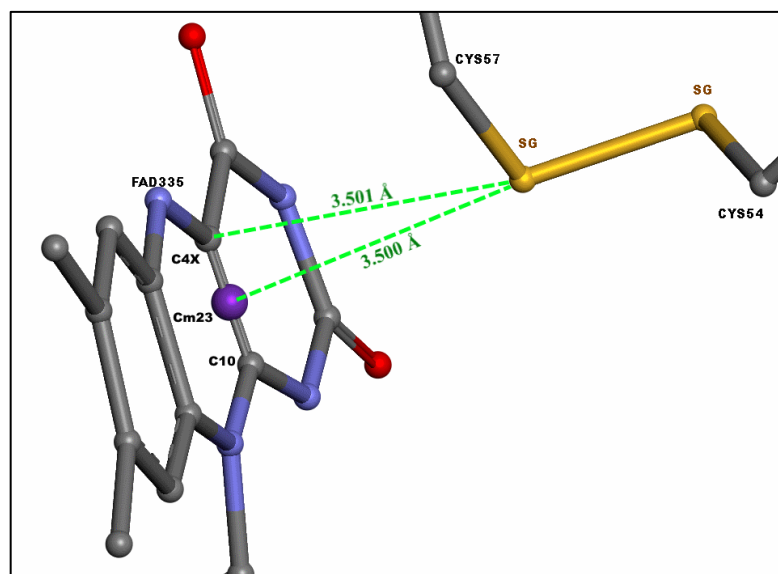


FIGURA 3.3. Detalhe de interação SG(LP) $\cdots\pi$. As distâncias apresentadas mostram uma proximidade maior do átomo de enxofre para o centroide da ligação dupla C4X-C10 e para o átomo C4X da isoaloxazina do FAD. O código PDB da estrutura é 1JR8.

Algumas ligações encontradas pelo programa de cálculo não correspondiam a ligações dissulfeto reais, pois muitas estruturas depositadas no PDB têm as posições de alguns átomos em conformações alternativas,

designados confôrmeros, para as cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos e/ou de ligantes (FIGURA 3.4).

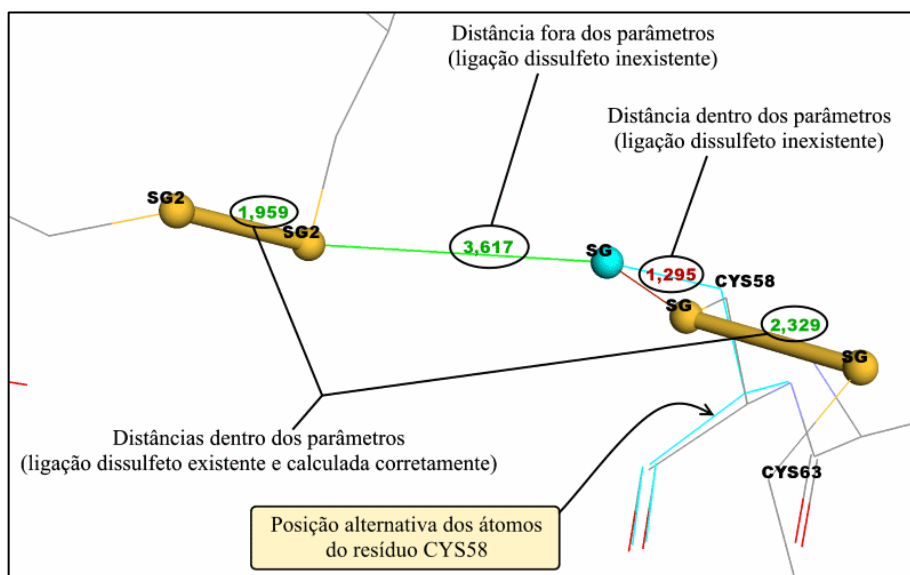


FIGURA 3.4. Exemplo de uma ligação dissulfeto incorretamente determinada pelo programa de cálculo, colorida em vermelho (distâncias em Å). O código PDB deste exemplo é 3DK4.

Dentre as 180 estruturas estudadas, 66 não apresentavam interações $SG \cdots \pi$ entre um átomo de enxofre e a isoaloxazina do FAD. Essa quantidade corresponde a 36,7% das estruturas. Essas estruturas depositadas no PDB, apesar de não apresentarem a interação referida acima, podem ter interações entre átomos de enxofre do grupo dissulfeto e sistemas aromáticos noutras regiões das proteínas. Foram identificados múltiplos casos em que ocorrem interações do tipo $S(LP) - \pi$ entre resíduos de cisteína e resíduos de triptofano, fenilalanina, histidina e tirosina (FIGURA 3.5). Também foram identificadas possíveis interações *lone pair–lone pair* entre o LP de SG e o LP de NE de uma histidina próxima.

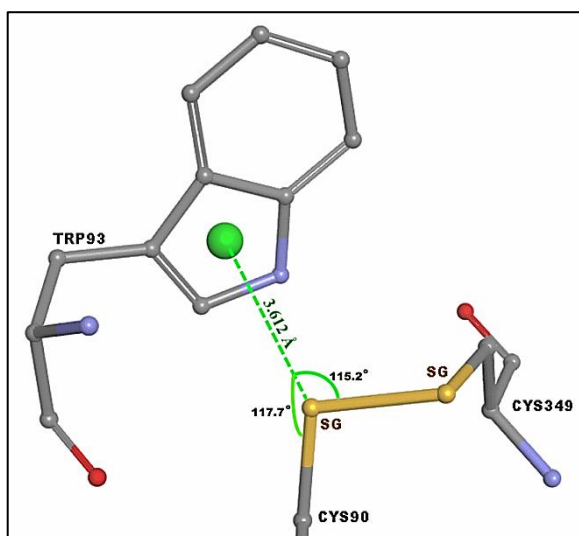


FIGURA 3.5. Exemplo de possível interação do tipo S(LP)- π entre um átomo SG de uma ligação dissulfeto e o sistema indólico de um triptofano. O código PDB deste exemplo é 3M31.

Por fim, das 180 estruturas analisadas, 12 estruturas não possuíam ligações dissulfeto descritas no arquivo do PDB. Essa quantidade corresponde a 6,7% do total de estruturas. No entanto, estas 12 estruturas possuem resíduos de cisteínas, mas a análise mostrou a inexistência de interações π do tipo SH- π nelas.

3.1.1. DISTÂNCIAS S- π ENVOLVENDO O FAD

Utilizando o programa de mapeamento vetorial, foram calculadas as distâncias entre os átomos de enxofre (S) próximos da região isoaloxazina do FAD, com os parâmetros definidos no capítulo 2, para as 180 estruturas de oxidorreductases obtidas do PDB. Classificaram-se como interações, para serem analisadas, sempre que as distâncias entre S e os centroides da isoaloxazina do FAD eram iguais ou inferiores a 4,18 Å, o que corresponde à soma dos raios de van der Waals para S e para o benzeno na região dos carbonos, acrescentada de 10% (3,80 Å + 10%).

Foram encontradas 235 interações SG- π com FAD em 102 estruturas do PDB. Dessas, 226 eram do tipo SG(LP)- π , contidas em 97 estruturas, e 9 do tipo SG-H- π , em 5 estruturas. Duas estruturas, 3HYW e 3HYV, apresentaram 9 interações S(LP)- π com a isoaloxazina do FAD, mas os

átomos de enxofre não pertenciam a um resíduo de cisteína. Nesses dois casos os átomos S pertenciam a um ligante designado como PS9 (MARCIA et al., 2009). Em todas as outras estruturas o átomo de enxofre interagindo com FAD era o átomo SG de uma cisteína.

De acordo com a marcação dos centroides no FAD, apresentadas na FIGURA 2.4 (Capítulo 2), foram calculadas e conferidas as distâncias, recorrendo ao programa de mapeamento vetorial e ao programa de visualização gráfica.

Os resultados da análise dessas distâncias são apresentados na TABELA 3.1 e as distribuições das distâncias das interações, para cada tipo de interação, são apresentadas na FIGURA 3.6. As interações com cada um dos centroides, definidas pela menor distância SG-centroide, são apresentadas na TABELA 3.2.

TABELA 3.1. Interações S- π encontradas na análise de 102 estruturas do PDB

| Tipo de interação | Número de interações | Distância Mínima (Å) | Distância Máxima (Å) | Distância Média (Å) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Todas | 235 | 2,93 | 4,11 | 3,36 |
| SH- π | 9 | 3,04 | 3,40 | 3,18 |
| S(LP)- π | 226 | 2,93 | 4,11 | 3,36 |

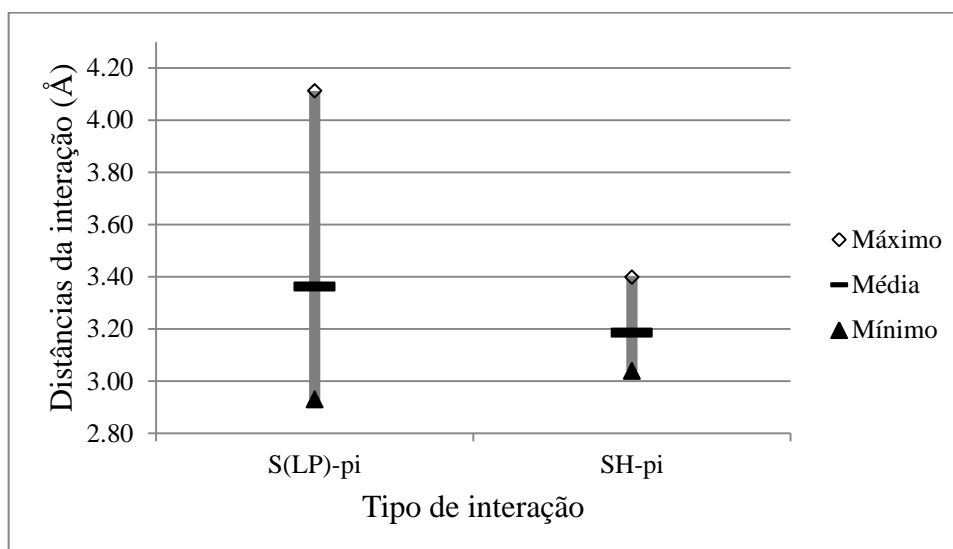


FIGURA 3.6. Distribuição das distâncias de interação S- π , de acordo com o tipo de interação.

TABELA 3.2. Distribuição das interações por centroide da isoaloxazina do FAD interagindo com S*

| Centroide da isoaloxazina do FAD | Número de interações |
|----------------------------------|----------------------|
| Cm23 (U/P) | 144 |
| Ct36 (U) | 83 |
| Ct26 (P) | 5 |
| Cm12 (P/B) | 1 |
| Ct16 (B) | 2 |

*As letras U, P e B correspondem aos anéis uracílico, pirazínico e dimetilbenzênico, respectivamente. As notações U/P e P/B correspondem aos centroides médios dos anéis anotados

3.2. CONFORMAÇÕES DO FAD

Após análise de todas as 180 estruturas, foram encontrados apenas dois padrões extremos na conformação da molécula do FAD, de forma que a sua conformação pode ser dividida em dois tipos diferentes: FAD “distendido” e FAD “em U”, e que são apresentados, com exemplos, na FIGURA 3.7.

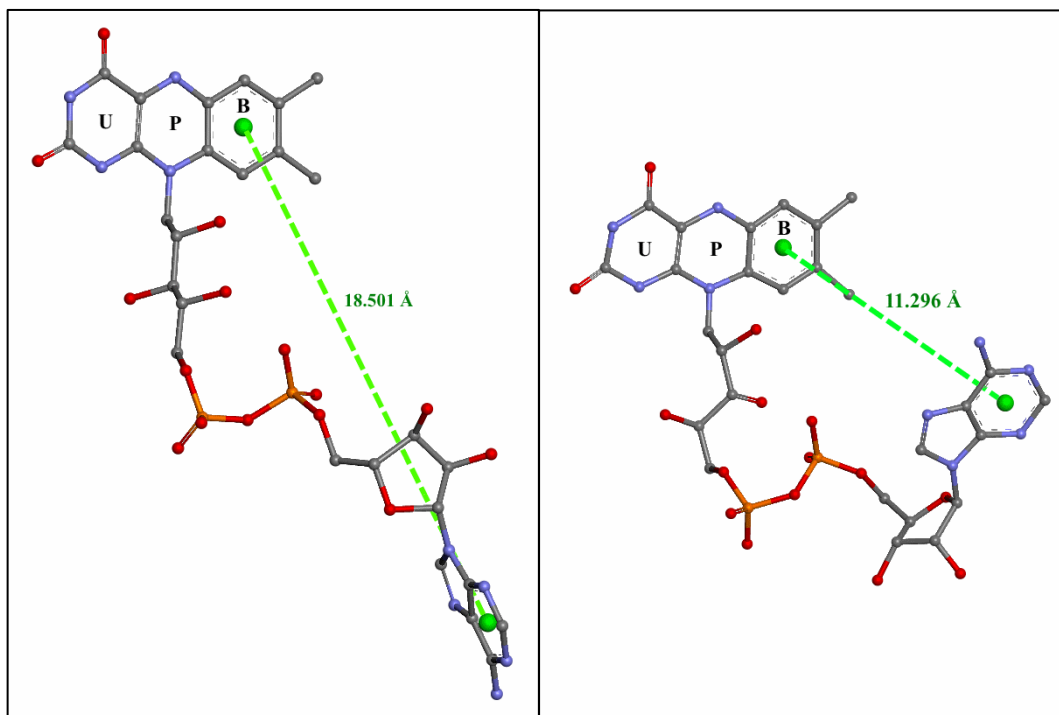


FIGURA 3.7. Dois exemplos das conformações mais extremas do FAD encontradas no decurso do trabalho. Na esquerda, FAD “distendido”, com distância de 18,50 Å entre o anel B e o anel de seis membros da adenina (PDB-ID: 2EQ6). Na direita, FAD “em U”, com distância de 11,30 Å entre o anel B e o anel de seis membros da adenina (PDB-ID: 1JR8).

O FAD “distendido” apresenta as regiões isoaloxazina e adenina distantes na ordem de 18,0 Å, mais afastadas do que no FAD “em U”, cuja distância é da ordem de 11,0 Å. Entre estes dois extremos de distância isoaloxazina-adenina, há muitas variações da conformação do FAD, e que poderão ser analisadas posteriormente, noutros trabalhos.

3.3. DEFORMAÇÕES DA REGIÃO ISOALOXAZINA DO FAD

A análise visual da região isoaloxazina de 360 estruturas do FAD permitiu encontrar cinco tipos de deformação da isoaloxazina: “planar”; “curva”; “dobra”; “torção”; e “outras”. Essa classificação foi resultado da observação da região isoaloxazina a partir do átomo N5 sobreposto ao átomo N10, com o anel U posicionado na região superior do campo de observação (FIGURA 3.8).

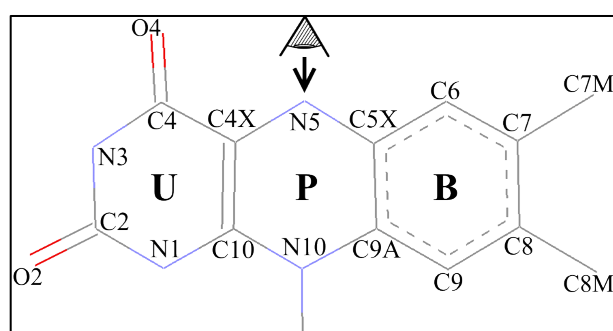


FIGURA 3.8. O olho e a seta no centro-topo da imagem representam a posição de observação da região isoaloxazina do FAD. O anel U fica na parte superior do campo de observação, enquanto o anel B fica na parte inferior do campo. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A classificação “planar” dos três anéis fusionados da isoaloxazina corresponde à ausência de deformação, ou seja, os três anéis (U, P e B) encontram-se no mesmo plano (FIGURA 3.9).

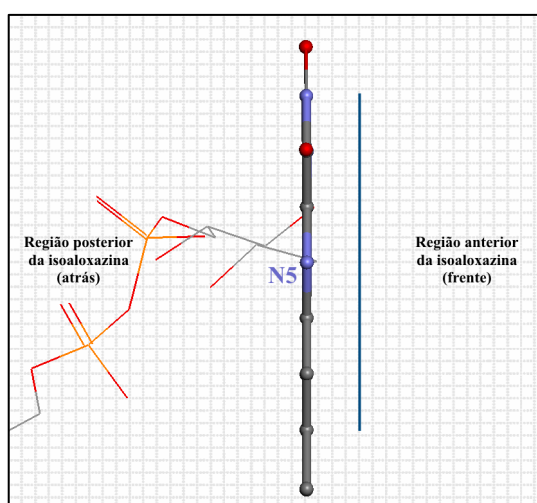


FIGURA 3.9. Representação da deformação “planar” da região isoaloxazina do FAD. A linha azul desenhada em frente à isoaloxazina representa a coplanaridade dos anéis U, P e B. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A classificação “curva” da região isoaloxazina corresponde a uma deformação em que os anéis U e B se encontram fletidos para a mesma região da molécula, anterior, ou posterior (FIGURA 3.10).

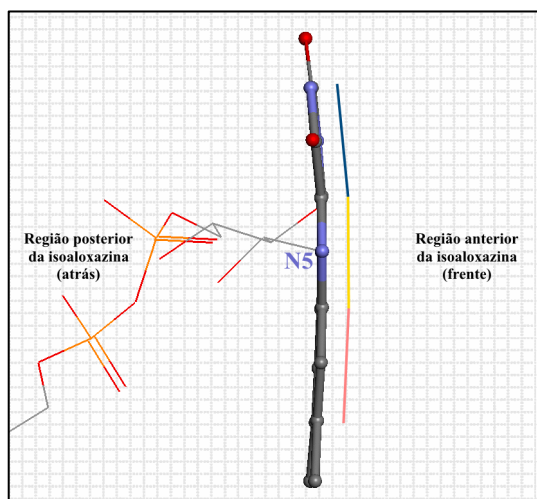


FIGURA 3.10. Representação da deformação “curva” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os planos dos anéis U, P e B. Pode perceber-se a flexão dos anéis U e B para a região posterior da isoaloxazina. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A classificação “dobra” da região isoaloxazina corresponde a uma deformação em que os três anéis, U, P e B, se encontram inscritos em dois planos diferentes, concorrentes na reta que une N5 a N10, ou C4X a C10, ou C5X a C9A. A região isoaloxazina apresenta, assim, uma flexão, que permite que o anel P se encontre dobrado e os anéis U e P fletidos para a região anterior, ou posterior, da isoaloxazina (FIGURA 3.11).

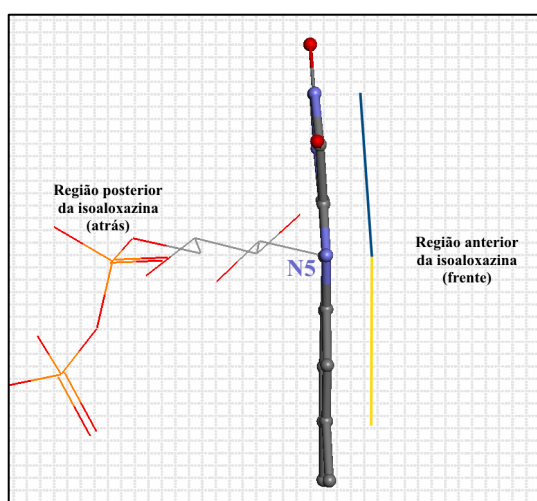


FIGURA 3.11. Representação da deformação “dobra” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os dois planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel B, o anel U e metade do anel P encontram-se fletidos para a região posterior da isoaloxazina. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A classificação “torção”, ou *twist*, da região isoaloxazina, corresponde a uma torção dos anéis U e B, que pode provocar a torção do anel P. Em todos os casos analisados, o anel U, da forma como está representado na FIGURA 3.12, encontra-se torcido no sentido horário, enquanto o anel B se encontra torcido no sentido anti-horário, tendo como referência o anel P, que é o “eixo” da torção da isoaloxazina (FIGURA 3.12).

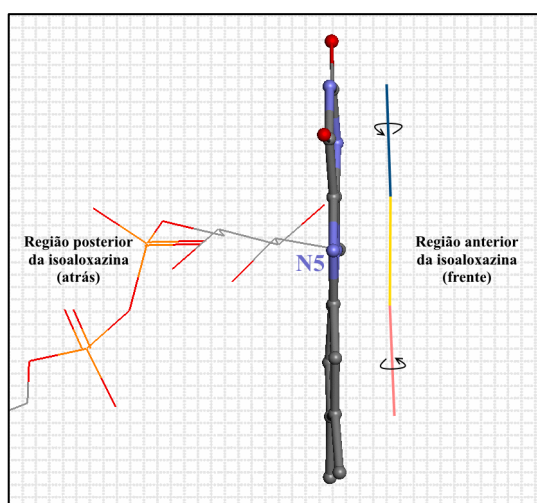


FIGURA 3.12. Representação da deformação “torção” da região isoaloxazina do FAD. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os três planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel P, o plano do anel U encontra-se torcido em sentido horário e o plano do anel P encontra-se torcido em sentido anti-horário (setas pretas). Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A classificação “outras” corresponde aos casos em que a isoaloxazina do FAD possui várias das deformações descritas anteriormente, em simultâneo (FIGURA 3.13 e FIGURA 3.14).

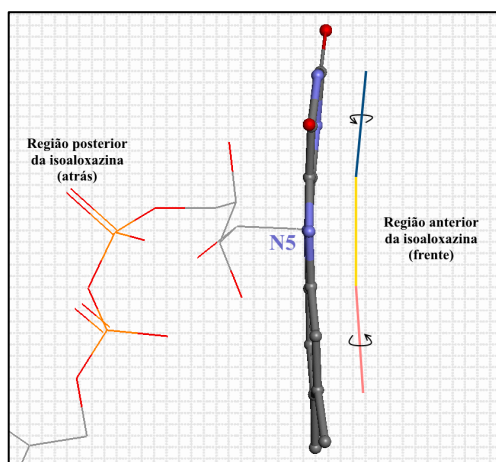


FIGURA 3.13. Representação da deformação “curva-torção” da região isoaloxazina do FAD, classificada como “outras”. A linha colorida quebrada, desenhada em frente à isoaloxazina representa os três planos em que os três anéis, U, P e B, estão inscritos. Tomando como referência o anel P, o plano do anel U encontra-se torcido em sentido horário e o plano do anel P encontra-se torcido em sentido anti-horário (setas pretas). Os átomos de hidrogênio não estão representados.

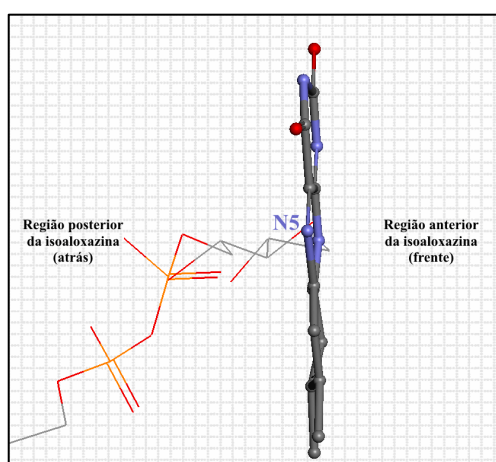


FIGURA 3.14. Representação da deformação, sem designação atribuída, da região isoaloxazina do FAD. Os três anéis estão muito deformados, dificultando a classificação relativa das deformações. Os átomos N5 e N1 estão desprotonados, o que pode contribuir para a deformação observada. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Algumas estruturas depositadas no PDB, apesar de possuírem uma resolução melhor que 2,5 Å, tinham uma má definição da região do FAD, o que resulta numa determinação da posição dos átomos menos precisa.

3.3.1. DEFORMAÇÃO DA ISOALOXAZINA DO FAD EM GR, TR E SOX

A análise das 22 estruturas de GR, contendo 24 moléculas de FAD, permitiu classificar cada uma das moléculas de acordo com o sistema definido na secção anterior e o resultado está apresentado na TABELA 3.3.

TABELA 3.3. Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de GR

| Deformação | Número de FADs | % |
|------------|----------------|-------------|
| Curva | 1 | 4,2 |
| Dobra | 4 | 16,7 |
| Torção | 13 | 54,2 |
| Planar | 3 | 12,5 |
| Outra | 3 | 12,5 |

Os dados da TABELA 3.3 mostram que a maioria (54,2%) das moléculas de FAD em GR apresenta a deformação tipo “torção”.

O resultado da análise das 15 estruturas de TR, contendo 46 moléculas de FAD, pode ser visto na TABELA 3.4.

TABELA 3.4. Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de TR

| Deformação | Número de FADs | % |
|------------|----------------|-------------|
| Curva | 8 | 17,4 |
| Dobra | 1 | 2,2 |
| Torção | 8 | 17,4 |
| Planar | 29 | 63,0 |
| Outra | 0 | 0 |

Os dados da TABELA 3.4 mostram que a maioria (63,0%) das moléculas de FAD em TR possui deformação “planar”.

O resultado da análise da deformação da região isoaloxazina do FAD para as 22 estruturas de SOX está apresentado na TABELA 3.5.

TABELA 3.5. Percentagem de moléculas de FAD classificadas de acordo com a deformação apresentada nas estruturas de SOX

| Deformação | Número de FADs | % |
|------------|----------------|-------------|
| Curva | 11 | 24,4 |
| Dobra | 3 | 6,7 |
| Torção | 3 | 6,7 |
| Planar | 21 | 46,7 |
| Outra | 7 | 15,6 |

Os dados da TABELA 3.5 mostram que a maioria (46,7%) das moléculas de FAD em SOX apresenta deformação tipo “planar”.

A comparação das deformações preferenciais em cada sub-subclasse das oxidorreductases estudadas está mostrada na FIGURA 3.15.

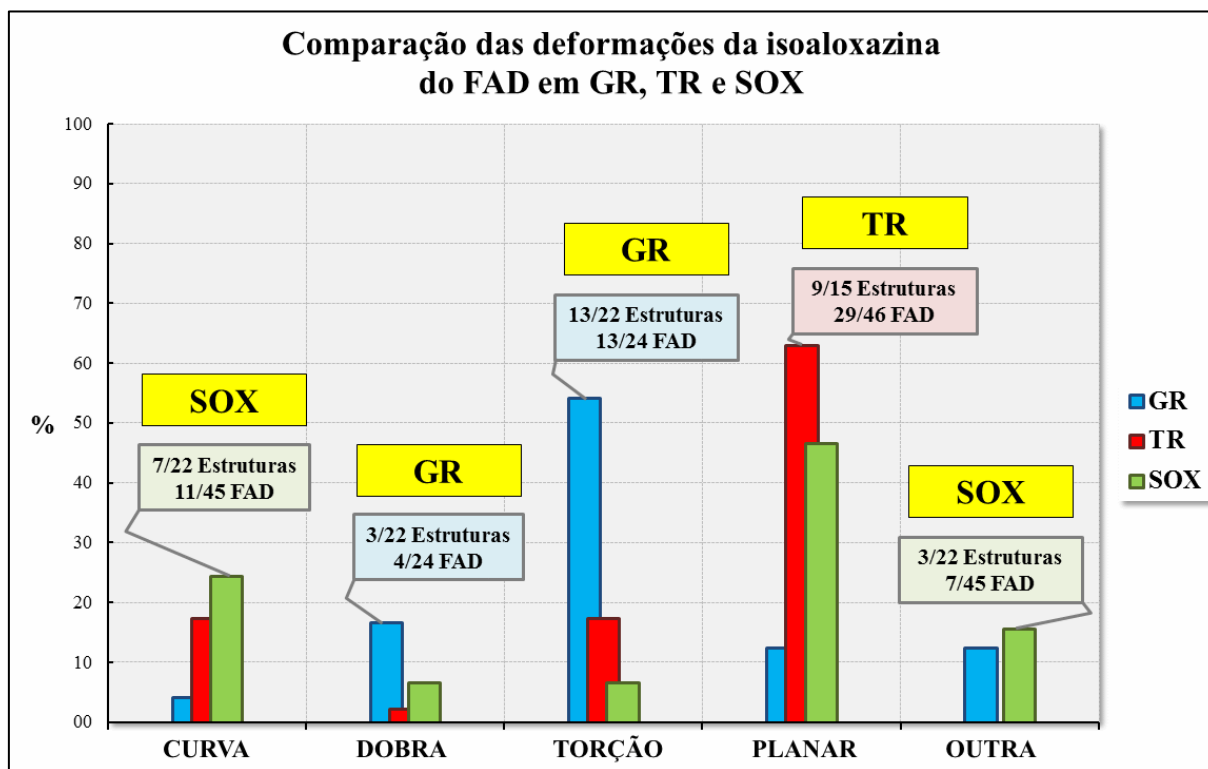


FIGURA 3.15. Comparação do número de estruturas (e do número de FADs) em cada sub-subclasse de oxidorreductases com as deformações observadas.

A observação da FIGURA 3.15 permite perceber que: a deformação “curva” ocorre mais significativamente nas estruturas de SOX; a deformação “dobra” ocorre mais significativamente nas estruturas de GR; a deformação “torção” ocorre mais significativamente nas estruturas de GR; e a deformação “planar” ocorre mais significativamente nas estruturas de TR. A classificação “outras”, necessita de mais parâmetros para poder ser aplicada com rigor, pois contém combinações de várias deformações, bem como deformações que não são passíveis de ser classificadas de acordo com o sistema definido neste trabalho.

3.3.2. DEFORMAÇÃO “BUTTERFLY” DA REGIÃO ISOALOXAZINA DO FAD

A deformação da região isoaloxazina reportada na literatura refere a um “movimento de asas de borboleta”, em relação à conformação “planar”. Esse movimento não pode ser confirmado nas análises realizadas, mas algumas deformações encontradas em estruturas diferentes permitiu observar que a deformação “dobra” pode surgir com os anéis U e B fletidos para a região anterior (frente) da isoaloxazina, como fletidos para a região posterior (atrás) da isoaloxazina. Um exemplo dessas deformações é apresentado na FIGURA 3.16.

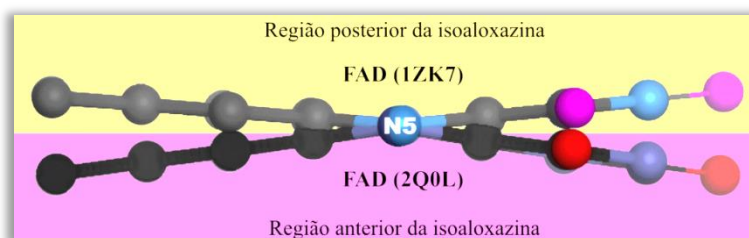


FIGURA 3.16. Representação da deformação “butterfly” da região isoaloxazina do FAD. Os átomos de carbono do FAD da estrutura com código PDB-ID 1ZK7 estão coloridos de cinzento. Os átomos de carbono do FAD da estrutura com código PDB-ID 2Q0L estão coloridos de preto. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

3.4. COMPRIMENTOS DE LIGAÇÃO DA REGIÃO ISOALOXAZINA DO FAD (GR, TR, SOX)

Esta secção do trabalho centrou-se na análise dos comprimentos de ligação entre os átomos dos anéis fusionados da região isoaloxazina do FAD em 59 estruturas de três sub-subclasses de oxidoreductases, GR, TR e SOX. Não foram analisados os comprimentos de ligação entre os seguintes pares de átomos: C2=O2; C4=O4; C7–C7M; C8–C8M (ver FIGURA 3.8).

3.4.1. GLUTATIONA REDUTASES (GR)

Foram analisadas 22 estruturas de glutathione reductases (GR) contendo 24 moléculas de FAD.

A comparação dos comprimentos de ligação entre os átomos ligados dos anéis da região isoaloxazina do FAD em GR é apresentada na FIGURA 3.17.

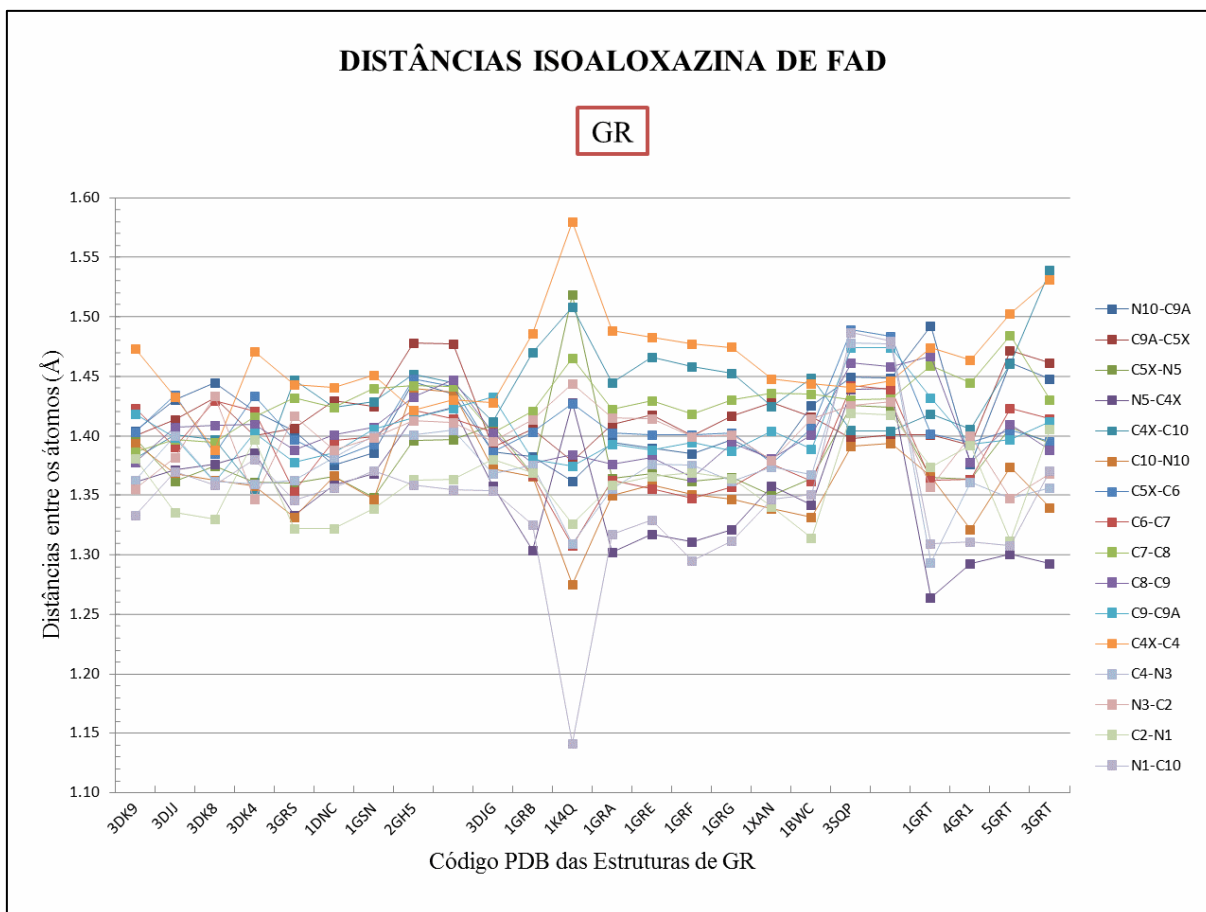


FIGURA 3.17. Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em GR. Os espaços em branco no eixo das abscissas correspondem a uma segunda molécula de FAD da estrutura anterior no eixo.

A análise da FIGURA 3.17 mostra que os comprimentos de todas as ligações se encontram entre 1,10 Å e 1,60 Å, independentemente de se tratar de uma ligação C–C, C–N, C=C, C=N, ou C≡C. Na maioria dos casos observados, os comprimentos de ligação variam entre 1,25 Å e 1,55 Å.

Na FIGURA 3.17 é possível observar que a estrutura de código PDB-ID 1K4Q é a que apresenta maior variação dos comprimentos das ligações na isoaloxazina do FAD, e a estrutura de código PDB-ID 3SQP é a que apresenta menor variação nos comprimentos das ligações. As ligações

covalentes em 3SQP apresentam comprimentos muito próximos, variando entre 1,38 Å e 1,49 Å, mesmo tratando-se de ligações de natureza diferentes.

Para uma análise mais clara dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em GR, foi elaborada FIGURA 3.18 com os valores máximos, mínimos e o valor médio de comprimento de cada ligação covalente, o que permitiu visualizar a amplitude da variação dos comprimentos de ligação e a sua relação com o valor médio.

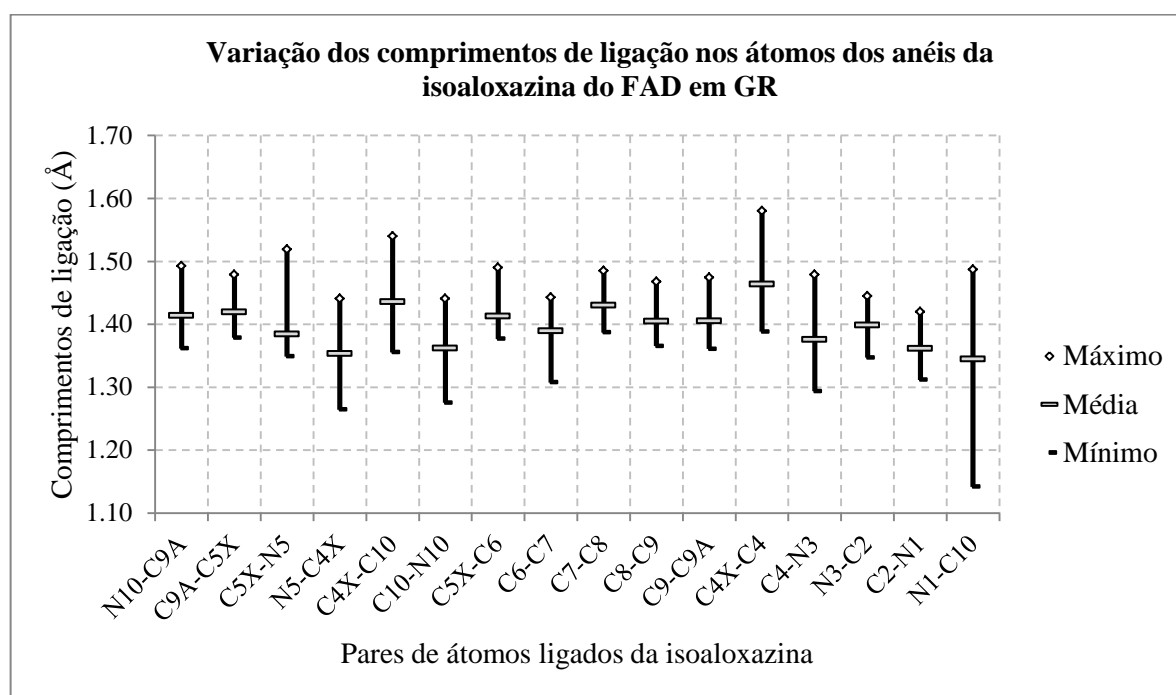


FIGURA 3.18. Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em GR.

A análise da FIGURA 3.18 mostra que o valor médio dos comprimentos de ligação se situa próximo do valor mediano de cada ligação covalente, à exceção da ligação C5X-N5, cujo valor médio é muito mais próximo do valor mínimo encontrado, do que do valor máximo.

Para uma análise complementar dos comprimentos das ligações na isoaloxazina de GR, foram calculados os valores médio, máximo e mínimo dos comprimentos observados para cada ligação covalente e comparados com uma variação de $\pm 10\%$ do valor médio. Os resultados dessa comparação são apresentados na TABELA 3.6.

TABELA 3.6. Comparação dos comprimentos de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD em GR

| | Média(Å) | Média +10%(Å) | Máximo(Å) | Média -10%(Å) | Mínimo(Å) |
|----------------|----------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| N10-C9A | 1,41 | 1,55 | 1,49 | 1,27 | 1,36 |
| C9A-C5X | 1,42 | 1,56 | 1,48 | 1,28 | 1,38 |
| C5X-N5 | 1,38 | 1,52 | 1,52 | 1,25 | 1,35 |
| N5-C4X | 1,35 | 1,49 | 1,44 | 1,22 | 1,26 |
| C4X-C10 | 1,44 | 1,58 | 1,54 | 1,29 | 1,36 |
| C10-N10 | 1,36 | 1,50 | 1,44 | 1,23 | 1,28 |
| C5X-C6 | 1,41 | 1,55 | 1,49 | 1,27 | 1,38 |
| C6-C7 | 1,39 | 1,53 | 1,44 | 1,25 | 1,31 |
| C7-C8 | 1,43 | 1,57 | 1,48 | 1,29 | 1,39 |
| C8-C9 | 1,40 | 1,54 | 1,47 | 1,26 | 1,37 |
| C9-C9A | 1,40 | 1,55 | 1,47 | 1,26 | 1,36 |
| C4X-C4 | 1,46 | 1,61 | 1,58 | 1,32 | 1,39 |
| C4-N3 | 1,38 | 1,51 | 1,48 | 1,24 | 1,29 |
| N3-C2 | 1,40 | 1,54 | 1,44 | 1,26 | 1,35 |
| C2-N1 | 1,36 | 1,50 | 1,42 | 1,22 | 1,31 |
| N1-C10 | 1,34 | 1,48 | 1,49 | 1,21 | 1,14 |

À exceção de dois valores de comprimentos de ligação, todos os outros se encontram dentro do intervalo de $\pm 10\%$ do valor médio do comprimento de cada ligação na isoaloxazina do FAD em GR. Os comprimentos máximo e mínimo da ligação N1-C10 (em negrito na TABELA 3.6), são os que mais variam e, relacionando com a FIGURA 3.17, podemos ver que o valor máximo corresponde ao comprimento da ligação N1-C10 na isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 1K4Q e o valor mínimo corresponde ao comprimento da ligação da ligação N1-C10 na isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 3SQP.

Considerando essas observações, foram exploradas, em detalhe, as estruturas da isoaloxazina do FAD em 1K4Q e em 3SQP.

Em 1K4Q, observou-se uma isoaloxazina bastante deformada, em que os átomos de N5 e N1 se encontram desprotonados, o que leva à ligação C4X-C10 ser de ordem simples. A FIGURA 3.19 mostra a região isoaloxazina do FAD oxidado em 1K4Q. Neste exemplo, podemos questionar os dados obtidos do arquivo depositado no PDB, pois o comprimento da ligação dupla

entre N1 e C10 é de 1,14 Å, muito inferior ao valor de comprimento de uma ligação dupla padrão N=C (1,28 Å).

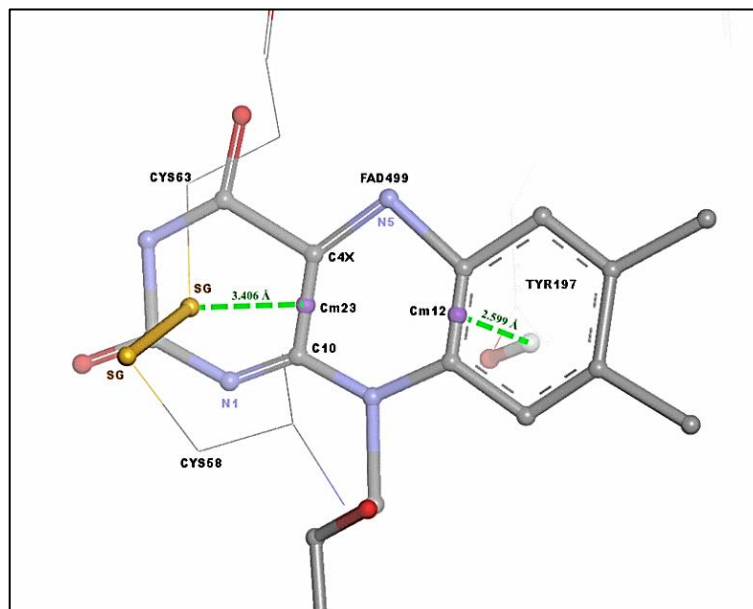


FIGURA 3.19. Detalhe da região isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 1K4Q. Pode-se observar a presença de uma ligação dupla entre os átomos N5-C4X e C10-N1. Apenas o átomo de hidrogênio da hidroxila de TYR197 está representado. A ligação C4X-C10 é simples. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Em 3SQP, que contém duas moléculas de FAD, observou-se uma isoaloxazina planar, com um anel U aromático, devido aos átomos N1 e N3 estarem desprotonados, nas duas moléculas. A presença de dois anéis aromáticos na isoaloxazina do FAD pode estar relacionada com a observação de comprimentos de ligação muito semelhantes entre os diferentes átomos da isoaloxazina. A FIGURA 3.20 mostra a região isoaloxazina de uma das moléculas de FAD em 3SQP.

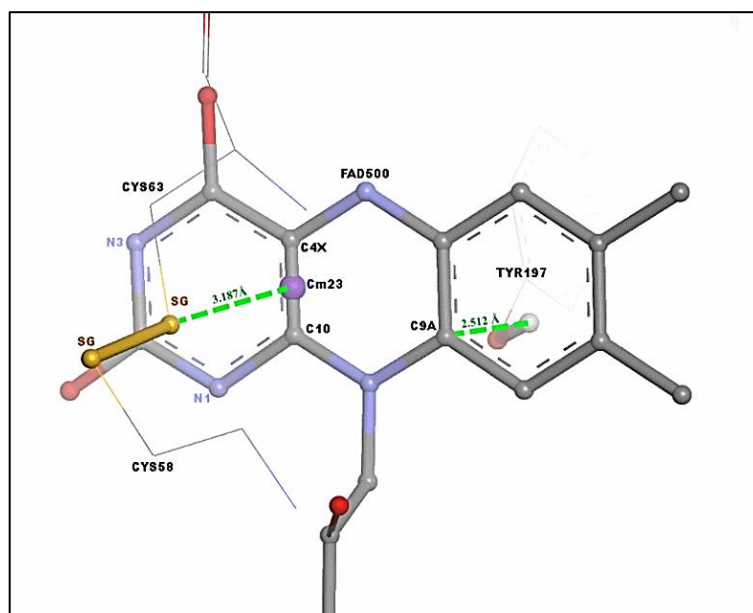


FIGURA 3.20. Detalhe da região isoaloxazina do FAD da estrutura PDB-ID 3SQP. Apenas o átomo de hidrogênio da hidroxila de TYR197 está representado. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Foi calculada a correlação entre todos os comprimentos de ligação da isoaloxazina do FAD em GR, com o intuito de perceber se algumas distâncias variam no mesmo sentido, ou em sentidos opostos, nas estruturas analisadas. Foi considerada uma boa correlação sempre que o fator de correlação $|R|$ fosse maior do que 0,800. Apenas foi encontrada uma correlação positiva com $R > 0,800$, relativa aos comprimentos entre C4-N3 e N1-C10, com $R = 0,812$ (FIGURA 3.21).

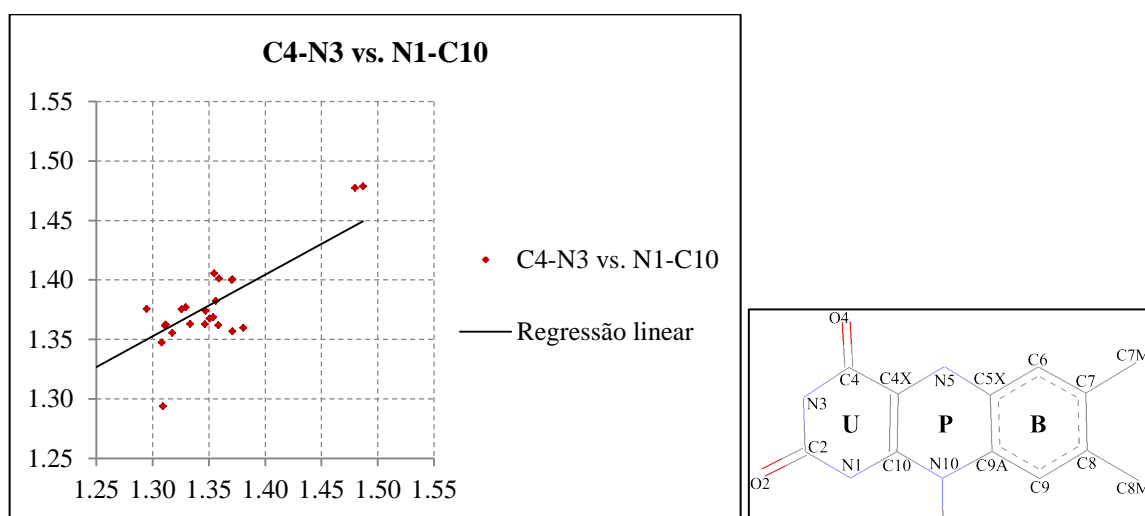


FIGURA 3.21. Correlação entre as distâncias C4-N3 e N1-C10 em 22 FAD de GR. $R = 0,812$.

Pode-se, assim, concluir que, em moléculas FAD de GR, o comprimento da ligação C4-N3 varia de forma correlacionada com comprimento da ligação N1-C10.

3.4.2. TRIPANOTIONA REDUTASES (TR)

Foram analisadas as regiões isoaloxazina de 46 moléculas de FAD contidas em 15 estruturas da enzima tripanotiona redutase (TR).

A comparação dos comprimentos de ligação entre os átomos ligados dos anéis da região isoaloxazina do FAD em TR é apresentada na FIGURA 3.22.

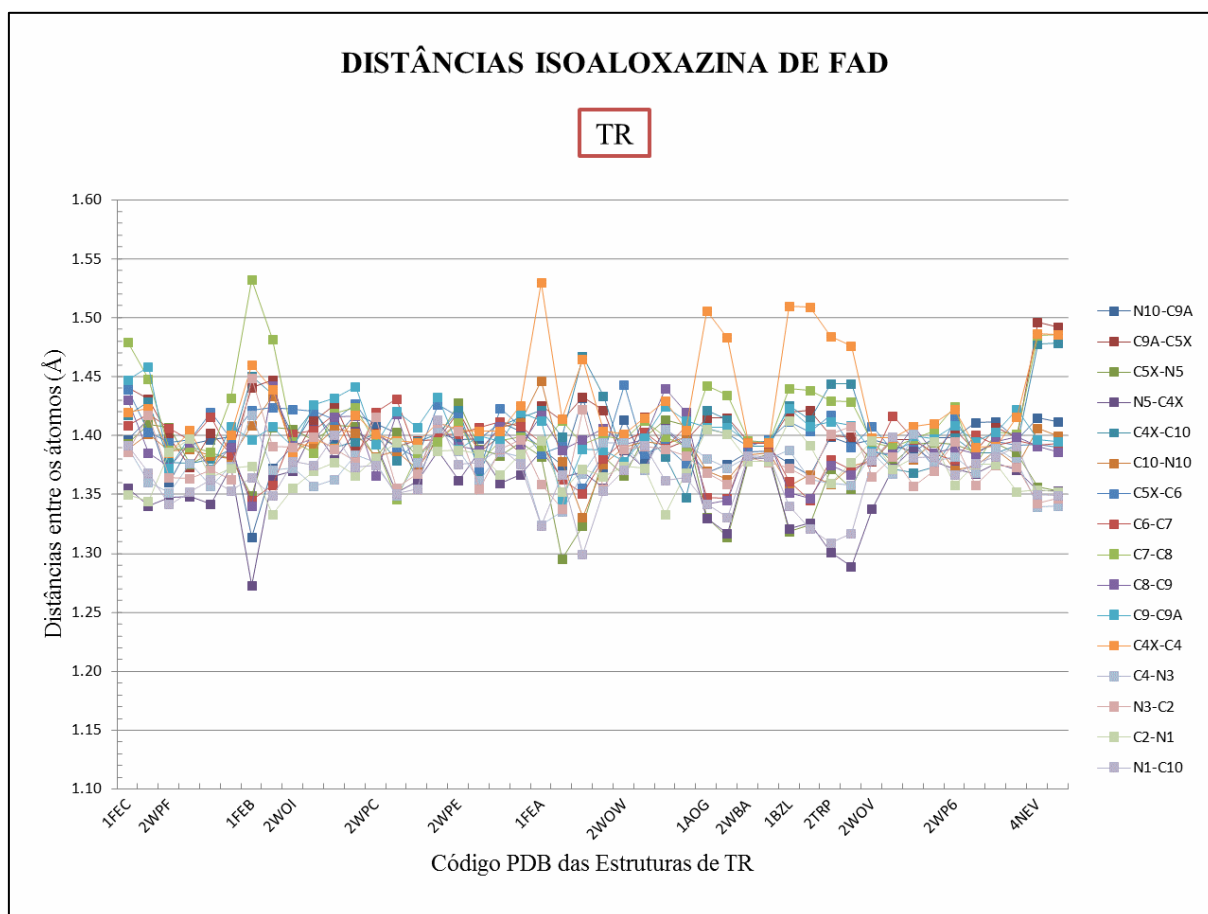


FIGURA 3.22. Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em TR. Os espaços em branco no eixo das abcissas correspondem a mais do que uma molécula de FAD da estrutura anterior no eixo.

A análise da FIGURA 3.22 mostra que os comprimentos de todas as ligações se encontram entre 1,26 Å e 1,54 Å, independentemente de se tratar de

uma ligação C–C, C–N, C=C, C=N, ou C \equiv C. Em comparação com os dados de GR, os comprimentos de ligação variam muito menos (1,33 Å a 1,48 Å), com a exceção de seis estruturas: 1FEB; 1FEA; 1AOG; 1BZL; 2TRP; 4NEV.

Na FIGURA 3.22 é possível reparar que a estrutura de código PDB-ID 1FEB é a que apresenta maior variação dos comprimentos das ligações na isoaloxazina do FAD. Em quase todas as estruturas, as ligações apresentam comprimentos muito próximos, mesmo tratando-se de ligações de natureza e ordem diferentes.

Tal como para GR, para uma análise mais clara dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em TR, foi elaborado o gráfico da FIGURA 3.23 com os valores máximos, mínimos e o valor médio de comprimento de cada ligação covalente da isoaloxazina, o que permitiu visualizar a amplitude de variação dos comprimentos de ligação e a sua relação com o valor médio.

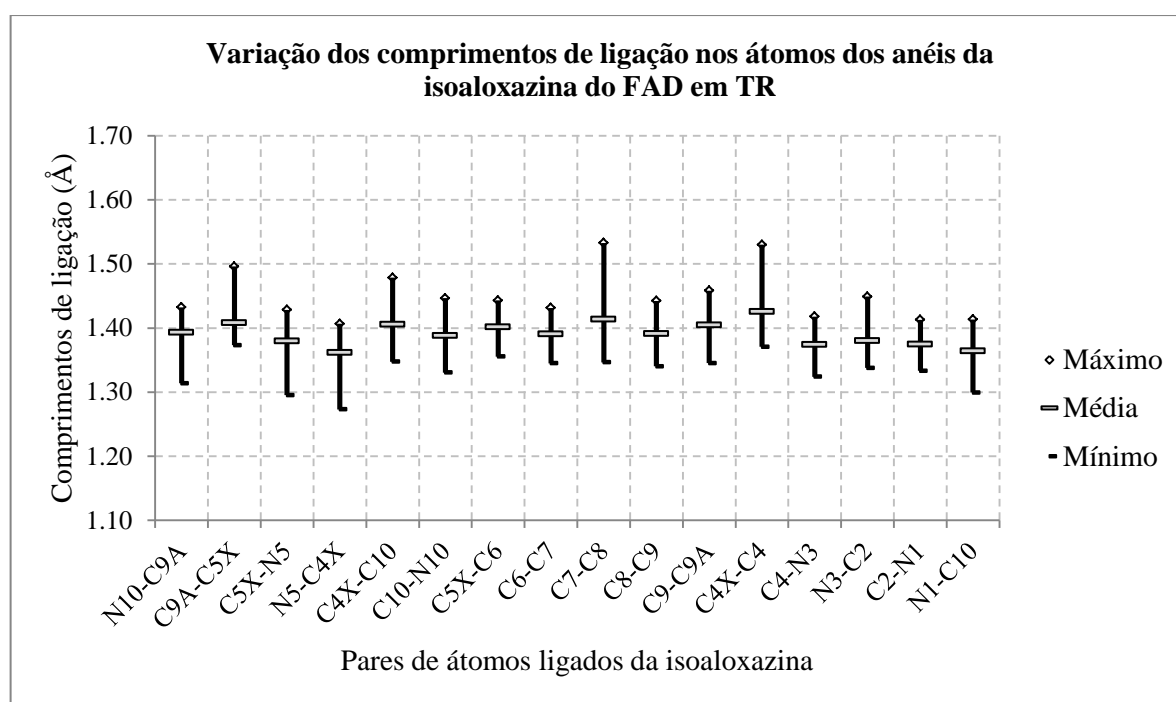


FIGURA 3.23. Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em TR.

A análise do gráfico da FIGURA 3.23 permite perceber, por um lado, que os valores médios dos comprimentos das ligações N10-C9A, C5X-N5, N5-C4X e N1-C10 se situam deslocados para o valor mínimo de comprimento

de cada ligação covalente, em relação ao valor mediano. Por outro lado, os comprimentos das ligações C9A-C5X, C7-C8, C4X-C4 e N3-C2 têm a média deslocada para o valor máximo de comprimento de cada ligação, em relação com a mediana. Todos os outros comprimentos de ligação estão próximos do valor mediano da distribuição da respectiva ligação.

Para uma análise complementar foram calculados os valores médio, máximo e mínimo dos comprimentos observados para cada ligação covalente e comparados com uma variação de $\pm 10\%$ do valor médio. Os resultados dessa comparação são apresentados na TABELA 3.7.

TABELA 3.7. Comparação dos comprimentos médio, máximo e mínimo, de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD em TR

| | Média(Å) | Média 10%(Å) | Máximo(Å) | Média -10%(Å) | Mínimo(Å) |
|----------------|----------|--------------|-----------|---------------|-----------|
| N10-C9A | 1,39 | 1,53 | 1,43 | 1,25 | 1,31 |
| C9A-C5X | 1,41 | 1,55 | 1,50 | 1,27 | 1,37 |
| C5X-N5 | 1,38 | 1,52 | 1,43 | 1,24 | 1,30 |
| N5-C4X | 1,36 | 1,50 | 1,41 | 1,23 | 1,27 |
| C4X-C10 | 1,41 | 1,55 | 1,48 | 1,26 | 1,35 |
| C10-N10 | 1,39 | 1,53 | 1,45 | 1,25 | 1,33 |
| C5X-C6 | 1,40 | 1,54 | 1,44 | 1,26 | 1,36 |
| C6-C7 | 1,39 | 1,53 | 1,43 | 1,25 | 1,35 |
| C7-C8 | 1,41 | 1,56 | 1,53 | 1,27 | 1,35 |
| C8-C9 | 1,39 | 1,53 | 1,44 | 1,25 | 1,34 |
| C9-C9A | 1,40 | 1,54 | 1,46 | 1,26 | 1,35 |
| C4X-C4 | 1,43 | 1,57 | 1,53 | 1,28 | 1,37 |
| C4-N3 | 1,37 | 1,51 | 1,42 | 1,24 | 1,32 |
| N3-C2 | 1,38 | 1,52 | 1,45 | 1,24 | 1,34 |
| C2-N1 | 1,37 | 1,51 | 1,41 | 1,24 | 1,33 |
| N1-C10 | 1,36 | 1,50 | 1,41 | 1,23 | 1,30 |

Todos os valores se encontram dentro do intervalo de $\pm 10\%$ do valor médio do comprimento de cada ligação na isoaloxazina do FAD em TR.

Vale lembrar que problemas com a estrutura cristalográfica pode resultar numa determinação inexata ou imprecisa das posições atômicas. Todas as análises realizadas partiram do pressuposto que a alta resolução das estruturas

crystalográficas (maior do que 2,5 Å) permite uma confiança elevada na posição determinada para os átomos da estrutura, quer da proteína, quer dos ligantes.

Considerando essas observações, foram exploradas, em detalhe, as estruturas da isoaloxazina do FAD em 1FEB, 1FEA, 1AOG, 1BZL, 2TRP e em 4NEV.

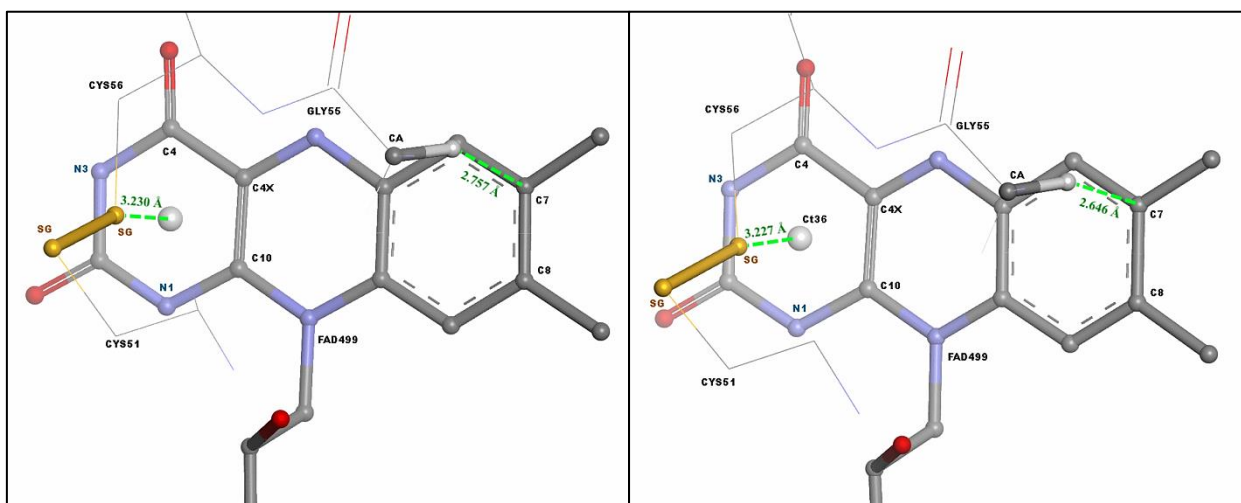


FIGURA 3.24. Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 1FEB. A imagem da esquerda corresponde ao FAD da cadeia A de 1FEB. A imagem da direita corresponde ao FAD da cadeia B de 1FEB. Apenas os átomos de hidrogênio de CA de GLY55 estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Em relação à estrutura 1FEB, a observação dos detalhes mostrados na FIGURA 3.24 mostra que há uma provável ligação de hidrogênio C-H \cdots π localizada, entre o CA do resíduo de glicina 55 e o átomo C7 do FAD ($d = 2,67$ Å). Esta interação pode ser a responsável pelo comprimento de ligação C7-C8 superior ao de uma ligação aromática no benzeno.

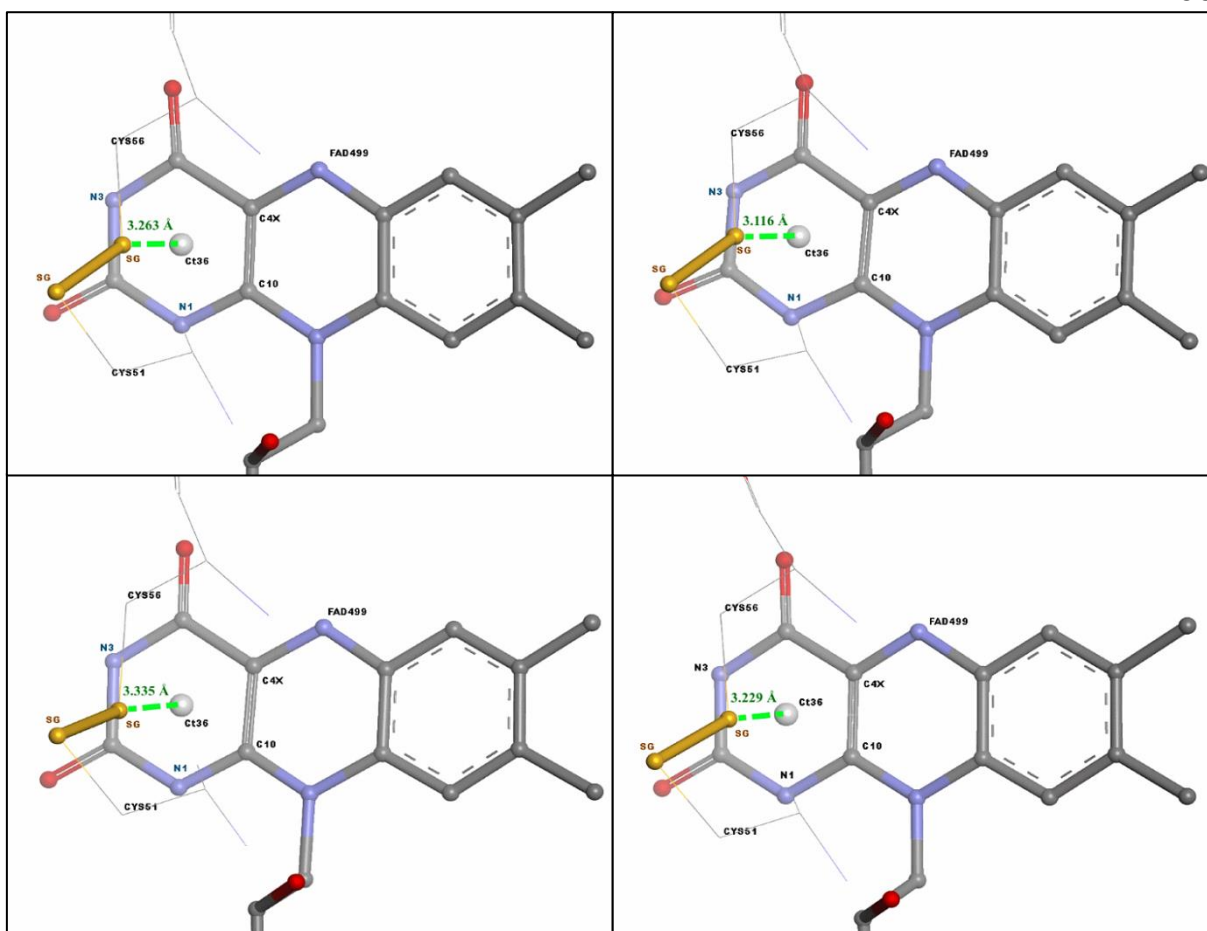


FIGURA 3.25. Detalhe da região isoaloxazina de quatro FAD da estrutura PDB-ID 1FEA. Superior esquerda: FAD da cadeia A. Superior direita: FAD da cadeia B. Inferior esquerda: FAD da cadeia C. Inferior direita: FAD da cadeia D. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Em relação à estrutura 1FEA, a observação dos detalhes mostrados na FIGURA 3.25 não sugeriu nenhuma informação que pudesse explicar todas as diferenças nos comprimentos de ligação observada na FIGURA 3.22. No entanto, a possível interação representada na FIGURA 3.25 pode estar relacionada com o maior comprimento da ligação C4X-C4.

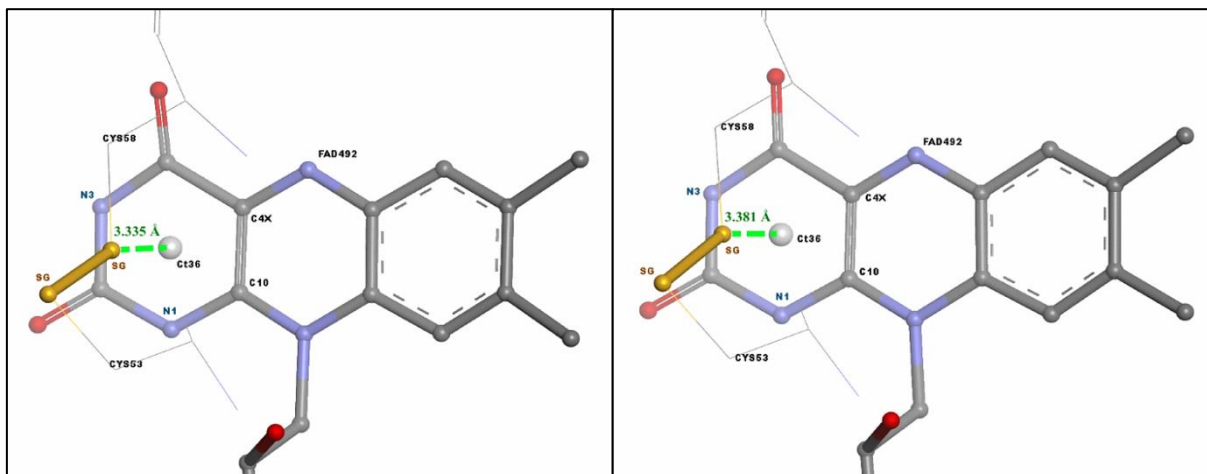


FIGURA 3.26. Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 1AOG. Esquerda: FAD da cadeia A. Direita: FAD da cadeia B. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Em relação às estruturas 1AOG, 1BZL e 2TRP, a observação dos detalhes mostrados na FIGURA 3.26 para a isoaloxazina do FAD de 1AOG foi semelhante para as estruturas 1BZL e 2TRP. A análise visual e vetorial não sugeriu nenhum fato que pudesse explicar todas as diferenças nos comprimentos de ligação observada na FIGURA 3.22. No entanto, como em 1FEA, a possível interação SG(LP)- π representada na FIGURA 3.26 pode estar relacionada com o maior comprimento da ligação C4X-C4.

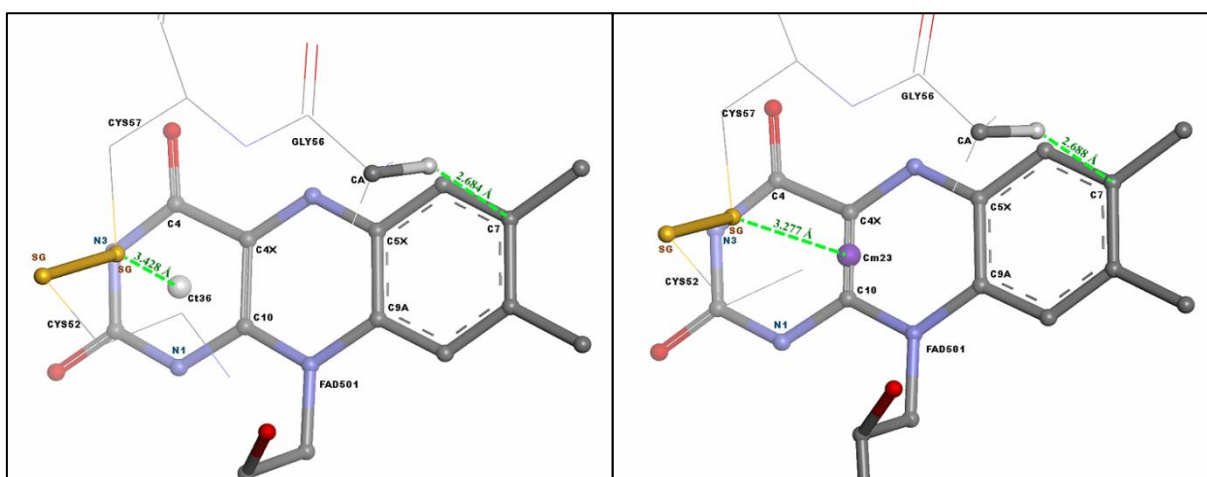


FIGURA 3.27. Detalhe da região isoaloxazina de dois FAD da estrutura PDB-ID 4NEV. Esquerda: FAD da cadeia A. Direita: FAD da cadeia B. Os átomos de hidrogênio não estão representados. As linhas tracejadas em verde representam possíveis interações da isoaloxazina com resíduos de aminoácidos próximos.

Em relação à estrutura 4NEV, a observação dos detalhes mostrados na FIGURA 3.27, em comparação com a FIGURA 3.22, sugeriu a existência

uma ligação de hidrogênio C-H \cdots π entre um átomo de hidrogênio do CA de GLY56 e o átomo C7 do anel B da isoaloxazina do FAD. Essa interação pode influenciar a distribuição eletrônica no anel B, aromático, o que pode provocar o aumento do comprimento da ligação C5X-C9A, no lado oposto do anel. Isso explicaria o anormalmente longo comprimento dessa ligação. Ainda, o fato de a possível interação SG(LP)- π poder ocorrer com o centroide Cm23, pode levar a uma menor concentração eletrônica na ligação dupla C4X=C10, o que pode estar relacionado com o seu comprimento ser anormalmente longo.

Foi calculada a correlação entre todos os comprimentos de ligação da isoaloxazina do FAD em TR, com o intuito de perceber se algumas distâncias variam no mesmo sentido, ou em sentidos opostos, nas estruturas analisadas. Foi considerada uma boa correlação sempre que o fator de correlação $|R|$ fosse maior do que 0,800. Nenhuma correlação foi encontrada com $|R| > 0,800$.

3.4.3. SULFIDRIL OXIDASES (SOX)

Foram analisadas as regiões isoaloxazina de 45 moléculas de FAD encontradas nas 22 estruturas cristalográficas de enzimas sulfidril oxidases (SOX) depositadas no PDB.

A comparação dos comprimentos de ligação entre os átomos ligados dos anéis da região isoaloxazina do FAD em SOX é apresentada na FIGURA 3.28.

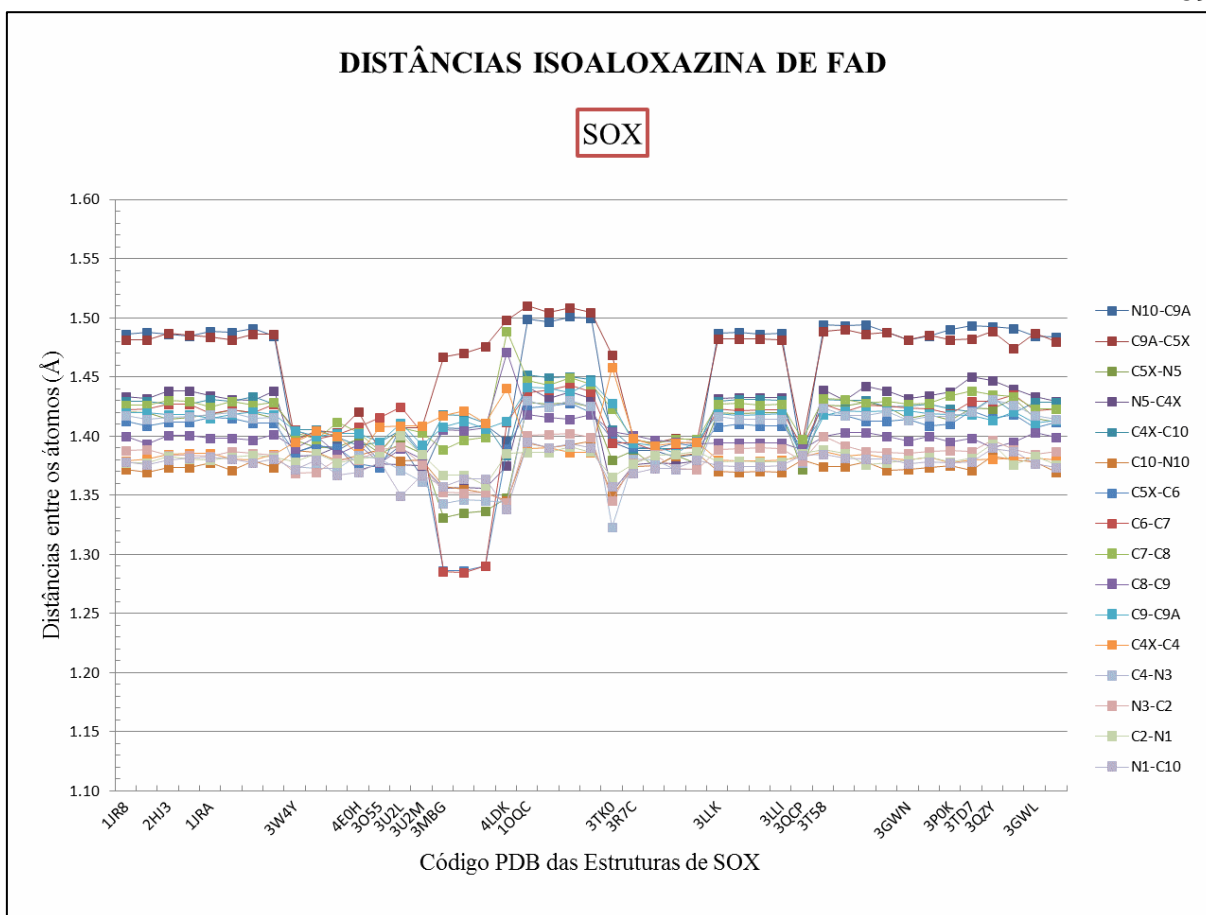


FIGURA 3.28. Comparação das distâncias entre os átomos em ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD em SOX. Os espaços em branco no eixo das abscissas, entre os códigos PDB, correspondem a várias moléculas de FAD na estrutura com código anterior no eixo.

A análise da FIGURA 3.28 mostra que os comprimentos de todas as ligações se encontram entre 1,27 Å e 1,52 Å, independentemente de se tratar de uma ligação C–C, C–N, C=C, C=N, ou C≡C. Em 7 das 22 estruturas de SOX analisadas, foi determinada uma grande proximidade dos comprimentos de todas as ligações covalentes da isoaloxazina do FAD: 3W4Y (3 FAD); 4E0H (1 FAD); 3U2L (1 FAD); 3U2M (1 FAD); 3R7C (4 FAD); e 3QCP (1 FAD). Nestes casos, a variação de comprimentos de ligação é próxima de 0,50 Å, o que suscitou o interesse de efetuar uma análise mais detalhada das regiões isoaloxazina do FAD nessas estruturas.

A observação da FIGURA 3.28 permitiu reparar que as estruturas de código PDB-ID 3MBG e 3TK0 são as que apresentam maior variação dos comprimentos das ligações, e a estrutura de código PDB-ID 3R7C é a que apresenta menor variação nos comprimentos das ligações. As ligações

covalentes em 3R7C apresentam comprimentos muito próximos, variando entre 1,37 Å e 1,40 Å, mesmo tratando-se de ligações de natureza e ordem diferentes.

A FIGURA 3.28 evidencia, ainda, uma variação dos comprimentos das ligações N10-C9A e C9A-5X, em 40 dos 45 FAD de SOX, muito semelhante e constante cerca de 0,50 Å mais longa do que as outras ligações da isoaloxazina. Também essa evidência careceu de posterior análise, levando ao estabelecimento de todas as correlações entre os comprimentos de ligação nas isoaloxazina do FAD em SOX.

Para uma análise mais clara dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em SOX, foi elaborada a FIGURA 3.29 com os valores máximos, mínimos e o valor médio de comprimento de cada ligação covalente, o que permitiu visualizar a amplitude da variação dos comprimentos de ligação e a sua relação com o valor médio.

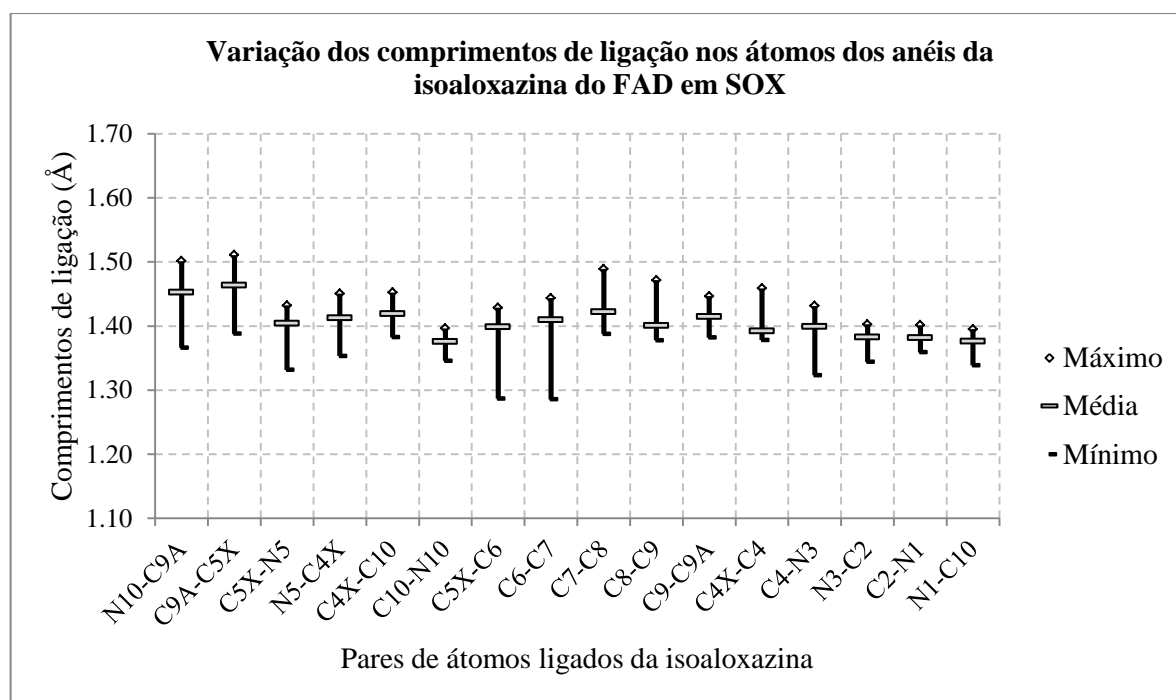


FIGURA 3.29. Comparação da variação dos comprimentos de ligação na isoaloxazina do FAD em SOX.

A análise da FIGURA 3.29 permite perceber, por um lado, que os valores médios dos comprimentos das ligações C7-C8, C8-C9 e C4X-C4 se situam deslocados para o valor mínimo de comprimento de cada ligação

covalente, em relação ao valor mediano. Por outro lado, os comprimentos das ligações C10-C9A, C9A-C5X, C5X-N5, N5-C4X, C5X-C6, C6-C7, C4-N3, N3-C2 e N1-C10 têm a média deslocada para o valor máximo de comprimento de cada ligação, em relação com a mediana. Todos os outros comprimentos de ligação estão próximos do valor mediano da distribuição da respectiva ligação.

Para uma análise complementar dos comprimentos das ligações, foram calculados os valores médio, máximo e mínimo dos comprimentos observados para cada ligação covalente e comparados com uma variação de $\pm 10\%$ do valor médio. Os resultados dessa comparação são apresentados na TABELA 3.8.

TABELA 3.8. Comparação dos comprimentos médio, máximo e mínimo, de cada ligação covalente na isoaloxazina do FAD, em SOX

| | Média(Å) | Média 10%(Å) | Máximo(Å) | Média -10%(Å) | Mínimo(Å) |
|----------------|----------|--------------|-----------|---------------|-----------|
| N10-C9A | 1,45 | 1,60 | 1,50 | 1,31 | 1,37 |
| C9A-C5X | 1,46 | 1,61 | 1,51 | 1,32 | 1,39 |
| C5X-N5 | 1,40 | 1,54 | 1,43 | 1,26 | 1,33 |
| N5-C4X | 1,41 | 1,55 | 1,45 | 1,27 | 1,35 |
| C4X-C10 | 1,42 | 1,56 | 1,45 | 1,28 | 1,38 |
| C10-N10 | 1,38 | 1,51 | 1,40 | 1,24 | 1,35 |
| C5X-C6 | 1,40 | 1,54 | 1,43 | 1,26 | 1,29 |
| C6-C7 | 1,41 | 1,55 | 1,44 | 1,27 | 1,29 |
| C7-C8 | 1,42 | 1,56 | 1,49 | 1,28 | 1,39 |
| C8-C9 | 1,40 | 1,54 | 1,47 | 1,26 | 1,38 |
| C9-C9A | 1,41 | 1,56 | 1,45 | 1,27 | 1,38 |
| C4X-C4 | 1,39 | 1,53 | 1,46 | 1,25 | 1,38 |
| C4-N3 | 1,40 | 1,54 | 1,43 | 1,26 | 1,32 |
| N3-C2 | 1,38 | 1,52 | 1,40 | 1,24 | 1,34 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,52 | 1,40 | 1,24 | 1,36 |
| N1-C10 | 1,38 | 1,51 | 1,40 | 1,24 | 1,34 |

Todos os valores se encontram dentro do intervalo de $\pm 10\%$ do valor médio do comprimento de cada ligação.

Considerando essas observações, foram exploradas, em detalhe, as estruturas da isoaloxazina do FAD em 3W4Y, 4E0H, 3U2L, 3U2M, 3R7C e

3QCP, 3MBG e 3TK0. Todas estas estruturas apresentam os comprimentos de ligação pouco variantes (FIGURA 3.29).

A FIGURA 3.30 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3W4Y.

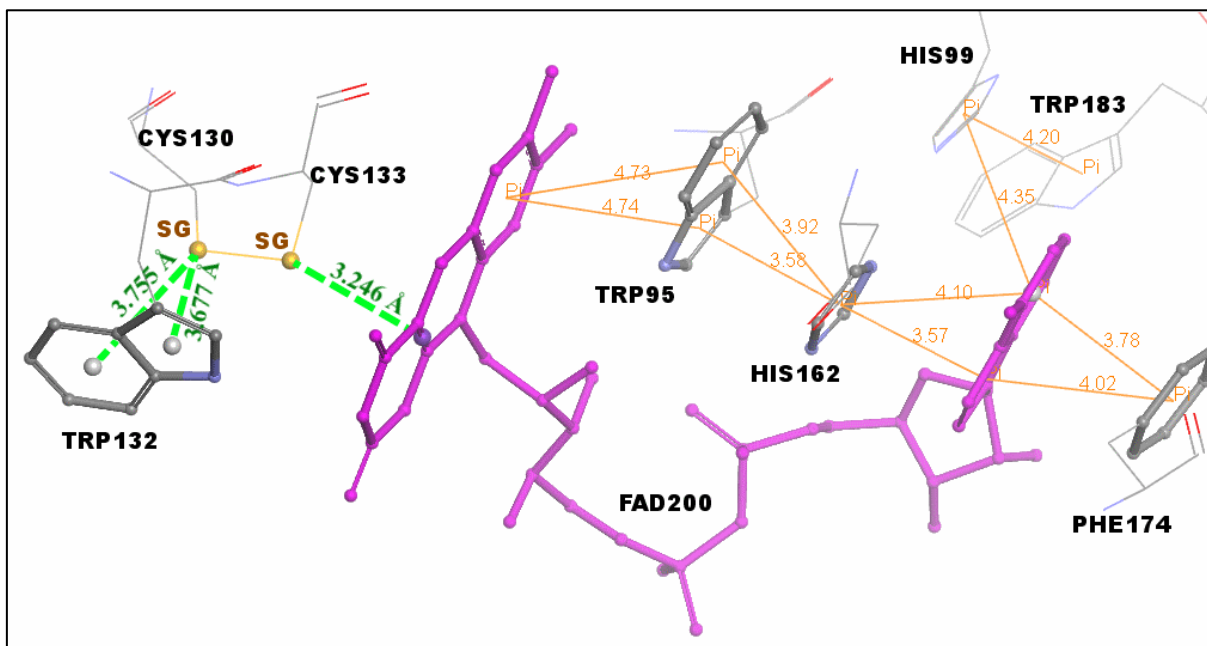


FIGURA 3.30. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3W4Y. Os dois átomos SG, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo) e a cadeia lateral do resíduo de triptofano TRP132. O “caminho π ” entre as regiões flavina adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.30 podemos reparar num conjunto de interações π - π em série, que designamos “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP95, o anel imidazol de HIS162, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE174. A proximidade de HIS99 e TRP183 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 3W4Y.

A FIGURA 3.31 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 4E0H.

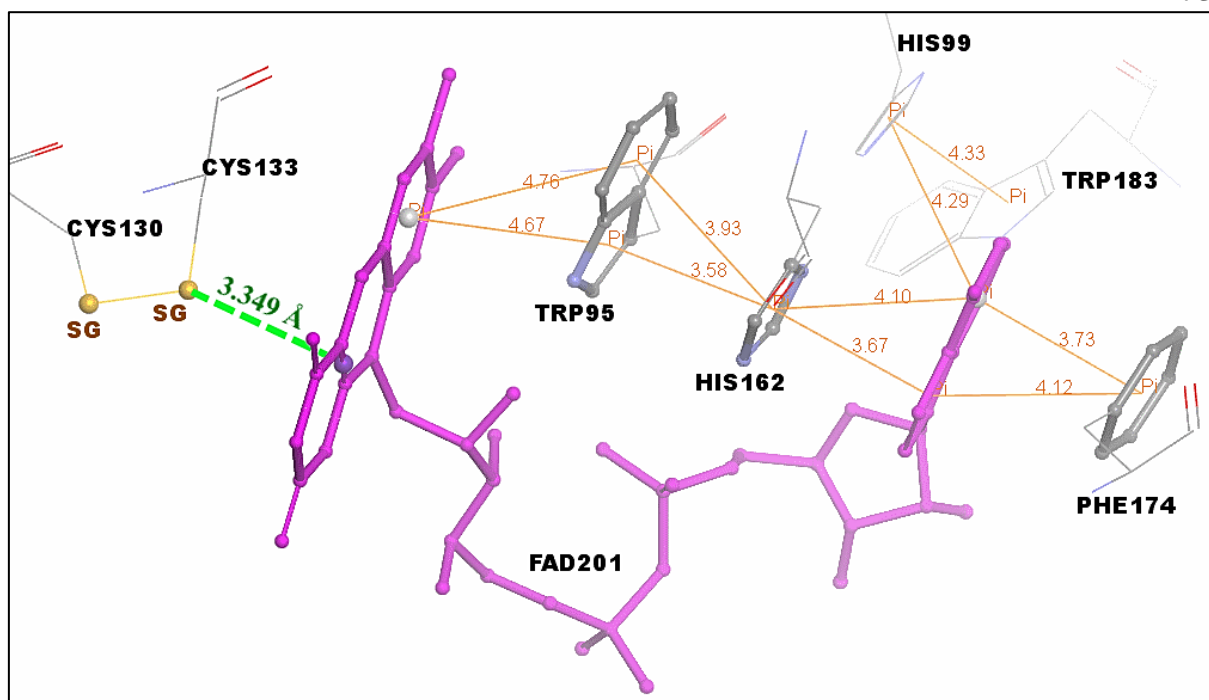


FIGURA 3.31. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 4E0H. Os dois átomos SG, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.31, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP95, o anel imidazol de HIS162, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE174. A proximidade de HIS99 e TRP183 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 4E0H.

A FIGURA 3.32 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3U2L.

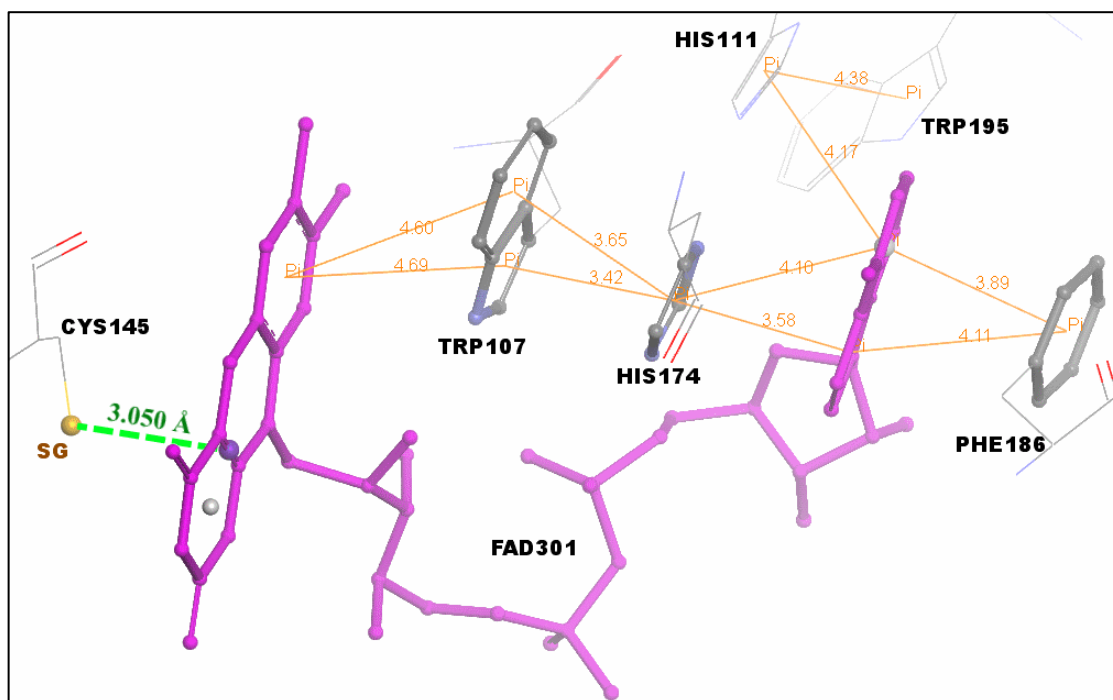


FIGURA 3.32. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3U2L. O átomo SG encontra-se a efetuar ligação de hidrogênio SH- π com o centroide Cm23 (roxo), ou com Ct36 (centroide do anel U) do FAD (branco). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.32, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP107, o anel imidazol de HIS174, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE186. A proximidade de HIS11 e TRP195 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 3U3L.

Diferente das estruturas 3W4Y e 4E0H, o átomo SG que efetua a interação com a isoaloxazina não está ligado a outro SG numa ponte dissulfeto. A interação é, neste caso, do tipo ligação de hidrogênio SH- π (FIGURA 3.33).

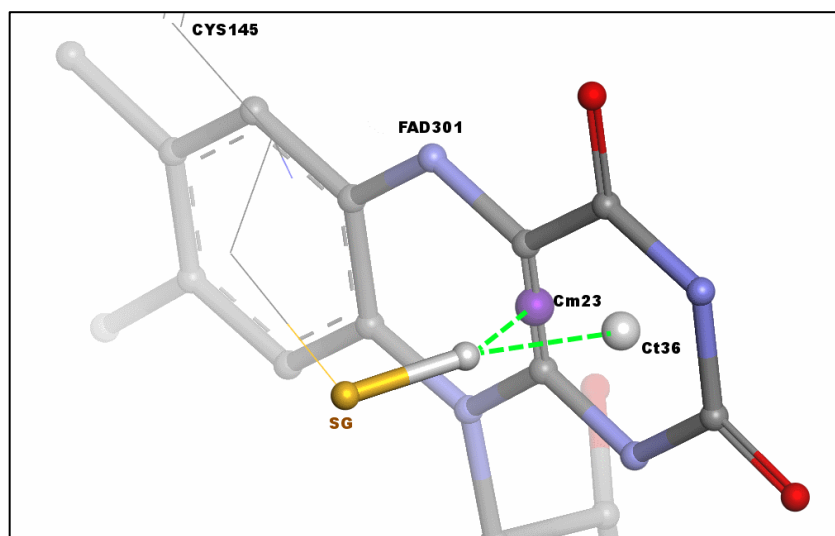


FIGURA 3.33. A ligação de hidrogênio entre SG de CYS145 e Cm23 ou Ct36, da isoaloxazina do FAD em na estrutura PDB-ID 3U2L. A distância de H para Cm23 (roxo) é 1,99 Å, enquanto a distância de H para Ct36 (anel U, branco) é 1,88 Å. Apenas o hidrogênio envolvido na interação está representado.

A FIGURA 3.34 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3U2M.

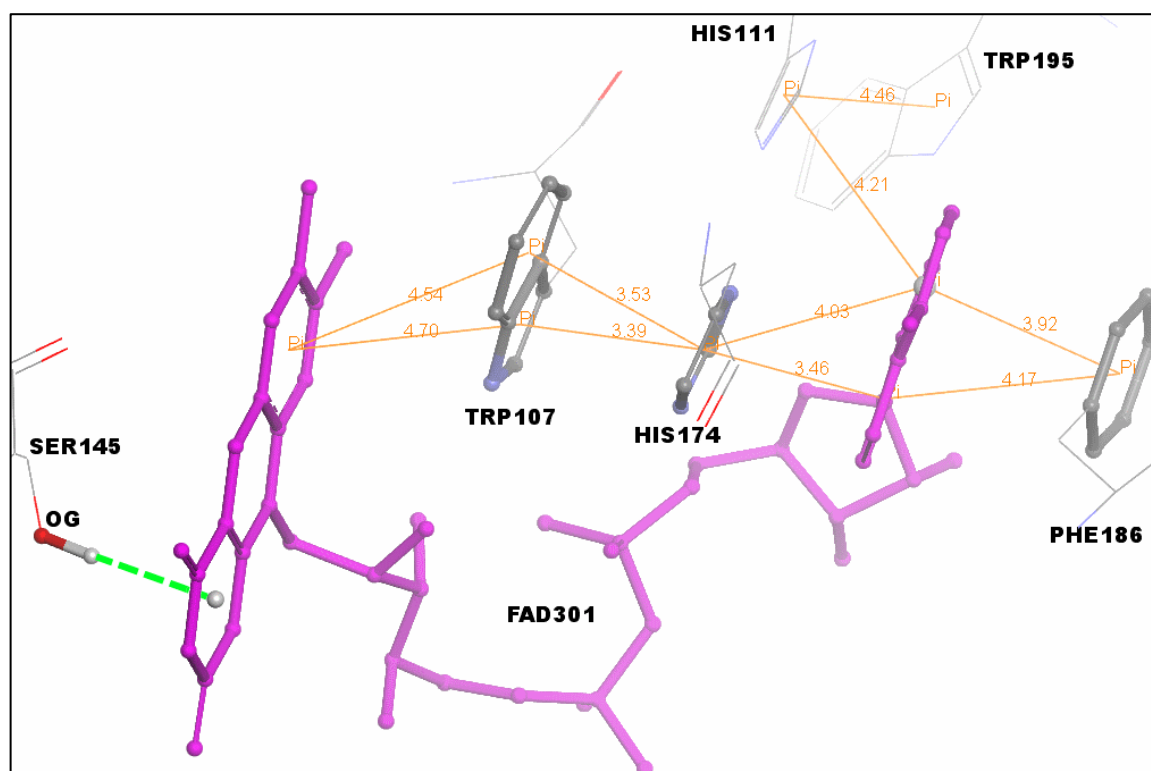


FIGURA 3.34. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3U2M. Não existe qualquer interação SG- π próxima da região isoaloxazina do FAD. O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.34, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP107, o anel imidazol de HIS174, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE186. A proximidade de HIS111 e TRP195 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 3U2M. Deve-se salientar que um resíduo de serina, nesta estrutura, está no lugar da cisteína nas SOX anteriores, podendo efetuar uma ligação de hidrogênio do tipo OH- π com o anel U (Ct36 em branco na FIGURA 3.34).

A FIGURA 3.35 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3R7C.

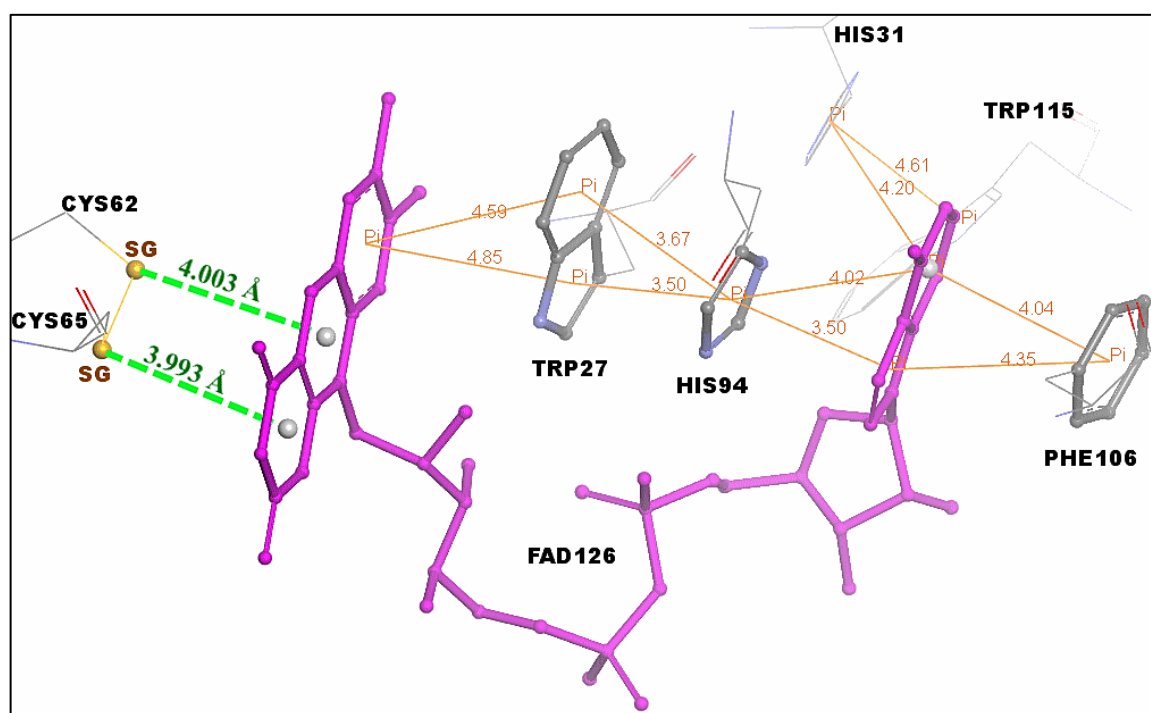


FIGURA 3.35. Detalhe de um FAD da estrutura PDB-ID 3R7C. Os átomos SG de CYS62 e CYS65, em dissulfeto, encontram-se a efetuar interações do tipo S(LP)- π com os centroides Ct26 e Ct36 do FAD, respectivamente. O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.35, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP27, o anel imidazol de HIS94, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE106. A proximidade de HIS31 e TRP115 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na

se encontra presente um resíduo de triptofano próximo de HIS324, o que pode significar que há menos interações π envolvidas no “caminho π ”.

A FIGURA 3.37 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3MBG.

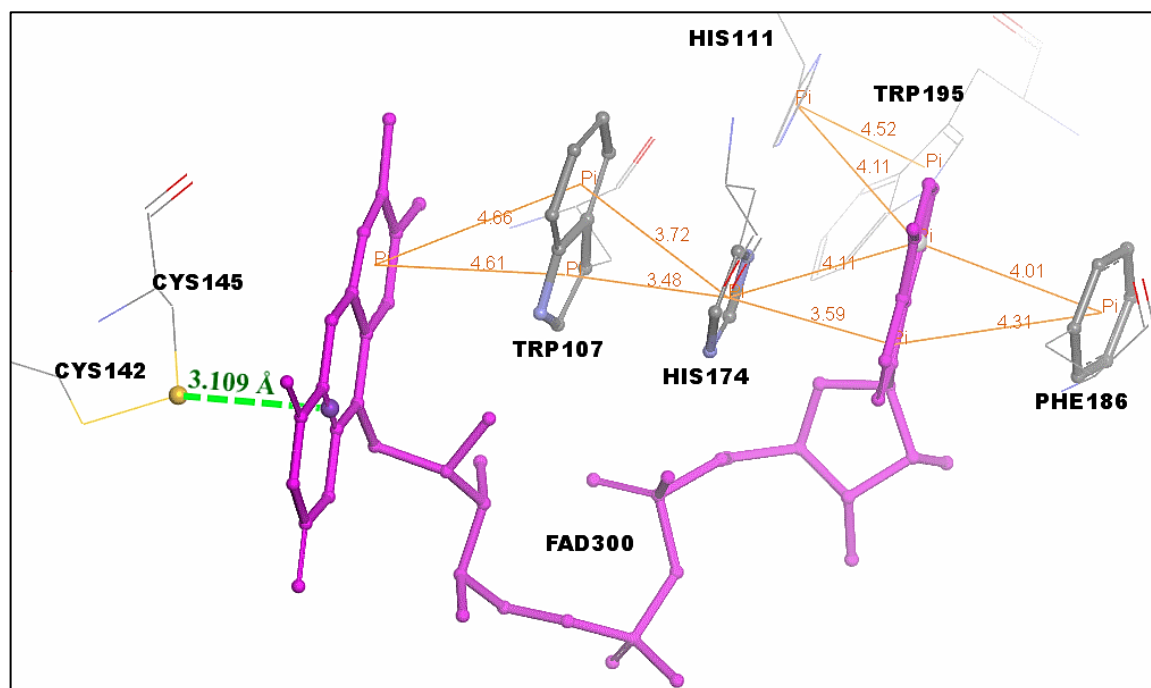


FIGURA 3.37. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3MBG. O átomo SG de CYS142 encontra-se a efetuar interação S(LP)- π com o centroide C16 (anel P) do FAD (branco). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.37, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP107, o anel imidazol de HIS174, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE186. A proximidade de HIS111 e TRP195 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 3MBG. De salientar que a molécula do FAD de 3MBG apresenta uma deformação muito grande das ligações C5X-C6 e C6-C7, no anel B (FIGURA 3.38). Essa deformação pode estar relacionada com erros experimentais na obtenção dos dados cristalográficos da estrutura decorrentes muitas vezes da qualidade do cristal, e conseqüentemente no processo de refinamento dos dados.

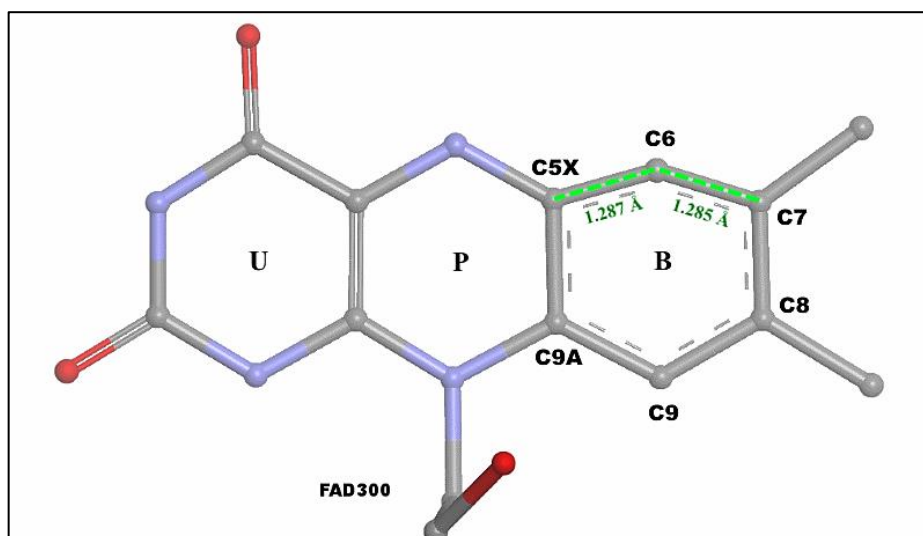


FIGURA 3.38. Ilustração da grande deformação do anel B do FAD em 3MBG. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

A FIGURA 3.39 apresenta o detalhe de uma das moléculas de FAD em 3TK0.

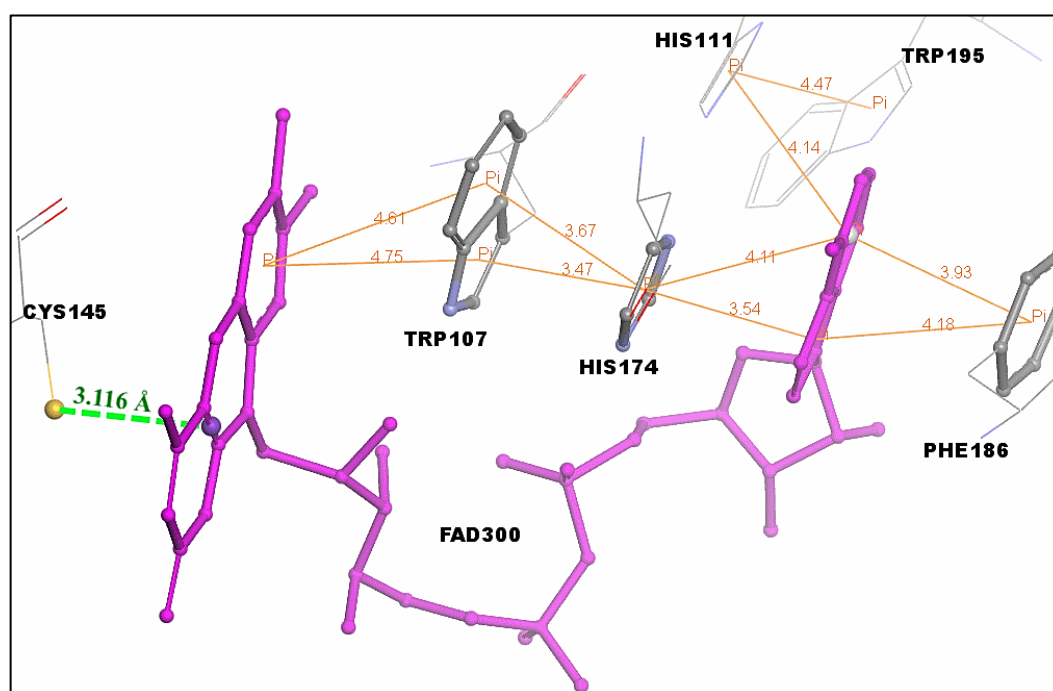


FIGURA 3.39. Detalhe do FAD da estrutura PDB-ID 3TK0. O átomo SG de CYS145 encontra-se a efetuar ligação de hidrogênio SH- π com o centroide Cm23 do FAD (roxo). O “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina está salientado em cor-de-laranja, bem como as distâncias entre os sistemas π em interação, em Å. Os átomos de hidrogênio não estão representados.

Observando a FIGURA 3.39, podemos reparar no “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina, o sistema indólico de TRP107, o anel imidazol de HIS174, o sistema adenina do FAD e o anel benzênico de PHE186. A

proximidade de HIS111 e TRP195 deste “caminho π ”, na região da adenina do FAD, pode estar relacionada com a estabilização da posição do FAD na estrutura 3TK0. Pode-se observar que o átomo SG de CYS145 não está envolvido numa ponte dissulfeto com outro SG, encontrando-se na forma de tiol. Isso é o que permite a interação do tipo ligação de hidrogênio SH- π com a isoaloxazina do FAD. A região isoaloxazina do FAD representado na FIGURA 3.39 tem os comprimentos de ligação diferentes do resto das estruturas similares de SOX analisadas. A FIGURA 3.40 mostra o pormenor da isoaloxazina do FAD em 3TK0.

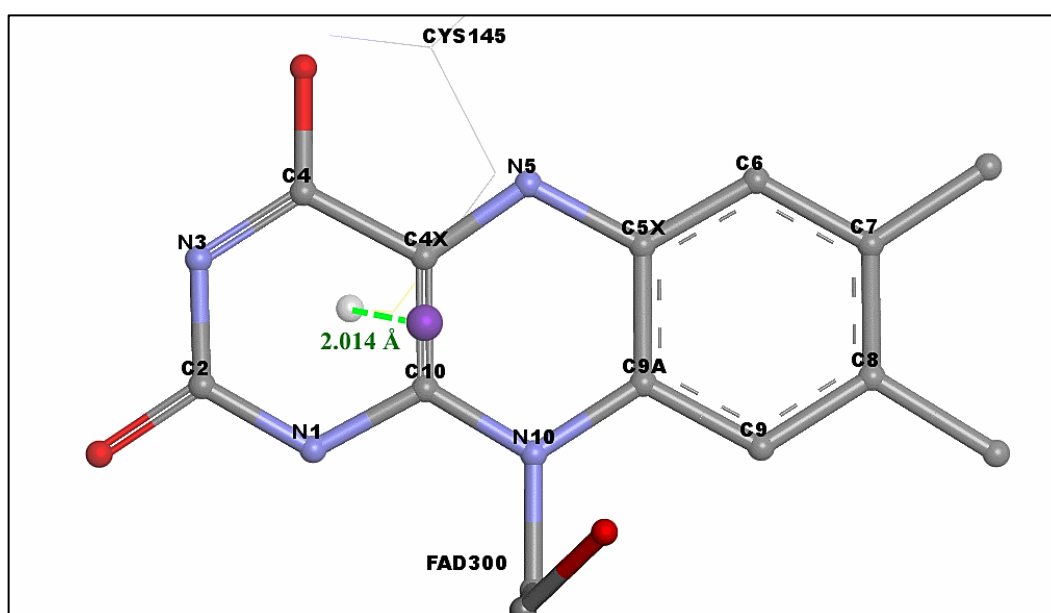


FIGURA 3.40. O átomo N3 do FAD em 3TK0 encontra-se desprotonado, resultando na ligação dupla N3=C4. Apenas se apresenta o átomo de hidrogênio de SG (CYS145).

A confirmação da existência de interações SG- π na “frente” da isoaloxazina do FAD e a possibilidade de um conjunto de interações π - π em série, designado por “caminho π ”, entre o anel B da isoaloxazina e o sistema adenina do FAD, podendo expandir-se, podem ser um motivo que ajude a explicar os comprimentos das ligações covalentes nos anéis da isoaloxazina do FAD nas estruturas salientadas.

Foi calculada a correlação entre todos os comprimentos de ligação da isoaloxazina do FAD em SOX, à semelhança do que foi realizado, também,

para GR e TR, com o intuito de perceber se algumas distâncias variam no mesmo sentido, ou em sentidos opostos, nas estruturas analisadas. Foi considerada uma boa correlação sempre que o fator de correlação $|R|$ fosse maior do que 0,800. Foram encontradas 17 correlações elevadas ($|R| > 0,800$) entre as ligações covalentes da isoaloxazina do FAD em SOX. A FIGURA 3.41 e a FIGURA 3.42 apresentam as duas maiores correlações positivas encontradas. A FIGURA 3.43 apresenta a maior correlação negativa encontrada.

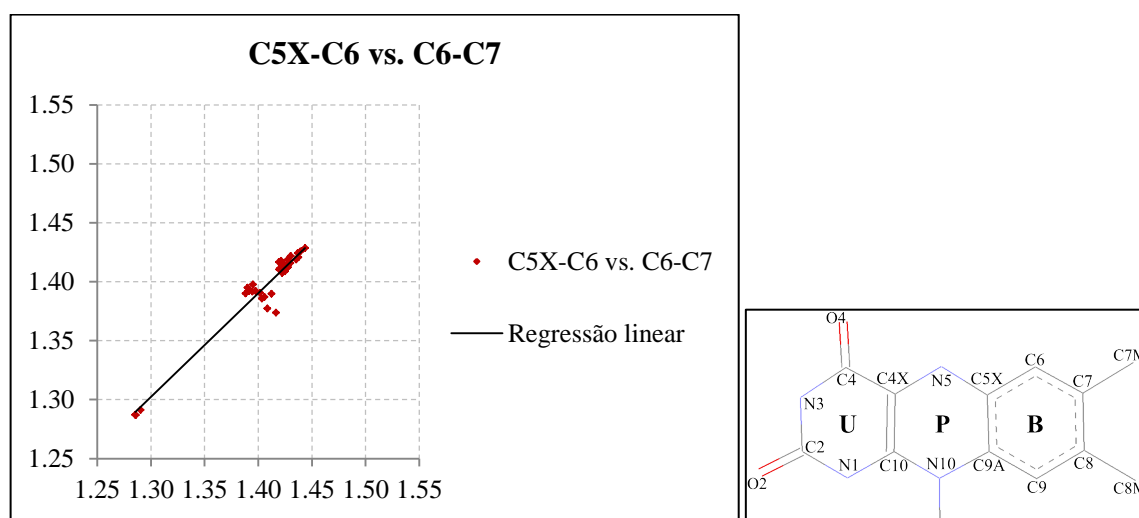


FIGURA 3.41. Correlação entre as distâncias C5X-C6 e C6-C7 em 22 FAD de SOX. $R = 0,971$.

Pode-se, assim, concluir que, em moléculas FAD de GR, o comprimento da ligação C5X-C6 varia de forma diretamente proporcional ao comprimento da ligação C6-C7.

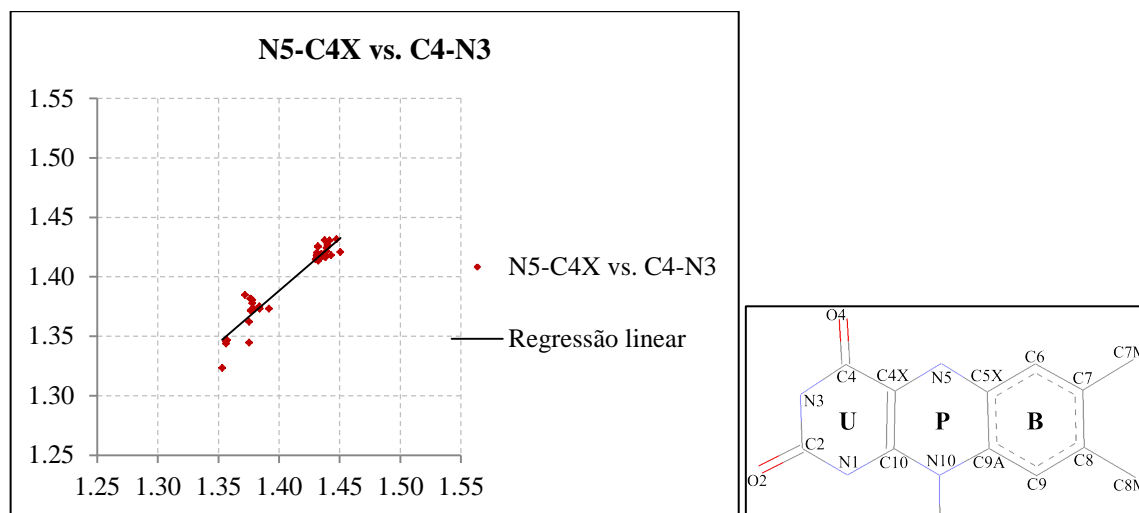


FIGURA 3.42. Correlação entre as distâncias N5-C4X e C4-N3 em 22 FAD de SOX. $R = 0,960$.

Pode-se, assim, concluir que, em moléculas FAD de SOX, o comprimento da ligação N5-C4X varia de forma diretamente proporcional ao comprimento da ligação C4-N3.

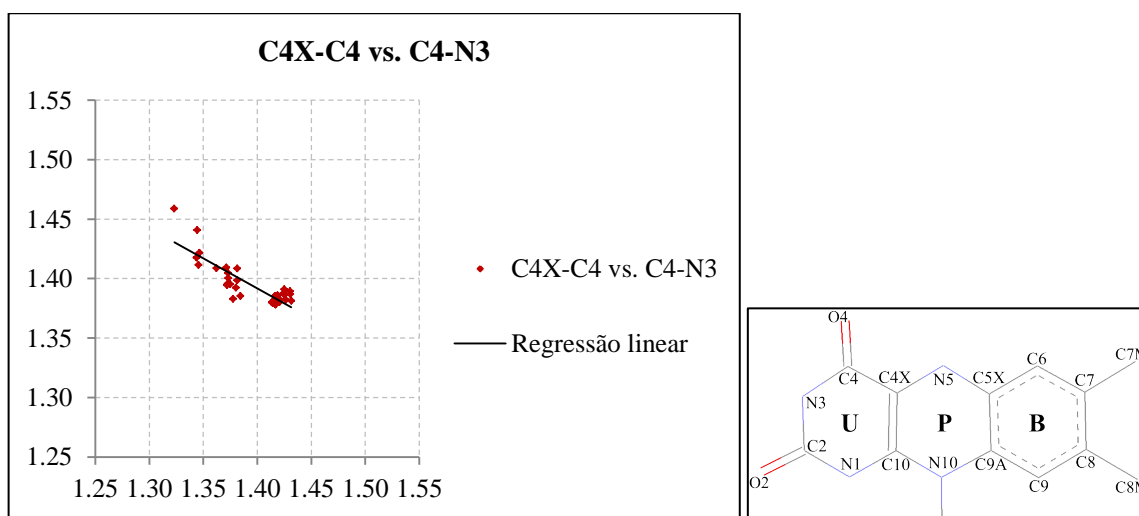


FIGURA 3.43. Correlação entre as distâncias C4X-C4 e C4-N3 em 22 FAD de SOX. $R = -0,860$.

Pode-se, assim, concluir que, em moléculas FAD de SOX, o comprimento da ligação C4X-C4 varia de forma inversamente proporcional ao comprimento da ligação C4-N3.

3.5. COMPRIMENTOS DAS LIGAÇÕES DISSULFETO

A busca no PDB e posterior análise resultou em 475 ligações dissulfeto nas estruturas das proteínas analisadas, enquanto que uma busca similar no CSD resultou 1633 ligações dissulfeto. O número de ligações dissulfeto, analisadas neste trabalho, corresponde a cerca de 30% do número de ligações dissulfeto descritas no CSD, pelo que os resultados obtidos foram considerados significativos para efetuar a análise comparativa. Essa comparação entre os dois conjuntos de dados é apresentada na FIGURA 3.44 e na FIGURA 3.45.

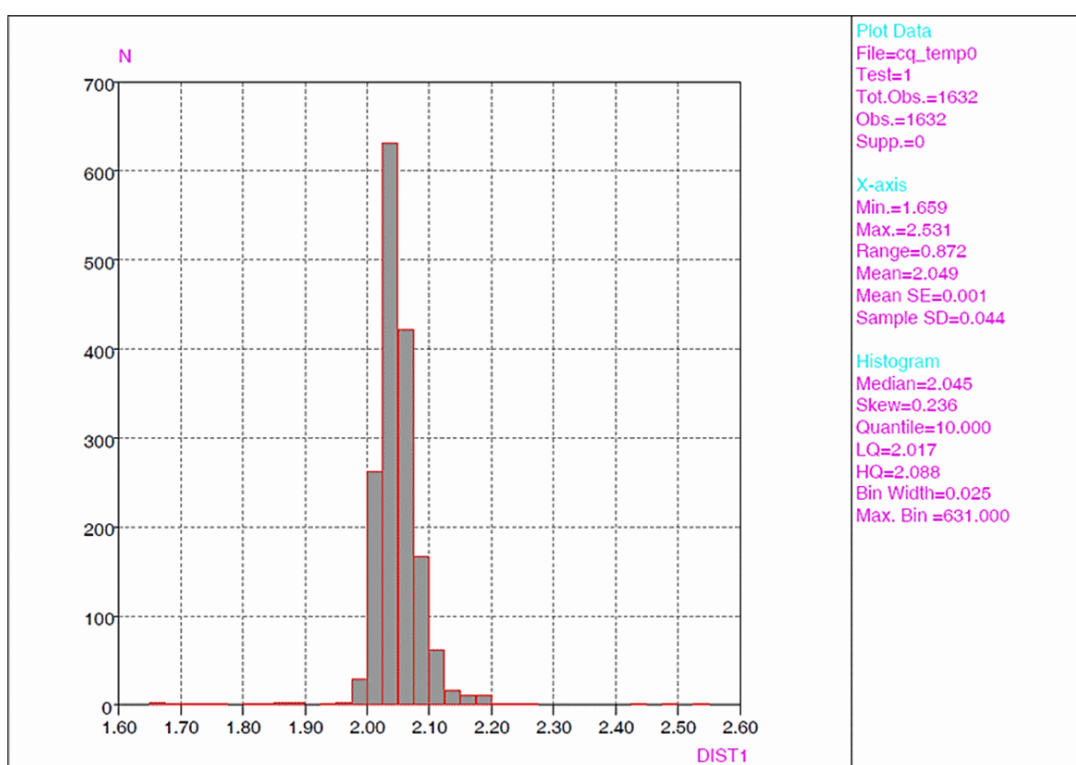


FIGURA 3.44. Distribuição dos 1632 comprimentos de ligação (Å) S-S em estruturas cristalográficas de pequenas moléculas depositadas no CSD.

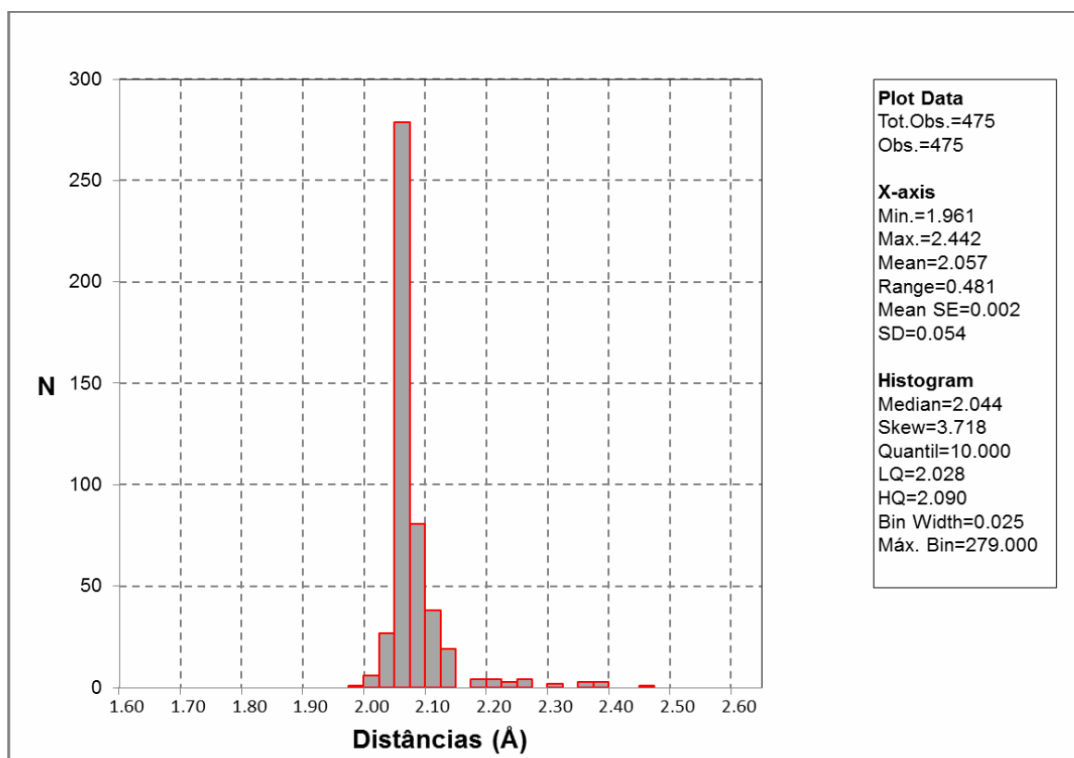


FIGURA 3.45. Distribuição dos 475 comprimentos de ligação (Å) S-S em 168 estruturas cristalográficas de proteínas oxidoredutases depositadas no PDB.

A análise comparativa entre os dados referentes ao comprimento da ligação dissulfeto no CSD e no PDB mostra uma distribuição relativamente semelhante. A média dos comprimentos de ligação é similar nos dois casos: 2,049 Å (CSD) vs. 2,057 Å (PDB). Somando os raios covalentes de dois átomos de enxofre ($r = 1,040$ Å), obtemos um valor de comprimento de ligação $d = 2,080$ Å. Este valor teórico é ligeiramente superior aos valores encontrados nos dados do CSD e no PDB. Embora a mediana da distribuição seja idêntica (2,045 Å vs. 2,044 Å), a distribuição dos comprimentos das ligações dissulfeto descritas nas estruturas do PDB apresenta um comprimento de ligação mínimo cerca de 15% mais elevado (1,961 Å vs. 1,659 Å no CSD). Além dessa diferença, a distribuição das ligações dissulfeto descritas nas estruturas do PDB é ligeiramente assimétrica para a direita, o que significa que há mais valores maiores do que a média, em comparação com os valores menores do que a média. A distribuição dos comprimentos das ligações do CSD é simétrica.

3.6. POSIÇÃO RELATIVA DA LIGAÇÃO DISSULFETO EM RELAÇÃO À ISOALOXAZINA

Para facilitar a descrição dos resultados, no que respeita às referências à posição de átomos, isolados ou como parte de moléculas, em relação à isoaloxazina do FAD, considera-se, neste trabalho a designação “atrás da isoaloxazina” a região do espaço onde se posiciona o observador, quando visualizando a estrutura com o anel U no seu lado direito, o anel B no seu lado esquerdo e o átomo N5 num quadrante superior ao do átomo N10 (tal como o resto da molécula). Esta região do espaço pode ser classificada como a região *si*, quando consideramos o átomo C4X, hibridizado sp^2 . Complementarmente, a região *re*, na perspectiva descrita, será designada, neste trabalho de região “frente da isoaloxazina”.

Das 102 estruturas analisadas com interações entre o átomo S e a região isoaloxazina do FAD, 68 possuíam a interação S(LP)- π ou SH- π na região “atrás” da isoaloxazina do FAD (FIGURA 3.46). Essa quantidade corresponde a cerca de 67% das estruturas com interações S- π confirmadas.

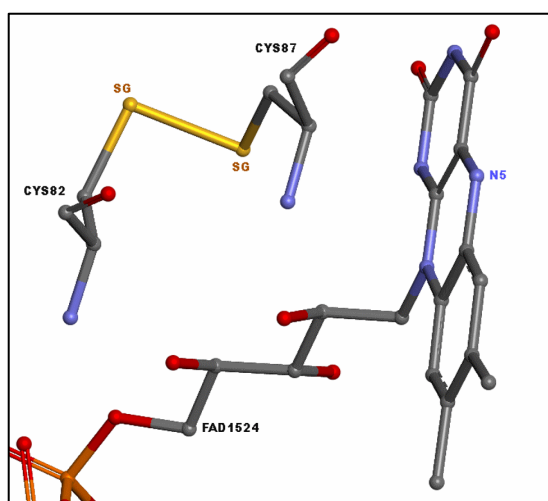


FIGURA 3.46. Representação da ligação dissulfeto “atrás da isoaloxazina” do FAD (PDB-ID: 2C3D).

Em alguns casos, quando um dos átomos de enxofre da ligação dissulfeto faz uma interação do tipo LP- π com a isoaloxazina do FAD, o outro átomo da ligação dissulfeto efetua uma interação LP-LP com o átomo de

nitrogênio de um resíduo de histidina próximo (FIGURA 3.47). As distâncias medidas variam entre 3,30 Å e 4,00 Å. Como a soma dos raios de van der Waals do nitrogênio ($r = 1,55$ Å) e do enxofre ($r = 1,80$ Å) é $d = 3,35$ Å, muitos valores medidos se enquadram no intervalo $3,35 \pm 10\%$ (3,69 Å). A análise dessa interação direcional entre *lone pairs* de átomos eletronegativos, poderá ser realizada, em um momento posterior, com uma amostra maior de estruturas do PDB e cálculos das energias envolvidas nesses sistemas.

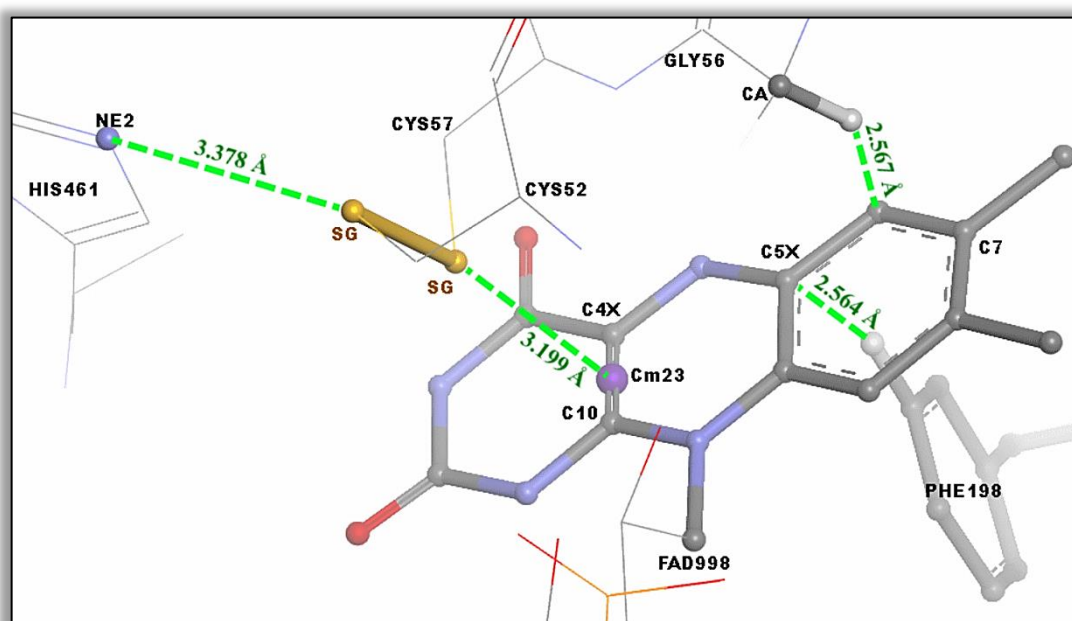


FIGURA 3.47. Possível interação S(LP)-N(LP) com uma histidina (PDB-ID: 2WPF). A imagem também mostra duas potenciais ligações de hidrogênio com átomos de carbono do anel B da isoaloxazina. Apenas os hidrogênios envolvidos nas interações estão representados.

Das 102 estruturas analisadas com interações entre o átomo S e a região isoaloxazina do FAD, 34 possuíam a interação S(LP)- π ou SH- π na região “frente” da isoaloxazina do FAD (FIGURA 3.48). Essa quantidade corresponde a cerca de 33% das estruturas com interações SG- π confirmadas. Todas as estruturas de SOX, como apresentam o FAD deformado em “U” e com “caminho π ” entre as regiões flavina e adenina, também apresentam a ligação dissulfeto na região da “frente” da isoaloxazina.

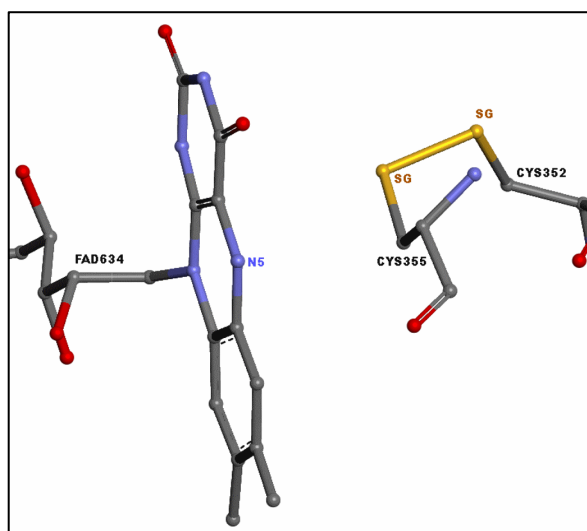


FIGURA 3.48. Ligação dissulfeto na “frente” da isoaloxazina do FAD (PDB-ID: 1RP4).

3.7. INTERAÇÕES SG- π (NAD)

Não foram encontradas interações SG- π com o NAD entre átomos SG próximos do NAD e do FAD. As interações π - π entre a região nicotinamida do NAD e a região isoaloxazina do FAD ocorrem, sempre que presentes, na região da frente da isoaloxazina, existindo, quando presente, um átomo SG, em ligação dissulfeto, a efetuar potencial interação SG- π com a isoaloxazina na região “atrás” desta (FIGURA 3.49).

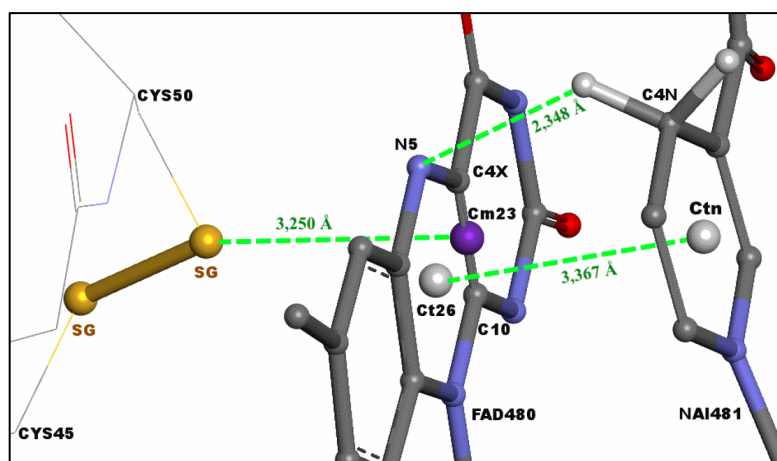


FIGURA 3.49. Representação da interação SG(LP)- π (FAD)- π (NAI). PDB-ID: 1ZMD.

Os dados coletados e produzidos no decurso deste trabalho e utilizados na análise deste Capítulo 3 são apresentados nos Apêndices.

4. CONCLUSÕES

A molécula de FAD está presente em várias enzimas, onde desempenha o papel de cofator. Foram selecionadas para o presente estudo as enzimas classificadas como oxidorreduções e entre elas a glutathione redutase (GR), tripanotiona redutase (TR) e a sulfidril oxidase (SOX). Todas estas enzimas possuem, em geral, uma ligação dissulfeto próxima à região isoaloxazina do FAD. A análise das interações entre o átomo de enxofre e o sistema tricíclico da isoaloxazina do FAD, mostra que mais de metade das estruturas analisadas apresentam uma interação SG- π (56,7% – 102 estruturas). Nessas 102 estruturas, 235 moléculas de FAD foram analisadas, das quais 9 estão envolvidas em interações SH... π . Nos casos das restantes 226 moléculas de FAD, há evidências que apontam para interações do tipo S(LP)... π . Para facilitar a descrição das interações, a isoaloxazina foi descrita como composta de 3 anéis U, P e B correspondentes aos anéis uracílico, pirazínico e dimetilbenzênico, respetivamente. As interações S- π observadas foram preferencialmente do tipo semi-localizadas entre o átomo C4X e C10 (Cm23 – 61,2% dos casos), e delocalizadas para o centroide Ct36, do anel U (35,3% dos casos). Em cerca de 2% das interações S- π , os átomos SG estavam afastados do anel U. Estes dados permitem concluir que o átomo SG que efetua interação π com a isoaloxazina, está quase sempre posicionado na região onde se encontra o anel U.

Tratando da posição relativa da interação S- π com a isoaloxazina do FAD, em 67% das 102 estruturas de oxidorreduções estudadas, o átomo de enxofre apresentou interação π na região “atrás” da isoaloxazina. 33% das interações S- π foram encontradas na região “frente” da isoaloxazina. Em alguns casos foi observado que o átomo SG distal da ligação dissulfeto próxima da isoaloxazina efetua interações do tipo S(LP)- π com cadeias laterais aromáticas de resíduos de aminoácidos (fenilalanina, histidina e triptofano).

Ainda, algumas distâncias do átomo SG, da dissulfeto, com resíduos de aminoácidos aromáticos sugeriram a existência de uma interação

entre os pares isolados de elétrons do enxofre e o par isolado de elétrons de um nitrogênio de uma histidina. A verificação destas interações está fora do âmbito do presente trabalho, mas é merecedora de atenção em uma futura análise.

As conformações mais extremas do FAD foram classificadas de “FAD distendido” e “FAD em U”. Nas moléculas de FAD “distendido”, a distância entre as regiões isoaloxazina e adenina são da ordem de 18 Å, enquanto nas moléculas de FAD “em U”, a mesma distância é de c.a. 11 Å. Entre estas duas conformações extremas existem um número elevado de conformações intermédias.

Todas as estruturas de FAD “em U” apresentaram a interação SG- π , quando presente, na região “frente” da isoaloxazina. Como todas as estruturas de SOX apresentaram a molécula de FAD com conformação “em U”, pode afirmar-se que, nas enzimas sulfidril oxidases, a interação SG- π (quando presente) ocorre na região da “frente” da isoaloxazina.

Em relação à deformação da região isoaloxazina do FAD nas estruturas de GR, TR e SOX, a análise visual dessa região da molécula permitiu algumas observações interessantes. A deformação chamada de “torção” é a preferencial da isoaloxazina do FAD nas estruturas de GR, com mais de 54% das estruturas a apresentar essa deformação. A deformação chamada de “planar” é a mais significativa da isoaloxazina do FAD nas estruturas de TR e SOX, com 63% e mais de 46% das estruturas, respetivamente, a apresentarem esta deformação. A deformação chamada de “curva” é mais característica da isoaloxazina do FAD das estruturas de SOX. A deformação chamada de “dobra” é mais característica da isoaloxazina do FAD das estruturas de GR.

A classificação “outras”, correspondendo a várias deformações simultâneas na mesma estrutura de isoaloxazina do FAD, é de semelhante importância em TR e SOX, sendo que em todas as estruturas analisadas de TR, as isoaloxazinas do FAD puderam ser classificadas como pertencentes a apenas um tipo de deformação.

Ao ser efetuada a correlação entre os comprimentos de todas as ligações covalentes internas dos anéis U, P e B, os seguintes resultados foram encontrados. Enquanto apenas dois comprimentos de ligação na isoaloxazina de GR estão altamente correlacionados ($R > 0,80$), na isoaloxazina das estruturas de TR, não se encontraram comprimentos de ligação com elevada correlação. Por seu lado, as isoaloxazina das estruturas de FAD em SOX apresentaram 17 pares de comprimentos de ligação altamente correlacionados. No caso de SOX, pode afirmar-se que a estrutura da isoaloxazina funciona como um todo e que, quando uma distância varia num sentido, por exemplo, devido a uma interação localizada, ou ao mecanismo de ação catalítico da enzima, há uma resposta molecular, em que as ligações interatômicas se comportam de forma razoavelmente previsível. Salienta-se, sobretudo, o caso da correlação entre as ligações C5X-C6 e C6-C7, no anel B ($R = 0,97$) e o caso da correlação entre os comprimentos de ligação N5-C4X e C4-N3, no anel P e no anel U, respetivamente ($R = 0,96$).

Ainda é possível concluir que as regiões isoaloxazina do FAD em GR são as que apresentam maiores variações dos comprimentos de ligação. As regiões isoaloxazina de SOX são as que menos apresentam variações nos comprimentos de ligação, o que significa que a molécula de FAD, na região isoaloxazina, apresenta um comportamento mais concertado em SOX, do que em TR e em GR.

Em relação à clássica deformação do FAD como “butterfly”, podemos concluir que isso foi razoavelmente comprovado na análise visual de 180 moléculas de FAD em oxidorreductases, no entanto, com algumas reservas. Para a observação da deformação do FAD “em butterfly”, seria necessário o estudo do movimento do FAD dentro da proteína. Na análise realizada neste trabalho, foram observadas todas as estruturas de 180 oxidorreductases e foi preciso fazer algum esforço para encontrar duas que apresentassem características da deformação “butterfly”: a isoaloxazina do FAD com a

deformação em curva ou em dobra (preferível, por ser uma deformação mais angulosa) e com a concavidade invertida (uma para a “frente” da isoaloxazina e a outra para “trás” da isoaloxazina). Ainda assim, as estruturas desses FAD em proteínas diferentes foram sobrepostas, permitindo observar a deformação “butterfly”.

Em relação às distâncias interatômicas medidas e apresentadas no programa de visualização gráfica, estas são perfeitamente compatíveis com ligação dissulfeto entre SG próximos (c.a. 2,00 Å), mas que não eram desenhadas quando da observação gráfica das estruturas. De modo análogo, em alguns outros casos, a ligação covalente estava desenhada para átomos SG distantes de mais de 2,90 Å.

A análise dos comprimentos das 475 ligações dissulfeto em todas as 168 estruturas analisadas (12 estruturas não possuíam ligações dissulfeto), e a comparação dos dados com os dados do banco de dados cristalográfico de referência (CSD – 1632 ligações dissulfeto) para pequenas moléculas, permitiu concluir que o comprimento da ligação S-S apresenta uma distribuição normal, semelhante em pequenas moléculas e em macromoléculas. A distribuição é bem próxima à obtida no CSD, pelo que podemos afirmar que o comprimento da ligação S-S, em proteínas e em pequenas moléculas, é muito semelhante e próximo de 2,05 Å.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALON, A.; HECKLER, E. J.; THORPE, C.; & FASS, D. "QSOX Contains A Pseudo-Dimer Of Functional And Degenerate Sulphydryl Oxidase Domains." FEBS Letters, 584(8), 1521, 2010.

ALLEN, F. H.; KENNARD, O.; WATSON, D. G.; BRAMMER, L.; ORPEN, A. G. & TAYLOR, R. "Tables Of Bond Lengths Determined By X-Ray And Neutron Diffraction. Part I. Bond Lengths In Organic Compounds" J. Chem. Soc. Perkin trans. II., S1-19, 1987.

ANSLYN, E.; DOUGHERTY, D. Modern Physical Organic Chemistry. University Science Books. 2005.

ARUNAN, E.; DESIRAJU, G. R.; KLEIN, R.A.; SADLEJ, J.; SCHEINER, S.; ALKORTA, I; CLARY, D. C.; CRABTREE, R. H.; DANNENBERG, J. J.; HOBZA, P.; KJAERGAARD, H. G.; LEGON, A. C.; MENNUCCI, B. & NESBITT. "Definition Of The Hydrogen Bond (IUPAC Recommendations 2011)". Pure Appl. Chem., 83 (8): 1637, 2011.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. Physical Chemistry. Ninth Edition, W. H. Freeman and Company. 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. Biochemistry. 5th Ed. W. H. Freeman. New York, 2002.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N. & BOURNE, P.E. "The Protein Data Bank". Nucl. Acids Res., 28 (1): 235, 2000.

BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. "Crystal Structure Of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase In Complex With Trypanothione, And The Structure-Based Discovery Of New Natural Product Inhibitors." Structure. 7, 81, 1999.

BULLEID, N. J. & ELLGAARD, L. "Multiple Ways To Make Disulfides". Trends in Biochemical Sciences, 36(9): 487, 2011.

CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Introdução à Biofísica Estrutural. EdUFSCar. 2009.

CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; TIEKINK, E.R.T. "Supramolecular Aggregation Patterns Based On The Bio-Inspired Se(Lone Pair)··· π (Aryl) Synthons." *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 412-438, 2012.

CARACELLI, I.; HAIDUC, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. & TIEKINK, E.R.T. "Delocalised Antimony (Lone Pair)- And Bismuth-(Lone Pair)... π (Arene) Interactions: Supramolecular Assembly And Other Considerations". *Coord. Chem. Rev.*, **257**: 2863, 2013.

CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. & TIEKINK, E.R.T. "Supramolecular Synthons Based On Gold- π (arene) interactions". *Gold Bulletin*, **46**: 81, 2013.

CARACELLI, I.; HAIDUC, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; TIEKINK, E.R.T. "Supramolecular Architectures Based On M(Lone Pair)... π (Arene) Interactions For M = Se And Te." In: Z. Rappoport. (Org.). *The Chemistry of Organic Selenium and Tellurium Compounds*. 1ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014, v. 4, p. 973-988.

CARACELLI, I.; HAIDUC, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; TIEKINK, E.R.T. "M- π (Arene) Interactions For M = Gallium, Indium And Thallium: Influence Upon Supramolecular Self-Assembly And Prevalence In Some Proteins." *Coordination Chemistry Reviews*, 281, 50-63, 2014.

CAREY, F. A.; GIULIANO, R. M. *Organic Chemistry*. 8th Edition. McGraw-Hill. 2011.

COX, E.G. "Crystal Structure of Benzene". *Rev. Mod. Phys.*, 30 (1): 159, 1958.

DAS, K. C. "Thioredoxin System In Premature And New Born Biology". *Redox Signal*, **6**: 157, 2004.

DEPONTE, M." Glutathione Catalysis And The Reaction Mechanisms Of Glutathione-Dependent Enzymes". *Biochim. Biophys. Acta*, 1830 (5): 3217, 2013.

DIAZ, W.; AULLO, J. M.; PAULINO, M.; TAPIA, O. "Transition Structure And Reactive Complexes For Hydride Transfer In An Isoalloxazine-Nicotinamide Complex. On The Catalytic Mechanism Of Glutathione Reductase. An Ab Initio MO SCF Study." *Chemical Physics*, 204, 195, 1996.

Enzyme Nomenclature, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acessado em 24/03/2015.

ERMONDI, G. & CARON, G. "Recognition Forces In Ligand-Protein Complexes: Blending Information From Different Sources". *Biochem. Pharmacol.*, 72 (12): 1633, 2006.

GROSS, E.; SEVIER, C.; HELDMAN, N.; VITU, E.; BENTZUR, M.; KAISER, C.; THORPE, C.; FASS, D. "Generating Disulfides Enzymatically: Reaction Products And Electron Acceptors Of The Endoplasmic Reticulum Thiol Oxidase Ero1p". *PNAS*, 103 (2): 299-304, 2006.

HASTINGS, J.; DE MATOS, P.; DEKKER, A.; ENNIS, M.; HARSHA, B.; KALE, N.; MUTHUKRISHNAN, V.; OWEN, G.; TURNER, S.; WILLIAMS, M. v & STEINBECK, C. "The ChEBI Reference Database And Ontology For Biologically Relevant Chemistry: Enhancements For 2013". *Nucl. Acids Res.*, 41: D456, 2013.

HECKLER, E. J.; RANCY, P. C.; KODALI, V. K. & Thorpe C. "Generating Disulfides With The Quiescin Sulfhydryl Oxidases". *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Cell Research*, 1783 (4): 567, 2008.

HUNG, Y. P.; ALBECK J. G.; TANTAMA, M. & YELLEN, G. "Imaging Cytosolic NADH-NAD⁺ Redox State With A Genetically Encoded Fluorescent Biosensor". *Cell Metab.*, 14 (4): 545, 2011.

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.

KAO, YA-TING.; SAXENA, C.; HE, T.; GUO, L.; WANG, L.; SANCAR, A.; ZHONG, D. "Ultrafast Dynamics Of Flavins In Five Redox States." *J. Am. Chem. Soc.* 130, 13132, 2008.

KRAUTH-SIEGEL, R. & SCHONECK, R. "Trypanothione Reductase And Lipoamide Dehydrogenase As Targets For A Structure-Based Drug Design". *FASEB J.*, 9: 1138, 1995.

KARPLUS, P. A. & SCHULZ, G. E. "Refined Structure Of Glutathione Reductase At 1.54 Å Resolution". *J. Mol. Biol.*, 195 (3): 701, 1987.

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. "Salt Bridge Stability In Monomeric Proteins." *J. Mol. Biol.*, 293: 1241, 1999.

LI, R.; BIANCHET, M. A.; TALALAY, P. & AMZEL, L. M. "The Three-Dimensional Structure Of NAD(P)H: Quinone Reductase, A Flavoprotein Involved In Cancer Chemoprotection And Chemotherapy: Mechanism Of The Two-Electron Reduction". Proc. Natl. Acad. Sci., 92 (19): 8846, 1995.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. Molecular Cell Biology. 5th Ed. W. H. Freeman. 2003.

MALONE, J. F.; MURRAY, C. M.; CHARLTON, M. H.; DOCHERTY, R. & LAVERY, A. J. "X[mdash]H[middot][middot][middot][pi] (phenyl) Interactions. Theoretical And Crystallographic Observations". J. Chem. Soc. Faraday Trans., 93 (19): 3429, 1997.

MANDELS, G. R. "Properties And Surface Location Of A Sulfhydryl Oxidizing Enzyme In Fungus Spores". J. Bacteriol., 72: 230, 1956.

MARCIA, M.; ERMLER, U.; PENG, G.; MICHEL, H. "The Structure Of Aquifex Aeolicus Sulfide:Quinone Oxidoreductase, A Basis To Understand Sulfide Detoxification And Respiration". Proc. Natl. Acad. Sci., 106 (24): 9625, 2009.

MURRAY, P. R. S. Principles Of Organic Chemistry. 2nd Edition. Heinemann Educational. 1977.

NELSON, D.; COX, M. Lehninger's Principles of Biochemistry. 5th Ed. W. H. Freeman. 2008.

Ref. Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013. <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>. Acessado em 24/03/2015.

RSCB Protein Data Bank. RSCB PDB – Content Growth Report. <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=explMethod-xray&seqid=100>. Acessado em 25/03/2015.

SACCO, A. C. S. Mapeamento vetorial de interações eletrostáticas para biomoléculas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal de São Carlos. Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector, orientador: Profa. Dra. Ignez Caracelli. 2013.

SCHULZ, G. E.; SCHIRMER, R. H.; PAI, E. F. "FAD-Binding Site Of Glutathione Reductase". J. Mol..Biol., 160 (2): 287, 1982.

VEGA-TEIJIDO, M. A.; CARACELLI, I. & ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. “Conformational Analyses And Docking Studies Of A Series Of 5-Nitrofuran-And 5-Nitrothiophen-Semicarbazone Derivatives In Three Possible Binding Sites Of Trypanothione And Glutathione Reductases”. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, **24**: 349, 2006.

VERMA, R.; SCHWANEBERG, U.; ROCCATANO, D. “Conformational Dynamics Of The FMN-Binding Reductase Domain Of Monooxygenase P450BM-3.” *J. Chem. Theory Comput.* 9, 96, 2013.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York, 1995.

APÊNDICES

A1. Tabela de descrição das estruturas de 102 oxidoredutases com interações S- π com o FAD e designação das interações: S(LP)- π , ou SH- π , ou outras.

| PDB ID | Resolução (Å) | 1 = Sim 0 = Não | Comentários (com fundo verde claro algumas estruturas interessantes) | Posição de SS vs. Isoaloxazina |
|-------------|---------------|--------------------|--|---|
| <u>3DK9</u> | 0,95 | 1 | Isoaloxazina do FAD com deformação "torção" e possivelmente estabilizada por SG(LP)- π e por (Y197)O-H...N(LP) ou ... π ! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3DK4</u> | 1,20 | 1 | Isoaloxazina do FAD com deformação "torção" e possivelmente estabilizada por SG(LP)- π e por (Y197)O-H...N(LP)! NDP! GSH! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2Q0L</u> | 1,45 | 1 | Isoaloxazina do FAD muito deformada em "dobra"! NAP! | 4 SH- π (FAD) 3,169 / 3,349 Å 3,253 / 3,399 Å FRENTE |
| <u>3POK</u> | 1,47 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção"! FAD em U! Anel benzênico do FAD estabilizado por "caminho" π - π !!! IMD! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>1JR8</u> | 1,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção"! FAD em U! Anel benzênico do FAD estabilizado por "caminho" π - π !!! Potencial interação SG- π com anéis da adenina do FAD! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>3GRS</u> | 1,54 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por SG(LP)... π e por (Y197)O-H...N(LP) ou ... π ! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1ZK7</u> | 1,60 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "dobra"! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2EQ6</u> | 1,60 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3TK0</u> | 1,61 | 1 | SG- π não com o FAD! FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente deformada no anel benzênico e estabilizada por "caminho" π - π !!! SD de MET129 pode estar a fazer interação LP... π com 2 F! | SH- π (FAD) FRENTE |

| | | | | |
|-------------|------|---|---|--|
| <u>1MO9</u> | 1,65 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2YQU</u> | 1,70 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar, mas com extremidades (=O e CH ₃) fora do plano! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1FEC</u> | 1,70 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e com extremidades (=O e CH ₃) fora do plano! (Y197)OH...N10(FAD)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2QOK</u> | 1,70 | 1 | Uma isoaloxazina do FAD planar e outra deformada em "dobra" bonitinha! NAP! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>1GES</u> | 1,74 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y177)O-H...π(FAD)! Possível (H439)CH...LP(SGs) das ligações dissulfeto! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3DGH</u> | 1,75 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! Isoaloxazina possivelmente estabilizada por interações (Y197)O-H...π(FAD)! Possível (H464)CH...LP(SGs) das ligações dissulfeto! C413 com possíveis interações com F403 e Y398! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3GWN</u> | 1,78 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva"! FAD em U! Anel benzênico da isoaloxazina do FAD possivelmente estabilizado por "caminho" π-π!!! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2EQ7</u> | 1,80 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar e com possível interação com anel nicotinamida do NAD! Possível (H434)CH...LP(SGs) e/ou NH...LP(SGs) das ligações dissulfeto! NAD! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>4GCM</u> | 1,80 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva"! Ligações SS dos confôrmeros não são identificadas pelo programa nem pelo DS Visualizer! Possível (T46)O-H...π(FAD)! NAP! 14 MSE! | S(LP)-pi(FAD) SH-pi/N(FAD) FRENTE |
| <u>1OQC</u> | 1,80 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π-π! FAD em U! Possível interação entre (C91)SG(SS)-anel da adenina(FAD)!!! Possível interação entre (C124)SG...π(W119)! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>3M31</u> | 1,85 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e, possivelmente, estabilizada por "caminho" π-π! Possíveis interações (C143)SG(LP)...π(F171) e (C90)SG(LP)...π(W93)! | S(LP)-pi(FAD) S(LP)-pi(W93) 3,612 Å S(LP)-pi(F171) 4,067 Å FRENTE |
| <u>3MBG</u> | 1,85 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD planar, mas com grande deformação do anel benzênico! Possível estabilização da isoaloxazina do FAD por "caminho" π-π!!! Possível interação entre (C171)SG(SS)-anel da adenina(FAD)!!! Possível interação (C204)SG(SS)-W199! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |

| | | | | |
|-------------|------|---|---|--|
| <u>4K8D</u> | 1,86 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e com possível interação com anel nicotinamida do NDP! Ver C132 (SG)! UNX! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1GER</u> | 1,86 | 1 | Isoaloxazina do FAD com deformação "torção" pronunciada! Possível estabilização da isoaloxazina com (Y177)O-H... π (FAD)! Possível interação SG(C42)LP... π (H439)...LP(C47)SG ou CH-LP(SG)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3URH</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção"! Possível interação SG(C41)LP... π (H447)! MSE! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1ZX9</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva"! Ver C142 (SG)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2Q7V</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2QAE</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção"! Possível interação SG(C41)LP... π (H447)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1FL2</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar! Possível interação dos dois SG da ligação dissulfeto com FAD! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2WPF</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD com leve deformação em "curva" e possivelmente estabilizada por interação π ... π "T shaped" entre F198 e FAD! Possível interação dos dois SG da ligação dissulfeto com H461! | S(LP)-pi(FAD) 1 SH-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3O0H</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar e possivelmente estabilizada por interação (Y180)O-H... π (FAD)! Possível interação entre os SGs da ligação dissulfeto e H438! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1K4Q</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD muito deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! N1 e N5 do FAD oxidados! NIY106! NIY114! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2X8G</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por (Y296)O-H... π (FAD)! Ver (C347)SG... π (Y374 e F380)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3O55</u> | 1,90 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Possível interação entre SGs de C95 e C112 em dissulfeto e H96 e anel da adenina do FAD! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2X8H</u> | 1,90 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por interação (Y296)O-H... π (FAD)!! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |

| | | | | |
|-------------|------|---|---|---|
| <u>2EQ8</u> | 1,94 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! Possível interação (SG)LP(C47)... π (H446)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3U2L</u> | 1,95 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD quase planar e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Possível interação SGs(LP) de C188 e C171 com H172 e anel da adenina do FAD! | SH- π (FAD) S(LP)- π (H172) 3,940 Å FRENTE |
| <u>3LLK</u> | 2,00 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Possível interação entre (C449)LP(SG) e F447! Possível interação (SG)LP de C512 e C509... π (F530)! | S(LP)- π (FAD) S(LP)- π (F447) 4,147 / 4,250 Å FRENTE |
| <u>3W4Y</u> | 2,00 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! SGs em dissulfeto(C130 e C133) em muito prováveis interações (LP) com W132(π)! Possível interação SG(LP)... π entre C159 e anel da adenina do FAD! Mto bonitas interações!!!! | S(LP)- π (FAD) S(LP)- π (W132) 3,525 / 3,596 / 3,676 Å FRENTE |
| <u>1GRA</u> | 2,00 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! GSH! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1JRA</u> | 2,00 | 1 | FAD em U! Isoaloxazinas dos 4 FADs deformadas em "curva" e possivelmente estabilizadas por "cadeias" π - π ! Possível interação entre SGs em dissulfeto de C100 e C83 com H84 e com o anel da adenina dos FADs! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>4EOH</u> | 2,00 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Possível interação (C130 e C133)SGs(LP)... π (W132)! Possível interação (C159)SG(LP)... π (F154 e/ou anel da adenina do FAD)! | S(LP)- π (FAD) S(LP)- π (W132) 4,066 / 4,197 Å FRENTE |
| <u>3HYW</u> | 2,00 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar e possivelmente estabilizada por interação (T42)O-H... π (FAD)! C8M do FAD está ligado a um grupo tiol (SH) ou a um S em dissulfeto com SG de C124! N3 do FAD oxidado! Átomos S de PS9 estabelecem interações LP... π (FAD)! DCQ! CSS! | (PS9)S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>1FEB</u> | 2,00 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por interação (Y197)O-H... π (FAD)! SGs de C51 e C56, em dissulfeto, possivelmente em interação LP... π (H460)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1XAN</u> | 2,00 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por interação (Y197)O-H... π (FAD)! HXP! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3LLI</u> | 2,05 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Possível interação LP... π entre SG de C449 e F447! Potencial interação LP... π entre os SGs de C512 e C509, em dissulfeto, com F530! | S(LP)- π (FAD) S(LP)- π (F447) 4,248 Å FRENTE |
| <u>1ZMD</u> | 2,08 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por interações com a nicotinamida de NAI! Possível interação S(LP)- π [<4.5 Å] ou (H452)C-H...S(LP)[<3.8 Å] da dissulfeto! 8 FADs e 88Cisteínas! Parece esclarecer o mecanismo de transferência de cargas no sítio ativo!!!! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |

| | | | | |
|-------------|------|---|--|--------------------------------------|
| <u>2EQ9</u> | 2,09 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! Potencial interação entre SG de C47 e H446! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3GWL</u> | 2,10 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>1TDE</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção"! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2WOI</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "dobra" e possivelmente estabilizada por interações π ... π do tipo "T-shape" com F198! Possível interação LP... π (ou N-LP: 3.3 Å) entre os SGs de C52 e C57, em dissulfeto, com H461! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2R9Z</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar, mas com CH ₃ fora do plano e possivelmente estabilizada por (Y176)O-H... π (FAD)! Possível interação LP... π (ou N-LP: 3.5 Å) entre SGs de C42 e C47, em dissulfeto, e H437! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1BWC</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD com deformação generalizada e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! Ligação SS não representada entre C58-SG e AJ3-S5 (2.047 Å)!!! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2WPC</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por interações π ... π do tipo "T-shape" com F198! Possível interação LP... π /LP(N) entre SG de C52, em dissulfeto, com H461! WP7! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2WPE</u> | 2,10 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por interação π ... π do tipo "T-shape" com F198! WPE! Possível interação LP... π entre o SG de C52, em dissulfeto, e H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Ver C444 (possível SH- π com F)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3QZY</u> | 2,14 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD(cadeia A) deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Isoaloxazina do FAD(cadeia B) com grande deformação em "torção" e possivelmente estabilizada por "caminho" π - π ! Potencial interação LP... π entre SG de C158 e F106! IMD! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>2C3D</u> | 2,15 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por (T225)O-H... π (FAD)! Possível interação LP... π (ou LP...H-C) entre SG de C82 e F501! COM! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>4JQ9</u> | 2,17 | 1 | IMD! Isoaloxazina do FAD deformada em "dobra"! Possível interação LP... π entre SG de C45 e H445! | S(LP)-pi(FAD) SH-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>2F5Z</u> | 2,18 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva"! Possível interação SG(LP)... π /LP(N) entre C45 da mesma cadeia e H452 de outra cadeia! 10 FAD!!! Apenas as isoaloxazinas de FAD I e J parecem diferentes(marginalmente)! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |

| | | | | |
|-------------|------|---|--|-------------------------|
| <u>2V6O</u> | 2,20 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar, mas com extremidades (=O e CH ₃) fora do plano! Isoaloxazina possivelmente estabilizada por interações (Y296)O-H...π(FAD)! Ver C347 e C301! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3QFA</u> | 2,20 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por (Y200)O-H...π(FAD)! Possível interação LP...π entre o SG de C59, em dissulfeto, e H472! Ver C69----F-F-F!!!! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1V59</u> | 2,20 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção"! Possível interação LP...π entre SG de C44, em dissulfeto, e H457! Falta o segmento nicotinamida do NAD! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1FEA</u> | 2,20 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H...π(FAD)! Possível interação LP...π entre SG de C51, em dissulfeto, e H460! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>1RP4</u> | 2,20 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva"! Possível interação (C355)SG(LP)...π(Y191)! Possível interação (C349)SG(LP)...π(F92)! Possível interação (C90)SG(LP)...π(W93)! Possível interação (C143)SG(LP)...π(F171)! Possível interação (C150)SG(LP)...π(F294)! MSE! NEN! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>3LAD</u> | 2,20 | 1 | Anel uracílico da isoaloxazina do FAD muito deformado! Potencial interação entre SG de C48 e H450! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3TD7</u> | 2,21 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" π...π! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |
| <u>3SQP</u> | 2,21 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar, com as extremidades CH ₃ fora do plano, e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H...π(FAD)! N1 e N3 do FAD oxidados, o que resulta numa isoaloxazina com 2 anéis aromáticos! Possível interação entre SGs de C58 e C63(em dissulfeto) e H467 e C58(SG)LP-LP(OG1)T339! Possível interação entre SGs de C90(cadeia A) e C90(cadeia B), em dissulfeto, e H82 (cadeia A e cadeia B)! 3J8! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3DH9</u> | 2,25 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H...π(FAD)! Extremidades (=O e CH ₃) da isoaloxazina muito orientadas! Possível interação entre SG de C57 (em dissulfeto) e H464! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3DGZ</u> | 2,25 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por (Y195)O-H...π(FAD)! NA7! | S(LP)-pi(FAD) ATRÁS |
| <u>3QCP</u> | 2,30 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD quase planar e possivelmente estabilizada por "caminho" π...π! Possível interação (C405)SG(LP)...π(F423)! Todos SG em dissulfeto! | S(LP)-pi(FAD) FRENTE |

| | | | | |
|-------------|------|---|--|--|
| <u>2WBA</u> | 2,30 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por interação $\pi\cdots\pi$ do tipo "T-shape" com F198! Possível interação SG(LP)... π entre C52 e C57, em dissulfeto, com H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! NDP representado <u>sem a porção nicotinamida!</u> | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1AOG</u> | 2,30 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por interação $\pi\cdots\pi$ do tipo "T-shape" com F199! Possível interação SG(LP)... π /LP(N) entre C53, em dissulfeto, e H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1GRT</u> | 2,30 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar nos anéis não-aromáticos e com o anel benzênico fora do plano! Possível estabilização por (Y195)O-H... π (FAD)! Possível interação (C63)N-H...LP(S)C63 - 2.391 Å e 124°! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2X99</u> | 2,30 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$ com anel nicotinamida de NDP, Y296 e F324! Ver C520 e C347! GSH! | S(LP)- π (FAD) SH- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3HYV</u> | 2,30 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! H2S ligado a C8M do FAD! N3 do FAD oxidado! PS9! PS9 assume posição de SGs em interação LP...π(FAD)!!!! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>3AHQ</u> | 2,35 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD levemente e deformada em "curva"! Possível interação SG(LP)... π entre C397 e C394, em dissulfeto e Y191! Possível interação SG(LP)... π entre C46 e F306, e entre C37 e F258 (C46 e C37 em dissulfeto)! Possível SG(LP)... π entre C35 e F354! Possível interação SG(LP)... π entre C85 e C391, em dissulfeto e W88! Possível C-H...LP(SG)C391! | S(LP)- π (FAD) C85(SG)LP- π (W88) 3,740 Å FRENTE |
| <u>4J56</u> | 2,37 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por (Y232)O-H... π (FAD)! N1 e N3 do FAD oxidados, o que resulta numa isoaloxazina com 2 anéis aromáticos! Possível interação SG(LP)... π entre C88 e C93, em dissulfeto, e H509 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Ver C264! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1BZL</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por interação $\pi\cdots\pi$ do tipo "T-shape" com F199! Possível interação LP... π entre os SGs de C53 e C58, em dissulfeto, e H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! GCG! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3R7C</u> | 2,40 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$! SG de C62 e de C65, em dissulfeto, podem ambos estar a interagir com a isoaloxazina do FAD (cadeias A,B e D, mas não C)! Possível interação SG(LP)... π entre C91 e anel da adenina do FAD! Possível interação SG(LP)... π entre C124 e W119! SG todos em dissulfeto! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>2HQM</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y207)O-H... π (FAD)! Possível interação SG(LP)... π entre C61 e C66, em dissulfeto, e H472 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! GSH ligado a C239, na periferia da proteína! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2A8X</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "dobra"! Possível interação LP... π entre os SGs de C41 e C46, em dissulfeto, e H443 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! MSE! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |

| | | | | |
|-------------|------|---|--|---|
| <u>4M52</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! Possível interação LP... π entre os SGs de C41 e C46, em dissulfeto, e H443 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! M52! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>4GR1</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! RGS! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3ITJ</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção"(cadeias A,C,D) e em "dobra"(cadeia B)! SGs de C141 e de C144, em dissulfeto, em possível interação com a isoaloxazina do FAD! Possível interação de C304(SH)- π (Y20)! | 2 S(LP)- π (FAD) 2 S-S sem interação com FAD FRENTE |
| <u>5GRT</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! Possível interação (Y144)O-H...LP-SG(TS4)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2NVK</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar, mas com extremidades (=O e CH ₃) fora do plano, e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! Falta a região nicotinamida do NAP! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3RNM</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar! Possível interação SG(LP)... π entre C45 e C50, em dissulfeto, e H452 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! BME! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2TPR</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! Possível interação SG(LP)... π entre C51 e C56, em dissulfeto, e H460 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1JEH</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "curva"! Possível interação SG(LP)... π entre C44 e C49, em dissulfeto, e H457 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Ver C33 e C454! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3II4</u> | 2,42 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar e possivelmente estabilizada por interações π (FAD)...LP(O5(3II))! Possível interação SG(LP)... π entre C41 e C46, em dissulfeto, e H443 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3ISH</u> | 2,43 | 1 | Isoaloxazina do FAD quase planar! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>1LVL</u> | 2,45 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por (Y181)O-H... π (FAD)! NAD! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>1VDC</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD deformada em "curva"! Distâncias SG-FAD perto de 3 Å! Ver C303! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |

| | | | | |
|-------------|------|-----|--|--|
| <u>2WOB</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "torção" e possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$ com anel da nicotinamida do NDP, F198 e F230! Possível interação SG(LP)... π entre C52 e C57, em dissulfeto, e H461 de outra cadeia (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Programa não encontra SS porque SG-SG $\approx 3 \text{ \AA}$! | S(LP)- π (FAD) SH- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2RAB</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar, mas com extremidades (=O e CH3) fora do plano! Isoaloxazina do FAD possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$ com anel da nicotinamida do NAD, Y176 e F205! Possível interação SG(LP)... π entre C42 e C47, em dissulfeto, e H437 de outra cadeia (também pode ser His-C-H...LP-SG)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>4J57</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por (Y232)O-H... π (FAD)! N1 e N3 do FAD oxidados, o que resulta numa isoaloxazina com 2 anéis aromáticos! Possível interação SG(LP)... π entre C88 e C93, em dissulfeto, e H509 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2WPG</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por interação $\pi\cdots\pi$ do tipo "T-shape" com F198! Possível interação LP... π entre os SGs de C52 e C57, em dissulfeto, e H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Possível C-H... π de WPG com F, Y e W! Ver C444! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>3GRT</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD muito deformada em "torção" e em "curva" e possivelmente estabilizada por (Y197)O-H... π (FAD)! C2 do FAD reduzido e com posição de C-OH perpendicular a isoaloxazina! N1 e N5 do FAD oxidados! C7M do FAD separado da isoaloxazina! Y114 em boa posição para iniciar a redução de SG2 de TS2! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>4LA1</u> | 2,35 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por (Y296)O-H... π (FAD)! N1 e N3 do FAD oxidados, o que resulta numa isoaloxazina com 2 anéis aromáticos! Possível interação LP... π entre os SGs de C154 e C159, em dissulfeto, e H571 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! Ver C347! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>4LDK</u> | 2,04 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD planar, mas com o anel benzênico deformado, e possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$! N1 e N3 do FAD oxidados, o que resulta numa isoaloxazina com 2 anéis aromáticos! Possível interação LP... π entre SG de C171, em dissulfeto, e o anel da adenina do FAD (também pode ser (FAD)N-H...LP-SG)! Possível interação LP... π entre SG de C188, em dissulfeto, e H172! SG de CSD em possível interação LP... π com FAD! Devido a hibridização, o SG de CSD só tem 1 LP! Ver C204! | (CSD)S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| <u>4KPR</u> | 2,40 | 1 | Isoaloxazina do FAD levemente deformada em "dobra" e possivelmente estabilizada por (Y200)O-H... π (FAD)! | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>4NEV</u> | 2,50 | 1 | Isoaloxazina do FAD planar e possivelmente estabilizada por interação $\pi\cdots\pi$ do tipo "T-shape" com F198! Possível interação LP... π entre os SGs de C52 e C57, em dissulfeto, e H461 (também pode ser His-C-H...LP-SG)! <u>Possível interação LP...π entre S_{AP} de 2JR e W21!</u> | S(LP)- π (FAD) ATRÁS |
| <u>2HJ3</u> | 2,50 | 1 | FAD em U! Isoaloxazina do FAD deformada em "curva" e possivelmente estabilizada por "caminho" $\pi\cdots\pi$! Possível interação LP... π entre SG de C83, em dissulfeto, e anel da adenina do FAD e F98! Possível interação LP... π entre SG de C100, em dissulfeto, e H84! Todos SG em dissulfeto! | S(LP)- π (FAD) FRENTE |
| 102 | | 102 | | |

A2. Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em GR.

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 3DK9 | 3DJJ | 3DK8 | 3DK4 | 3GRS | 1DNC | 1GSN | 2GH5 | 3DJG | 1GRB | 1K4Q | 1GRA | |
| N10-C9A | 1,40 | 1,43 | 1,45 | 1,42 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,45 | 1,44 | 1,39 | 1,38 | 1,36 | 1,39 |
| C9A-C5X | 1,40 | 1,41 | 1,43 | 1,40 | 1,41 | 1,43 | 1,42 | 1,48 | 1,48 | 1,39 | 1,41 | 1,38 | 1,41 |
| C5X-N5 | 1,40 | 1,36 | 1,37 | 1,36 | 1,36 | 1,37 | 1,35 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,37 | 1,52 | 1,36 |
| N5-C4X | 1,36 | 1,37 | 1,38 | 1,39 | 1,33 | 1,36 | 1,37 | 1,42 | 1,42 | 1,36 | 1,30 | 1,43 | 1,30 |
| C4X-C10 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,36 | 1,45 | 1,42 | 1,43 | 1,45 | 1,44 | 1,41 | 1,47 | 1,51 | 1,44 |
| C10-N10 | 1,39 | 1,37 | 1,36 | 1,36 | 1,33 | 1,37 | 1,35 | 1,44 | 1,44 | 1,37 | 1,37 | 1,28 | 1,35 |
| C5X-C6 | 1,40 | 1,43 | 1,39 | 1,43 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,45 | 1,44 | 1,39 | 1,40 | 1,43 | 1,40 |
| C6-C7 | 1,42 | 1,39 | 1,43 | 1,42 | 1,35 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,41 | 1,40 | 1,37 | 1,31 | 1,36 |
| C7-C8 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,42 | 1,43 | 1,42 | 1,44 | 1,44 | 1,44 | 1,40 | 1,42 | 1,47 | 1,42 |
| C8-C9 | 1,38 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,39 | 1,40 | 1,41 | 1,43 | 1,45 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,38 |
| C9-C9A | 1,42 | 1,40 | 1,36 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,38 | 1,37 | 1,39 |
| C4X-C4 | 1,47 | 1,43 | 1,39 | 1,47 | 1,44 | 1,44 | 1,45 | 1,42 | 1,43 | 1,43 | 1,49 | 1,58 | 1,49 |
| C4-N3 | 1,36 | 1,40 | 1,36 | 1,36 | 1,36 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,37 | 1,38 | 1,31 | 1,36 |
| N3-C2 | 1,36 | 1,38 | 1,43 | 1,35 | 1,42 | 1,39 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,41 | 1,44 | 1,42 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,34 | 1,33 | 1,40 | 1,32 | 1,32 | 1,34 | 1,36 | 1,36 | 1,38 | 1,37 | 1,33 | 1,36 |
| N1-C10 | 1,33 | 1,37 | 1,36 | 1,38 | 1,35 | 1,36 | 1,37 | 1,36 | 1,35 | 1,35 | 1,33 | 1,14 | 1,32 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1GRE | 1GRF | 1GRG | 1XAN | 1BWC | 3SQP | 1GRT | 4GR1 | 5GRT | 3GRT | |
| N10-C9A | 1,39 | 1,38 | 1,40 | 1,38 | 1,43 | 1,45 | 1,45 | 1,49 | 1,38 | 1,46 | 1,45 |
| C9A-C5X | 1,42 | 1,40 | 1,42 | 1,43 | 1,42 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,47 | 1,46 |
| C5X-N5 | 1,37 | 1,36 | 1,36 | 1,35 | 1,36 | 1,43 | 1,42 | 1,37 | 1,36 | 1,41 | 1,39 |
| N5-C4X | 1,32 | 1,31 | 1,32 | 1,36 | 1,34 | 1,44 | 1,44 | 1,26 | 1,29 | 1,30 | 1,29 |
| C4X-C10 | 1,47 | 1,46 | 1,45 | 1,42 | 1,45 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,41 | 1,46 | 1,54 |
| C10-N10 | 1,36 | 1,35 | 1,35 | 1,34 | 1,33 | 1,39 | 1,39 | 1,37 | 1,32 | 1,37 | 1,34 |
| C5X-C6 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,38 | 1,41 | 1,49 | 1,48 | 1,40 | 1,39 | 1,41 | 1,40 |
| C6-C7 | 1,36 | 1,35 | 1,36 | 1,38 | 1,36 | 1,44 | 1,44 | 1,36 | 1,36 | 1,42 | 1,41 |
| C7-C8 | 1,43 | 1,42 | 1,43 | 1,44 | 1,44 | 1,43 | 1,43 | 1,46 | 1,44 | 1,48 | 1,43 |
| C8-C9 | 1,38 | 1,37 | 1,39 | 1,38 | 1,40 | 1,46 | 1,46 | 1,47 | 1,38 | 1,41 | 1,39 |
| C9-C9A | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,47 | 1,47 | 1,43 | 1,39 | 1,40 | 1,41 |
| C4X-C4 | 1,48 | 1,48 | 1,47 | 1,45 | 1,44 | 1,44 | 1,45 | 1,47 | 1,46 | 1,50 | 1,53 |
| C4-N3 | 1,38 | 1,38 | 1,36 | 1,37 | 1,37 | 1,48 | 1,48 | 1,29 | 1,36 | 1,35 | 1,36 |
| N3-C2 | 1,41 | 1,40 | 1,40 | 1,38 | 1,41 | 1,43 | 1,43 | 1,36 | 1,40 | 1,35 | 1,37 |
| C2-N1 | 1,37 | 1,37 | 1,36 | 1,34 | 1,31 | 1,42 | 1,42 | 1,37 | 1,39 | 1,31 | 1,41 |
| N1-C10 | 1,33 | 1,29 | 1,31 | 1,35 | 1,35 | 1,49 | 1,48 | 1,31 | 1,31 | 1,31 | 1,37 |

A3. Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em TR.

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1FEC | | 2WPF | | | | 1FEB | | 2WOI | | | |
| N10-C9A | 1,40 | 1,41 | 1,36 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,31 | 1,37 | 1,39 | 1,42 | 1,40 | 1,42 |
| C9A-C5X | 1,44 | 1,43 | 1,40 | 1,37 | 1,40 | 1,39 | 1,44 | 1,45 | 1,38 | 1,41 | 1,43 | 1,39 |
| C5X-N5 | 1,39 | 1,41 | 1,41 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,35 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,41 | 1,41 |
| N5-C4X | 1,36 | 1,34 | 1,35 | 1,35 | 1,34 | 1,37 | 1,27 | 1,37 | 1,37 | 1,41 | 1,38 | 1,40 |
| C4X-C10 | 1,42 | 1,43 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,45 | 1,44 | 1,40 | 1,42 | 1,39 | 1,39 |
| C10-N10 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,41 | 1,43 | 1,39 | 1,39 | 1,41 | 1,40 |
| C5X-C6 | 1,44 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,40 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,43 |
| C6-C7 | 1,41 | 1,42 | 1,41 | 1,40 | 1,42 | 1,38 | 1,35 | 1,36 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,38 |
| C7-C8 | 1,48 | 1,45 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,43 | 1,53 | 1,48 | 1,39 | 1,39 | 1,42 | 1,42 |
| C8-C9 | 1,43 | 1,39 | 1,37 | 1,39 | 1,37 | 1,39 | 1,34 | 1,44 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,42 |
| C9-C9A | 1,45 | 1,46 | 1,37 | 1,40 | 1,37 | 1,41 | 1,40 | 1,41 | 1,39 | 1,43 | 1,43 | 1,44 |
| C4X-C4 | 1,42 | 1,42 | 1,39 | 1,40 | 1,37 | 1,40 | 1,46 | 1,44 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,42 |
| C4-N3 | 1,39 | 1,36 | 1,35 | 1,38 | 1,36 | 1,37 | 1,42 | 1,37 | 1,37 | 1,36 | 1,36 | 1,38 |
| N3-C2 | 1,39 | 1,42 | 1,36 | 1,36 | 1,37 | 1,36 | 1,45 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,38 |
| C2-N1 | 1,35 | 1,34 | 1,39 | 1,40 | 1,36 | 1,37 | 1,37 | 1,33 | 1,36 | 1,37 | 1,38 | 1,37 |
| N1-C10 | 1,39 | 1,37 | 1,34 | 1,35 | 1,36 | 1,35 | 1,36 | 1,35 | 1,38 | 1,38 | 1,40 | 1,37 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2WPC | | | | 2WPE | | | | 1FEA | | | |
| N10-C9A | 1,41 | 1,40 | 1,36 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,40 | 1,39 | 1,38 | 1,43 | 1,37 |
| C9A-C5X | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,43 | 1,41 | 1,43 | 1,42 |
| C5X-N5 | 1,38 | 1,40 | 1,38 | 1,40 | 1,43 | 1,39 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,30 | 1,32 | 1,38 |
| N5-C4X | 1,39 | 1,35 | 1,36 | 1,39 | 1,36 | 1,39 | 1,36 | 1,37 | 1,39 | 1,36 | 1,37 | 1,36 |
| C4X-C10 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,37 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,40 | 1,47 | 1,43 |
| C10-N10 | 1,38 | 1,39 | 1,37 | 1,40 | 1,41 | 1,39 | 1,41 | 1,41 | 1,45 | 1,38 | 1,33 | 1,38 |
| C5X-C6 | 1,40 | 1,39 | 1,38 | 1,43 | 1,42 | 1,37 | 1,42 | 1,41 | 1,38 | 1,39 | 1,36 | 1,38 |
| C6-C7 | 1,42 | 1,43 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,39 | 1,36 | 1,35 | 1,38 |
| C7-C8 | 1,39 | 1,35 | 1,38 | 1,40 | 1,41 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,41 | 1,39 | 1,40 |
| C8-C9 | 1,37 | 1,42 | 1,37 | 1,41 | 1,39 | 1,39 | 1,41 | 1,39 | 1,42 | 1,39 | 1,40 | 1,41 |
| C9-C9A | 1,39 | 1,42 | 1,41 | 1,43 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,41 | 1,35 | 1,39 | 1,39 |
| C4X-C4 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,41 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,43 | 1,53 | 1,41 | 1,46 | 1,40 |
| C4-N3 | 1,38 | 1,35 | 1,38 | 1,41 | 1,39 | 1,36 | 1,39 | 1,38 | 1,32 | 1,34 | 1,37 | 1,39 |
| N3-C2 | 1,42 | 1,36 | 1,37 | 1,41 | 1,40 | 1,35 | 1,39 | 1,40 | 1,36 | 1,34 | 1,42 | 1,35 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,40 | 1,35 | 1,37 | 1,37 |
| N1-C10 | 1,37 | 1,35 | 1,35 | 1,41 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,32 | 1,37 | 1,30 | 1,35 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2WOW | | | | 1AOG | | 2WBA | | 1BZL | | 2TRP | |
| N10-C9A | 1,41 | 1,38 | 1,40 | 1,39 | 1,37 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,40 | 1,39 |
| C9A-C5X | 1,37 | 1,42 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,42 | 1,40 | 1,39 | 1,42 | 1,42 | 1,40 | 1,40 |
| C5X-N5 | 1,37 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,33 | 1,31 | 1,38 | 1,38 | 1,32 | 1,32 | 1,37 | 1,36 |
| N5-C4X | 1,39 | 1,37 | 1,41 | 1,39 | 1,33 | 1,32 | 1,38 | 1,38 | 1,32 | 1,33 | 1,30 | 1,29 |
| C4X-C10 | 1,38 | 1,40 | 1,38 | 1,35 | 1,42 | 1,41 | 1,39 | 1,39 | 1,43 | 1,41 | 1,44 | 1,44 |
| C10-N10 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,37 | 1,36 | 1,38 | 1,39 | 1,36 | 1,37 | 1,36 | 1,37 |
| C5X-C6 | 1,44 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,41 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,41 | 1,40 | 1,42 | 1,39 |
| C6-C7 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,41 | 1,35 | 1,35 | 1,39 | 1,39 | 1,36 | 1,35 | 1,38 | 1,37 |
| C7-C8 | 1,40 | 1,41 | 1,40 | 1,39 | 1,44 | 1,43 | 1,40 | 1,39 | 1,44 | 1,44 | 1,43 | 1,43 |
| C8-C9 | 1,39 | 1,40 | 1,44 | 1,42 | 1,34 | 1,34 | 1,39 | 1,39 | 1,35 | 1,35 | 1,38 | 1,37 |
| C9-C9A | 1,38 | 1,40 | 1,43 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,41 | 1,41 | 1,41 |
| C4X-C4 | 1,40 | 1,42 | 1,43 | 1,40 | 1,51 | 1,48 | 1,39 | 1,39 | 1,51 | 1,51 | 1,48 | 1,48 |
| C4-N3 | 1,39 | 1,37 | 1,41 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,36 | 1,36 | 1,36 |
| N3-C2 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,36 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,36 | 1,40 | 1,41 |
| C2-N1 | 1,37 | 1,37 | 1,33 | 1,37 | 1,41 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,41 | 1,39 | 1,36 | 1,38 |
| N1-C10 | 1,37 | 1,39 | 1,36 | 1,36 | 1,34 | 1,33 | 1,38 | 1,38 | 1,34 | 1,32 | 1,31 | 1,32 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2WVOV | | | | 2WP6 | | | | 4NEV | |
| N10-C9A | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,42 | 1,41 |
| C9A-C5X | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,41 | 1,39 | 1,41 | 1,40 | 1,50 | 1,49 |
| C5X-N5 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,36 | 1,35 |
| N5-C4X | 1,34 | 1,37 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,37 | 1,35 | 1,35 |
| C4X-C10 | 1,39 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,48 | 1,48 |
| C10-N10 | 1,38 | 1,40 | 1,38 | 1,39 | 1,37 | 1,37 | 1,39 | 1,37 | 1,41 | 1,40 |
| C5X-C6 | 1,41 | 1,39 | 1,40 | 1,37 | 1,41 | 1,38 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 |
| C6-C7 | 1,38 | 1,42 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,39 |
| C7-C8 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,49 | 1,49 |
| C8-C9 | 1,39 | 1,38 | 1,41 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,39 |
| C9-C9A | 1,39 | 1,38 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,40 | 1,39 |
| C4X-C4 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,42 | 1,39 | 1,39 | 1,42 | 1,49 | 1,49 |
| C4-N3 | 1,39 | 1,37 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,39 | 1,38 | 1,34 | 1,34 |
| N3-C2 | 1,37 | 1,38 | 1,36 | 1,37 | 1,40 | 1,36 | 1,37 | 1,37 | 1,34 | 1,35 |
| C2-N1 | 1,40 | 1,37 | 1,38 | 1,40 | 1,36 | 1,38 | 1,38 | 1,35 | 1,35 | 1,35 |
| N1-C10 | 1,38 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,35 | 1,35 |

A4. Distâncias medidas entre os átomos dos anéis da isoaloxazina do FAD em SOX.

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1JR8 | | 2HJ3 | | 1JRA | | | | 3W4Y | | | 4E0H | 3O55 |
| N10-C9A | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,38 |
| C9A-C5X | 1,48 | 1,48 | 1,49 | 1,49 | 1,48 | 1,48 | 1,49 | 1,49 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,42 | 1,39 |
| C5X-N5 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,39 |
| N5-C4X | 1,43 | 1,43 | 1,44 | 1,44 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,44 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,37 | 1,38 |
| C4X-C10 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,39 | 1,40 |
| C10-N10 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,37 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,39 |
| C5X-C6 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,41 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 |
| C6-C7 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,43 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,41 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,42 |
| C7-C8 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,40 | 1,40 | 1,41 | 1,40 | 1,39 |
| C8-C9 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,38 |
| C9-C9A | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 |
| C4X-C4 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,41 |
| C4-N3 | 1,42 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,38 |
| N3-C2 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,39 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,38 |
| N1-C10 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,37 | 1,37 | 1,38 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 3U2L | 3U2M | 3MBG | | | 4LDK | 1OQC | | | | 3TK0 |
| N10-C9A | 1,39 | 1,37 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 1,40 |
| C9A-C5X | 1,41 | 1,41 | 1,47 | 1,47 | 1,48 | 1,50 | 1,51 | 1,51 | 1,51 | 1,51 | 1,47 |
| C5X-N5 | 1,39 | 1,39 | 1,33 | 1,34 | 1,34 | 1,35 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,38 |
| N5-C4X | 1,38 | 1,38 | 1,36 | 1,36 | 1,36 | 1,38 | 1,44 | 1,43 | 1,44 | 1,43 | 1,35 |
| C4X-C10 | 1,41 | 1,38 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,38 | 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,41 |
| C10-N10 | 1,38 | 1,38 | 1,36 | 1,36 | 1,35 | 1,35 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,35 |
| C5X-C6 | 1,41 | 1,39 | 1,29 | 1,29 | 1,29 | 1,39 | 1,42 | 1,43 | 1,43 | 1,42 | 1,40 |
| C6-C7 | 1,42 | 1,40 | 1,29 | 1,29 | 1,29 | 1,41 | 1,44 | 1,44 | 1,44 | 1,44 | 1,40 |
| C7-C8 | 1,41 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,49 | 1,45 | 1,44 | 1,45 | 1,44 | 1,42 |
| C8-C9 | 1,39 | 1,38 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,47 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,42 | 1,40 |
| C9-C9A | 1,41 | 1,39 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,44 | 1,44 | 1,44 | 1,45 | 1,43 |
| C4X-C4 | 1,41 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,44 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,46 |
| C4-N3 | 1,37 | 1,36 | 1,34 | 1,35 | 1,35 | 1,34 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,32 |
| N3-C2 | 1,39 | 1,38 | 1,35 | 1,35 | 1,35 | 1,34 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,35 |
| C2-N1 | 1,40 | 1,39 | 1,37 | 1,37 | 1,36 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,37 |
| N1-C10 | 1,35 | 1,37 | 1,36 | 1,36 | 1,36 | 1,34 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,36 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 3R7C | | | | 3LLK | | | 3LLI | 3QCP | 3T58 | | | |
| N10-C9A | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,39 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,38 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 |
| C9A-C5X | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,48 | 1,48 | 1,48 | 1,48 | 1,39 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 |
| C5X-N5 | 1,39 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,37 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 |
| N5-C4X | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,38 | 1,44 | 1,43 | 1,44 | 1,44 |
| C4X-C10 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,38 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 |
| C10-N10 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,37 |
| C5X-C6 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,39 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,41 |
| C6-C7 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,39 | 1,43 | 1,42 | 1,43 | 1,43 |
| C7-C8 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,40 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 |
| C8-C9 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 |
| C9-C9A | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,38 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 |
| C4X-C4 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,39 | 1,38 |
| C4-N3 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,37 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,41 | 1,38 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 |
| N3-C2 | 1,38 | 1,39 | 1,37 | 1,37 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,38 |
| N1-C10 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 |

| Átomos | PDB-ID | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 3GWN | | 3P0K | 3TD7 | 3QZY | | 3GWL | |
| N10-C9A | 1,48 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,49 | 1,48 |
| C9A-C5X | 1,48 | 1,49 | 1,48 | 1,48 | 1,49 | 1,47 | 1,49 | 1,48 |
| C5X-N5 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,42 | 1,41 |
| N5-C4X | 1,43 | 1,43 | 1,44 | 1,45 | 1,45 | 1,44 | 1,43 | 1,43 |
| C4X-C10 | 1,43 | 1,43 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,42 | 1,43 | 1,43 |
| C10-N10 | 1,37 | 1,37 | 1,38 | 1,37 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,37 |
| C5X-C6 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,41 |
| C6-C7 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,43 | 1,44 | 1,42 | 1,42 |
| C7-C8 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,44 | 1,44 | 1,43 | 1,42 | 1,42 |
| C8-C9 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,39 | 1,40 | 1,40 | 1,40 |
| C9-C9A | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,41 | 1,42 | 1,41 | 1,41 |
| C4X-C4 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 |
| C4-N3 | 1,41 | 1,42 | 1,42 | 1,42 | 1,43 | 1,43 | 1,42 | 1,41 |
| N3-C2 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,39 | 1,40 | 1,39 | 1,39 | 1,39 |
| C2-N1 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,38 | 1,38 | 1,38 |
| N1-C10 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,38 | 1,39 | 1,39 | 1,38 | 1,37 |

A5. Distâncias S-FAD medidas nas estruturas do PDB com interações S(LP)- π .

| PDB ID | Resolução | d (S-FAD) | Tipo de interação | Centroide | |
|-------------|-----------|-----------|-------------------|------------|--|
| <u>3DK9</u> | 0,95 | 3,21 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3DK4</u> | 1,20 | 3,21 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3P0K</u> | 1,47 | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1JR8</u> | 1,50 | 3,49 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3GRS</u> | 1,54 | 3,29 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1ZK7</u> | 1,60 | 3,38 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>2EQ6</u> | 1,60 | 3,39 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,38 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1MO9</u> | 1,65 | 3,67 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,59 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2YQU</u> | 1,70 | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,29 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1FEC</u> | 1,70 | 3,40 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,25 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>2Q0K</u> | 1,70 | 3,10 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,13 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1GES</u> | 1,74 | 3,27 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,32 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3DGH</u> | 1,75 | 3,17 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,11 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3GWN</u> | 1,78 | 3,71 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,52 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2EQ7</u> | 1,80 | 3,27 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,27 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1OQC</u> | 1,80 | 3,32 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,44 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,30 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,39 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3M31</u> | 1,85 | 3,53 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3MBG</u> | 1,85 | 3,12 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,10 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,08 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4K8D</u> | 1,86 | 3,15 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1GER</u> | 1,86 | 3,25 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,28 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3URH</u> | 1,90 | 3,22 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,19 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1ZX9</u> | 1,90 | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2Q7V</u> | 1,90 | 3,25 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,29 | S-pi | Cm23 (U/P) | |

| | | | | |
|-------------|------|------|------|------------|
| <u>2QAE</u> | 1,90 | 3,28 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,32 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2WPF</u> | 1,90 | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,43 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,28 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>300H</u> | 1,90 | 3,17 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,18 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>1K4Q</u> | 1,90 | 3,36 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>2X8G</u> | 1,90 | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>3O55</u> | 1,90 | 3,41 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2X8H</u> | 1,90 | 3,08 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2EQ8</u> | 1,94 | 3,36 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,34 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,38 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,32 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>3LLK</u> | 2,00 | 3,68 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 2,95 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>3W4Y</u> | 2,00 | 3,24 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,24 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,23 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>1GRA</u> | 2,00 | 3,33 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>1JRA</u> | 2,00 | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,42 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,40 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,48 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>4E0H</u> | 2,00 | 3,34 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>3HYW</u> | 2,00 | 3,53 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,51 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,28 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,69 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>1FEB</u> | 2,00 | 3,22 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,23 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>1XAN</u> | 2,00 | 3,46 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>3LLI</u> | 2,05 | 3,37 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>1ZMD</u> | 2,08 | 3,25 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,25 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,21 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,21 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,19 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,24 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,12 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2EQ9</u> | 2,09 | 3,46 | S-pi | Ct36 (U) |

| | | | | |
|-------------|------|------|------|------------|
| - | | 3,39 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,42 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,41 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,35 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,51 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,44 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,64 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>3GWL</u> | 2,10 | 3,65 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,32 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>1TDE</u> | 2,10 | 3,10 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2WOI</u> | 2,10 | 3,73 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,46 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,31 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,54 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>2R9Z</u> | 2,10 | 3,23 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,17 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>1BWC</u> | 2,10 | 3,36 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2WPC</u> | 2,10 | 3,16 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,19 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,22 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,19 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2WPE</u> | 2,10 | 3,11 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,24 | S-pi | Ct36 (U) |
| - | | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,18 | S-pi | Ct36 (U) |
| <u>3QZY</u> | 2,14 | 3,13 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 2,93 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2C3D</u> | 2,15 | 3,97 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 4,07 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>4JQ9</u> | 2,17 | 3,41 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,40 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,51 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,35 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,38 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,38 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| <u>2F5Z</u> | 2,18 | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,35 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,39 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,41 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,47 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,52 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,37 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,50 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,41 | S-pi | Cm23 (U/P) |
| - | | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) |

| | | | | | |
|-------------|------|------|------|------------|------------|
| <u>2V6O</u> | 2,20 | 3,44 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3QFA</u> | 2,20 | 3,19 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,13 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1V59</u> | 2,20 | 3,41 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,37 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1FEA</u> | 2,20 | 3,26 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,11 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,33 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,22 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1RP4</u> | 2,20 | 3,52 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3LAD</u> | 2,20 | 3,15 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,40 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3TD7</u> | 2,21 | 3,24 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3SQP</u> | 2,21 | 3,18 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,18 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3DH9</u> | 2,25 | 3,46 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,57 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3DGZ</u> | 2,25 | 3,21 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3QCP</u> | 2,30 | 3,13 | S-pi | Ct26 (P) | Ct26 (P) |
| <u>2WBA</u> | 2,30 | 3,27 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,28 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1AOG</u> | 2,30 | 3,33 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,38 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1GRT</u> | 2,30 | 3,41 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>2X99</u> | 2,30 | 3,22 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3HYV</u> | 2,30 | 3,53 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,59 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 4,02 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,43 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,67 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3AHQ</u> | 2,35 | 3,47 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4J56</u> | 2,37 | 3,74 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,75 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,81 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,73 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1BZL</u> | 2,40 | 3,30 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,36 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3R7C</u> | 2,40 | 3,99 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 4,00 | S-pi | Ct26 (P) | Ct26 (P) |
| - | | 3,89 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,93 | S-pi | Cm12 (P/B) | Cm12 (P/B) |
| - | | 3,37 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 4,11 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2HQM</u> | 2,40 | 3,22 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,23 | S-pi | Ct36 (U) | |

| | | | | | |
|-------------|------|------|------|------------|----------|
| <u>2A8X</u> | 2,40 | 3,55 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,53 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4M52</u> | 2,40 | 3,43 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,49 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,37 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4GR1</u> | 2,40 | 3,39 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3ITJ</u> | 2,40 | 2,93 | S-pi | Ct26 (P) | Ct26 (P) |
| - | | 2,93 | S-pi | Ct26 (P) | Ct26 (P) |
| <u>5GRT</u> | 2,40 | 3,48 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>2NVK</u> | 2,40 | 3,34 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3RNM</u> | 2,40 | 3,34 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,46 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,30 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,43 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2TPR</u> | 2,40 | 3,20 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,26 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>1JEH</u> | 2,40 | 3,30 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,45 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>3II4</u> | 2,42 | 3,47 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,42 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3ISH</u> | 2,43 | 3,10 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,35 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,46 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1LVL</u> | 2,45 | 3,74 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>1VDC</u> | 2,50 | 3,08 | S-pi | Ct26 (P) | Ct26 (P) |
| <u>2WOV</u> | 2,50 | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,26 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,20 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,29 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>2RAB</u> | 2,50 | 3,36 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,39 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4J57</u> | 2,50 | 3,24 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,40 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2WP6</u> | 2,50 | 3,10 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,25 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,11 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,12 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>3GRT</u> | 2,50 | 3,19 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>4LA1</u> | 2,35 | 3,33 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| - | | 3,22 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>4LDK</u> | 2,04 | 3,56 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>4KPR</u> | 2,40 | 3,28 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,35 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,41 | S-pi | Ct36 (U) | |

| | | | | | |
|-------------|------|------|------|------------|--|
| - | | 3,40 | S-pi | Ct36 (U) | |
| <u>4NEV</u> | 2,50 | 3,42 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,27 | S-pi | Cm23 (U/P) | |
| <u>2HJ3</u> | 2,50 | 3,37 | S-pi | Ct36 (U) | |
| - | | 3,21 | S-pi | Ct36 (U) | |
| 226 | | | | | |
| S(LP)-pi | | | | | |
| média | | 3,36 | | | |
| máximo | | 4,11 | | | |
| mínimo | | 2,93 | | | |