

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Estudo Teórico de Mecanismos para a Etapa de Eliminação da Síntese
do 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato (EPSP) Catalisada pela EPSP**
*Sintase de *Oryza sativa**

Anivaldo Xavier de Souza

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo Teórico de Mecanismos para a Etapa de Eliminação da Síntese
do 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato (EPSP) Catalisada pela EPSP**
*Sintase de *Oryza sativa**

ANIVALDO XAVIER DE SOUZA

Sob a Orientação do professor

Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ

2008

547
S729e
T

Souza, Anivaldo Xavier de, 1959-
Estudo teórico de mecanismos para a
etapa de eliminação da síntese do 5-
Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato (EPSP)
sintase de *Oryza sativa* / Anivaldo Xavier
de Souza - 2009.
166 f. : il.

Orientador: Carlos Maurício Rabello de
Sant'Anna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Química.

Bibliografia: f. 143-148

1. Química orgânica - Teses. 2. Arroz -
Teses. 3. Fosfatos - Teses. I. Sant'Anna,
Carlos Maurício Rabello de, 1965-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Bibliotecário: _____ Data: ____/____/____

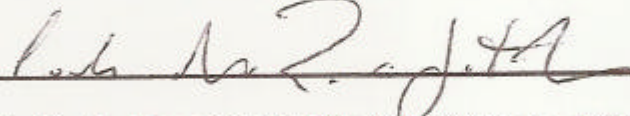
Estudo Teórico de Mecanismos para a Etapa de Eliminação da Síntese do 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato(EPSP) Catalisada pela EPSP Sintase de *Oryza sativa*

Autor

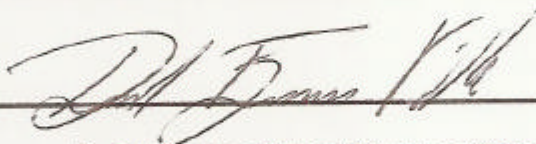
ANIVALDO XAVIER DE SOUZA

Tese submetida ao programa de Pós-graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.


TESE APROVADA PELA BANCA EM 17/10/2008



Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna – DEQUIM – UFRRJ



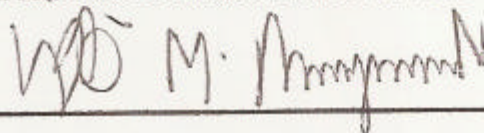
Prof. Dr. Jose Daniel Figueroa Villar – IME



Prof. Dra. Magaly Girão Albuquerque – IQ -UFRRJ



Prof. Dra. Clarissa Oliveira da Silva – DEQUIM – UFRRJ



Prof. Dr. Victor Marcos Rumjanek – DEQUIM – UFRRJ

Dedico esse trabalho de tese aos meus pais José e Dionísia, pelo esforço dedicado a minha educação; aos meus irmãos José Roberto, Edivaldo, Sueli e Marlene, como prova do meu carinho e amizade; a minha esposa Saraí e as minhas filhas Patrícia e Nathalia, pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela contribuição na minha formação acadêmica na graduação, pós-graduação e pelo desenvolvimento desse trabalho.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Maurício Rabelo de Sant'Anna, pela orientação, compreensão, amizade, confiança e contribuições devido a sua competência científica, durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial aqueles que foram meus professores nas disciplinas que cursei: Francisco, Mário, Clarissa, Carlos Maurício, Dari, Aurélio, Marcos Edílson, Victor, Vagner, Rosane, Áurea e João.

Aos colegas do Colégio Técnico da UFRRJ e, em especial, aos professores Délcio de Castro e Alencar Vicente Barbinotto, diretor atual e ex-diretor, respectivamente, pelo apoio e estímulo.

Aos alunos do PPGQ e, em especial aos colegas do Laboratório de Modelagem Molecular e de turma Rodney, Catarina, Wellison, Eliete, Quênia, Suzana, Daniel, Geraldo, Fabio e Cinthia pela amizade demonstrada através do incentivo e colaboração.

RESUMO

Na sexta etapa de reação da via do chiquimato, catalisada pela enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato sintase (EPSPS), o fosfoenolpiruvato (PEP) reage com o chiquimato-3-fostato (S3P) formando o produto 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP) com liberação de fosfato inorgânico. Como a rota do chiquimato está ausente em animais, mas é essencial para plantas e microorganismos, a enzima EPSPS tornou-se um alvo interessante para o desenvolvimento de herbicidas, fungicidas e bactericidas mais eficientes, ambientalmente mais seguros e econômicos. O herbicida mais usado no mundo, o glifosato, é um inibidor da EPSPS.

Estudos indicam que o mecanismo da síntese do EPSP é composto de uma etapa de adição, que forma um intermediário tetraédrico (IT), seguida de uma etapa de eliminação. Contudo, apesar de muito estudado, o mecanismo enzimático ainda não está completamente esclarecido porque resultados experimentais obtidos por diferentes grupos levam a conclusões contraditórias. Neste trabalho foi estudado o mecanismo da síntese do EPSP por métodos teóricos. Inicialmente, foi realizada uma avaliação do método semi-empírico PM3 para a previsão do estado de protonação de resíduos de histidinas e lisinas em enzimas, por comparação com os estados de protonação obtidos por difração de nêutrons. O método foi então aplicado para prever os estados de protonação de lisinas e histidinas localizadas no sítio ativo da EPSPS. Foi construído um modelo da EPSPS de uma planta, *Oryza sativa*, aplicando o método de modelagem por homologia. Foram usadas a sequência primária da EPSPS de *O. sativa* e duas estruturas cristalográficas da enzima de *Escherichia coli*, como moldes. Após a construção do modelo, foram feitas simulações computacionais da etapa de eliminação da reação envolvendo todos os aminoácidos e moléculas de água do sítio ativo, incluindo o efeito do solvente. Os resultados permitem concluir que o mecanismo mais provável para essa reação envolve a participação de um resíduo de lisina (Lys432) como catalisador ácido e de um resíduo de aspartato (Asp334), como catalisador básico da etapa de eliminação. Estudos realizados com uma fosforilidrazona sintetizada por nosso grupo, e que apresentou atividade inibitória para o crescimento de sementes, indicam que esse composto interagiria de modo bastante favorável com o sítio ativo da EPSPS de *O. sativa*.

Palavras chaves: EPSP sintase, cálculo semi-empírico, *Oryza sativa*, mecanismo de eliminação

ABSTRACT

In the sixth step of the shikimate pathway, catalyzed by 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), phosphoenolpyruvyl (PEP) reacts with shikimate-3-phosphate (S3P) to produce 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) and inorganic phosphate. Because the shikimate pathway is absent in animals, but is essential for plants and microorganisms, EPSPS is an interesting target for the development of efficient and safer herbicides, fungicides and bactericides. The most used herbicide in the world, glyphosate, is an EPSPS inhibitor.

Literature results indicate that the EPSPS-catalyzed mechanism is composed by an addition step, which leads to a tetrahedral intermediate (TI), followed by an elimination step. However, the enzymatic mechanism is not completely understood, because experimental data obtained by different groups lead to conflicting results. In the present work, the EPSPS-catalyzed reaction was studied by theoretical methods. First, an evaluation of the semiempirical method PM3 as a tool for the assignment of protonation states of histidine and lysine residues in enzymes was implemented by comparison with neutron diffraction data. The method was then applied for the assignment of lysine and histidine protonation states in EPSPS. Next, a model of the EPSPS of a plant, *Oryza sativa*, was constructed by means of homology modeling. The model was constructed based on the primary sequence of *O. sativa* EPSPS with two *Escherichia coli* EPSPS crystallographic structures as templates. After model construction, computational simulations of the elimination step were implemented with all active site aminoacid residues and water molecules, including the solvent effect. The results are indicative that the most probable mechanism for this reaction step involves the participation of a lysine residue (Lys432) as an acid catalyst and also of an aspartate residue (Asp334), as a basic catalyst. Additional studies with a phosphorylhydrazone synthesized by our group, which presented inhibitory activity for seed development, are indicative that the compound could interact very favorably with the *O. sativa* EPSPS active site.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
ÌNDICE DE FIGURAS	11
ÌNDICE DE TABELAS	17
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	18
1- INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. A VIA DO CHIQUIMATO.....	21
2.2. A SEXTA ETAPA DA VIA DO CHIQUIMATO	25
2.2.1. COMPLEXOS PEP-ENZIMA E S3P-PEP-ENZIMA	25
2.2.2. MECANISMO DE ADIÇÃO-ELIMINAÇÃO	27
2.3. INTERAÇÃO DO GLIFOSATO COM O SÍTIO ATIVO DA EPSPS	31
2.4. PROPOSTAS RECENTES SOBRE O MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O S3P E O PEP CATALISADA PELA EPSPS.....	33
2.4.1. PROPOSTA DE MECANISMO 1	34
2.4.2. PROPOSTA DE MECANISMO 2	36
2.4.3. PROPOSTA DE MECANISMO 3 (AUTO-CATÁLISE).....	37
2.4.4. PROPOSTA DE MECANISMO 4	39
2.5. COMPARAÇÃO DOS MECANISMOS PROPOSTOS.....	41
3. OBJETIVOS	43
4. METODOLOGIA.....	45
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PM3 PARA ESTUDAR OS ESTADOS DE PROTONAÇÃO EM ENZIMAS	46

4.3. AVALIAÇÃO DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS DO SÍTIO ATIVO.....	47
4.4. CONSTRUÇÃO DO MODELO DA ENZIMA EPSPS DE <i>Oryza sativa</i>	49
4.5. METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O S3P E O PEP CATALISADA PELA EPSPS DE ORYZA SATIVA.....	51
4.5.1. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE BÁSICA DIRETA.....	53
4.5.2. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE BÁSICA INDIRETA	54
4.5.3. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE ÁCIDA E COM CATÁLISE BÁSICA DIRETA	55
4.5.4. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE ÁCIDA E COM CATÁLISE BÁSICA INDIRETA.....	56
4.6. INTERAÇÃO DE DIISOBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA E DIBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA COM A EPSPS DE ORYZA SATIVA.....	58
4.7. MÉTODOS DE CÁLCULO	60
4.7.1. A EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER	60
4.7.2. UM SISTEMA DE M NÚCLEOS E N ELÉTRONS.....	61
4.7.3. APROXIMAÇÃO DE BORN-OPPENHEIMER	62
4.7.4. DETERMINANTE DE SLATER.....	63
4.7.5. A EQUAÇÃO DE HARTREE-FOCK.....	66
4.7.6. EQUAÇÃO DE HARTREE-FOCK PARA CAMADAS FECHADAS	68
4.7.7. MÉTODO DA COMBINAÇÃO LINEAR DE ORBITAIS ATÔMICOS (LCAO)	70
4.7.8. MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS.....	75
4.7.9. MÉTODO DE ESCALONAMENTO LINEAR MOZYME.....	79
4.7.10. O MODELO DE EFEITO DE SOLVENTE COSMO	80
5. RESULTADOS	82
5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	82

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PM3 PARA AVALIAR ESTADOS DE PROTONAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM ENZIMAS	83
5.3. AVALIAÇÃO DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS DO SÍTIO ATIVO.....	86
5.4. MODELO POR HOMOLOGIA DA ENZIMA EPSPS DE <i>Oryza sativa</i>	92
5.5. MECANISMOS DE REAÇÃO	93
5.5.1. GLU362 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	94
5.5.2. ASP334 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	100
5.5.3. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E GLU362 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	106
5.5.4. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E ASP334 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	113
5.5.5. ASP334 ATUANDO COMO CATALISADOR BÁSICO INDIRETO NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	119
5.5.6. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E DO ASP334 ATUANDO COMO BASE INDIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO	127
5.5.7. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DOS MECANISMOS DE REAÇÃO	135
5.6. INTERAÇÃO DO DIBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA E DO DIISOBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA COM A EPSPS DE O. SATIVA.....	138
6. CONCLUSÕES	141
7. PERSPECTIVAS	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
APÊNDICE A.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema simplificado com as sete etapas principais da via do chiquimato. Cada etapa é catalisada por uma enzima específica.....	23
Figura 2.2. Esquema simplificado da biossíntese de produtos tendo como precursor o corismato.....	24
Figura 2.3. Esquema da reação entre o PEP e S3P, catalisada pela EPSPS, com formação do complexo PEP-enzima e mais dois intermediários (STUDELSKA <i>et al.</i> , 1997).....	26
Figura 2.4. Esquema da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS (LEVIN e SPRINSO, 1964).....	27
Figura 2.5. Mostra uma adição synperiplanar na primeira etapa e antiperiplanar na segunda etapa.....	28
Figura 2.6. Estrutura do sítio ativo da mutante Asp313Ala da EPSPS de <i>E. coli</i> complexada ao IT, obtida por cristalografia de raios-X (ESCHENBURG <i>et al.</i> , 2003). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza e as cores vermelha, azul, cinza e amarela correspondem aos átomos de oxigênio, nitrogênios, carbono e fósforo, respectivamente.	30
Figura 2.7. Estrutura do glifosato (<i>N</i> -(fosfonometil)glicina).....	31
Figura 2.8. Recorte da estrutura cristalográfica 1G6S mostrando os aminoácidos mais próximos do S3P e do glifosato (SCHÖNBRUNN <i>et al.</i> , 2001). Os hidrogênios foram omitidos para maior clareza e as cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.	32
Figura 2.9 Mecanismo da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS, segundo proposto por Schönbrunn e colaboradores (SCHÖNBRUNN <i>et al.</i> , 2001).	35
Figura 2.10 Esquema da proposta de Mizyed e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS (MIZYED <i>et al.</i> , 2003).	37
Figura 2.11 Esquema da proposta de An e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS (AN <i>et al.</i> , 2003).	38
Figura 2.12. Descrição da participação do resíduo Asp313 na etapa de eliminação, atuando como base indireta por um processo <i>antiperiplanar</i> (ESCHENBURG <i>et al.</i> , 2003).....	39
Figura 2.13. Proposta de Eschenburg e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS (ESCHENBURG <i>et al.</i> , 2003).	40

Figura 4.1. Recorte do modelo de homologia obtido a partir da sequência de aminoácidos da EPSPS de <i>Oryza sativa</i> , contendo o intermediário tetraédrico (em amarelo). Átomos de H foram omitidos para maior clareza. Átomos de C: verde; átomos de O: vermelho; átomos de N: azul.	50
Figura 4.2. Intermediário tetraédrico (IT) e os resíduos de aminoácidos Glu362, Asp334, Lys26, Lys432 e Lys361; que são os possíveis catalisadores que atuam na reação entre o S3P e o PEP. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.	52
Figura 4.3. Esquema da reação na etapa de eliminação, onde uma base abstrai um próton da metila do IT provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.	53
Figura 4.4. Esquema da reação na etapa de eliminação, onde uma base abstrai um próton da hidroxila ligada ao carbono 4 do fragmento do S3P. A seguir, o átomo de oxigênio desprotonado abstrai um próton da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.	54
Figura 4.5. Esquema da reação na etapa de eliminação onde um ácido doa um próton para um átomo de oxigênio do fosfato enquanto uma base abstrai um próton da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.	55
Figura 4.6. Esquema da reação na etapa de eliminação onde um ácido doa um próton para um oxigênio do fosfato, enquanto uma base abstrai um próton da hidroxila ligada ao carbono 4 do fragmento do S3P do intermediário tetraédrico. O átomo de oxigênio desprotonado abstrai um átomo de hidrogênio da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.	56
Figura 4.7. Estruturas das fosforilidrazonas 1 e 2 sintetizadas e testadas como inibidores de germinação por nosso grupo (NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2007). Os átomos de hidrogênio foram omitidos.	58
Figura 5.1 Intermediário tetraédrico (IT) e as distâncias importantes na definição do estado de protonação que melhor representa a estrutura nativa observada experimentalmente.	87
Figura 5.2 Superposição da estrutura cristalográfica (átomos de C em verde) e dos modelos 15 (átomos de C em magenta) e 16 (átomos de C em ciano), destacando o intermediário tetraédrico e os resíduos Arg386, Thr412 e His385.	90
Figura 5.3 Gráfico de Ramachandran do modelo homólogo da <i>O. sativa</i> . As cruzes em ciano e verde representam resíduos localizados nas sequências de inserção.	92

Figura 5.4 Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Glu362 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> ; os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.....	94
Figura 5.5 Descrição do mecanismo estudado, com Glu362 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	95
Figura 5.6 Superfície da entalpia de reação, com Glu362 atuando como uma catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	96
Figura 5.7 Superfície com os contornos de entalpia da reação, com Glu362 atuando como um catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	97
Figura 5.8 Cargas do carbono C2' (em vermelho) e do oxigênio ligado ao carbono C5 (O5) em função da distância d_2 ; neste gráfico, o valor de d_1 foi mantido fixo em 1,09 Å.	98
Figura 5.9 Mecanismo proposto da reação com Glu362 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	99
Figura 5.10 Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Asp334 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> . Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.....	100
Figura 5.11 Descrição do mecanismo estudado, com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	101
Figura 5.12 Superfície da entalpia de reação referente ao mecanismo com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	102
Figura 5.13 Superfície com os contornos de entalpia referente ao mecanismo com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	103
Figura 5.14. Cargas do átomos C1' (azul), C2' (preto) e C3' (vermelho); do oxigênio que liga o grupo fosfato a C2' (ciano) e do oxigênio ligado aos átomos C2' e C5 (verde) em função da distância d_1 . Distância d_2 está fixa em 1,38 Å	104
Figura 5.15 Mecanismo proposto da reação com Asp334 atuando como uma base na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.	105
Figura 5.16 Posição do intermediário tetraédrico (IT), dos resíduos Glu362 e Lys432 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> . Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo. ...	106

Figura 5.17 Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica de Glu362.....	107
Figura 5.18 Calor de formação relativo calculado em função da distância d_1	108
Figura 5.19 Superfície de entalpia relativa, referente ao mecanismo mecanismo com Glu362 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.	109
Figura 5.20. Superfície com os contornos de entalpia, referente ao mecanismo com Glu362 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.	110
Figura 5.21. Evoluções das cargas dos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde); do átomo de oxigênio que liga o grupo fosfato a C2' (ciano) e do oxigênio ligado a C2' e a C5 (preto) em função da distância d_2 (distância d_3 fixa em 1,38 Å).	111
Figura 5.22. Esquema proposto com 3 etapas para o mecanismo de eliminação, com as participações de Lys432 atuando como catalisador ácido e Glu362 atuando como catalisador básico.	112
Figura 5.23. Posição do intermediário tetraédrico (IT), de Asp334 e de Lys432 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> . Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.	113
Figura 5.24. Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica de Asp334.	114
Figura 5.25. Superfície de entalpia relativa, com Asp334 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.	115
Figura 5.26. Superfície com os contornos de entalpia, com Asp334 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.....	116
Figura 5.27. Evolução das cargas nos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde) e do oxigênio ligado a C2' e a C5 (preto) em função da distância d_3 . A distância d_2 está fixa em 1,10 Å.....	117
Figura 5.28. Esquema com as três etapas propostas para a reação de eliminação, sugeridas após avaliação dos resultados, com as participações de Lys432 atuando como catalisador ácido e de Asp334 atuando como catalisador básico.....	118

Figura 5.29. Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Asp334 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> . Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.	119
Figura 5.30. Proposta de reação, onde o resíduo Asp334 desprotona o grupo OH ligado a C4. O átomo de oxigênio desprotonado abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do produto EPSP (ESCHENBURG <i>et al.</i> , 2003).	120
Figura 5.31. Valores de calor de formação relativo em função da distância d_1	121
Figura 5.32. Superfície de entalpia do mecanismo com o Asp334 atuando como uma base indireta, construída em função das distâncias d_2 e d_3	122
Figura 5.33. Superfície com os contornos de entalpia referente ao mecanismo com o Asp334 atuando como base indireta, construída em função das distâncias d_2 e d_3	123
Figura 5.34. Evolução da carga em função da distância d_2 , para o átomo de oxigênio ligado ao carbono C4 (curva em preto), de C3' (curva em vermelho) e de C2' (curva em verde). A distância d_3 está fixa em 1,42 Å.	124
Figura 5.35. Evolução da carga do átomo C3', em preto, e do átomo C2', em vermelho, em função da distância d_3 e com a distância d_2 fixada em 2,29 Å.	125
Figura 5.36. Esquema proposto com 3 etapas para o mecanismo de eliminação, com a participação indireta do resíduo Asp334, inicialmente abstraindo o hidrogênio ligado a hidroxila do carbono C4.	126
Figura 5.37. Representação do IT e dos resíduos Asp334 e Lys432 no modelo da EPSPS de <i>O. sativa</i> . Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.	127
Figura 5.38. Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica indireta de Asp334.	128
Figura 5.39. Primeira parte da superfície de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, construída em função das distâncias d_1 e d_2	129
Figura 5.40. Primeira parte da superfície com os contornos de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_1 e d_2	130

Figura 5.41. Evolução das cargas dos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde) do oxigênio ligado a C2' e C5 (preto) em função da distância d_2 e com a distância d_1 fixa em 2,23 Å.....	131
Figura 5.42. Segunda parte da superfície de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_3 e d_4	132
Figura 5.43. Contornos de entalpia da segunda parte do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_3 e d_4	133
Figura 5.44. Esquema com as quatro etapas propostas, para a reação de eliminação, construídas após a avaliação dos resultados, com Lys432 atuando como catalisador ácido e do Asp334 atuando como catalisador básico indireto.....	134
Figura 5.45. Sobreposição dos complexos formados entre os aminoácidos do sítio ativo da EPSPS de <i>O. sativa</i> e o IT e o composto 1, após otimização (método PM3). Átomos de H foram omitidos para maior clareza. Átomos de C: cinza (aminoácidos no complexo EPSPS/1), ciano (aminoácidos no complexo EPSPS/IT), rosa (1), verde (IT); átomos de O: vermelho; átomos de N: azul; átomos de P: laranja; átomos de S: amarelo.	138
Figura 5.46. Descrição das ligações hidrogênio formadas com aminoácidos do sítio ativo, após otimização do composto 1 no interior da EPSPS de <i>O. sativa</i>	139

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1 Propostas para a reação entre o S3P e o PEP com os respectivos aminoácidos que atuam nas etapas de adição e eliminação.....	41
Tabela 5.1 Comparação dos dados das estruturas otimizadas (método PM3) com os resultados de difração de nêutrons (estrutura 2GEV depositada no PDB)	83
Tabela 5.2 Comparação dos dados das estruturas otimizadas (método PM3) com os resultados de difração de nêutrons (estrutura 1NTP depositada no PDB)	85
Tabela 5.3 Modelos com as respectivas permutações dos estados de protonação dos resíduos His385, Lys22, Lys340 e Lys411 e as distâncias d_1 , d_2 , d_3 , d_4 , d_5 , e d_6 usadas para avaliar os estados de protonação da estrutura cristalográfica da EPSPS de <i>E. coli</i>	88
Tabela 5.4 Mecanismos simulados, as etapas e as respectivas barreiras de entalpia.	135

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PEP	Fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate)
S3P	Chiquimato-3-fosfato (Shikimate-3-phosphate)
EPSP	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate)
EPSPS	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
PM3	Parametric Method 3
AM1	Austin Model 1
IT	Intermediário tetraédrico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
COSMO	Conductor-like Screening Model
Å	Angstrom
RMN	Resonância Magnética Nuclear

1- INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas, com atividade dentro ou fora da célula, fundamentais para o metabolismo porque catalisam reações que levariam um tempo muito grande para acontecer. Elas têm como função baixar a energia de ativação de uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo adequado dos seres vivos.

As reações químicas do metabolismo catalisadas por enzimas são organizadas em vias metabólicas. Estas vias metabólicas são seqüências de reações em que o produto de uma reação é o reagente da reação seguinte.

Uma importante via metabólica de plantas, fungos, bactérias e algas é a via do ácido chiquímico ou via do chiquimato, que foi descrita por Davis e Sprinson (DAVIS, 1953; SPRINSON,1960). Esta rota biossintética é importante porque nela surgem compostos aromáticos através do metabolismo de carboidratos. A via do chiquimato é dividida em sete etapas principais, sendo cada etapa catalisada por uma enzima diferente. Os mecanismos de reação dessas etapas ainda não foram completamente elucidados.

Do ponto de vista prático, a sexta etapa da via do chiquimato apresenta grande importância. Nesta etapa de reação, o fosfoenolpiruvato (PEP) reage com o chiquimato-3-fosfato (S3P) formando o produto 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP), com liberação de fosfato inorgânico. Esta etapa de reação é catalisada pela enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato sintase (EPSPS). Como a rota do chiquimato está ausente em animais, mas é essencial para plantas e microorganismos, a enzima EPSPS tornou-se um alvo interessante para o desenvolvimento de herbicidas, fungicidas e bactericidas eficientes e, também, ambientalmente mais seguros. O produto comercial *N*-(fosfometil)glicina (glifosato) é o composto ativo de várias formulações herbicidas comerciais, que atua inibindo a enzima EPSPS. A propriedade herbicida dessa substância foi descoberta pela Monsanto em 1970 e a

primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de *Roundup*. Hoje, ela é utilizada em mais de 130 países, incluindo o Brasil, sendo aplicada para controle de plantas competidoras nas áreas agrícolas, industriais, florestais, residenciais e ambientes aquáticos, de acordo com os registros obtidos em cada país.

Através do estudo do mecanismo de reação entre S3P e o PEP, um dos objetivos desse trabalho é contribuir com a elucidação do mecanismo de reação da sexta etapa da via do chiquimato. Conhecendo-se detalhes do mecanismo de reação, pretende-se facilitar o planejamento de novos inibidores para essa enzima. Esse estudo foi realizado inicialmente com a determinação dos estados de protonação de alguns aminoácidos básicos situados a 6 Å de distância do intermediário tetraédrico da EPSPS. Essa parte do trabalho foi realizada utilizando a estrutura cristalográfica da EPSPS de *Escherichia coli*, obtida por raios-X, depositada no “*Protein Data Bank*” com o código 1Q36.

A segunda parte desse trabalho foi a construção de um modelo da EPSPS de uma espécie vegetal, *Oryza sativa*. Esse modelo homólogo foi construído através da sequência de aminoácidos de *O. sativa* e da estrutura cristalográfica da EPSPS de *E. Coli*. Os resultados obtidos com os estudos dos estados de protonação de alguns resíduos básico da *E. coli* foram utilizados na definição dos estados de protonação dos aminoácidos correspondentes desse modelo. O modelo construído foi utilizado para simular possíveis mecanismos da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*. Nas simulações, foi usado o método de orbital molecular semi-empírico PM3 com efeito de solvente. Os resultados foram analisados através de comparações de comprimentos de ligações, densidade eletrônica e análise do calor de formação através de superfícies e curvas de energia potencial em função das coordenadas de reação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A VIA DO CHIQUIMATO

A via metabólica do ácido chiquímico ou chiquimato, descrita por Davis e Sprinson, está presente em plantas, fungos, bactérias e algas. Usando essa rota biossintética, esses organismos produzem compostos aromáticos através do metabolismo de carboidratos (DAVIS, 1953; SPRINSON, 1960).

Os reagentes de partida dessa rota biossintética são a eritrose-4-fosfato e o fosfoenolpiruvato, que são convertidos em corismato através de uma seqüência de reações químicas que são divididas em sete passos ou etapas principais (BENTLEY, 1990; ROBERTS *et al.*, 1998). Cada uma dessas etapas é catalisada por uma enzima diferente. A Figura 2.1 mostra um esquema simplificado da via do chiquimato.

A primeira etapa da via do chiquimato é a reação da eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato (PEP) formando o produto 3-desóxi-*D*-arabino-heptulose-7-fosfato com liberação de fosfato inorgânico. Esta reação é catalisada pela enzima 3-desóxi-*D*-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS) (FLOSS *et al.*, 1972).

A seguir, na segunda etapa, o 3-desóxi-*D*-arabino-heptulose-7-fosfato sofre um processo de ciclização liberando fosfato inorgânico e formando o produto 3-desidroquinato, catalisado pela enzima 3-desidroquinato sintase (BENDER *et al.*, 1989).

Na terceira etapa, o 3-desidroquinato sofre desidratação catalisada pela enzima 3-desidroquinato sintase, formando o 3-desidrochiquimato (GOURLEY, 1999).

Na quarta etapa, numa reação de redução, envolvendo uma molécula de NADPH, catalisada pela enzima chiquimato desidrogenase, o 3-desidrochiquimato forma o produto chiquimato (BENACH *et al.* 2003).

Na quinta etapa, um grupo fosfato é adicionado à posição 3 do chiquimato, formando o chiquimato-3-fosfato, sob catálise da enzima chiquimato quinase (MORELL e SPRINSON, 1968).

Na sexta etapa, o chiquimato-3-fosfato (S3P) reage com uma segunda molécula de fosfoenolpiruvato, formando o produto 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato, reação catalisada pela enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), com perda de fosfato inorgânico (LEWIS *et al.*, 1999; JAKEMAN *et al.*, 1998).

Na sétima e última etapa, o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sofre uma reação, catalisada pela enzima corismato sintase, formando o corismato e liberando fosfato inorgânico (BORNEMANN *et al.*, 1996; OSBORNE *et al.*, 2000; BORNEMANN *et al.*, 2000).

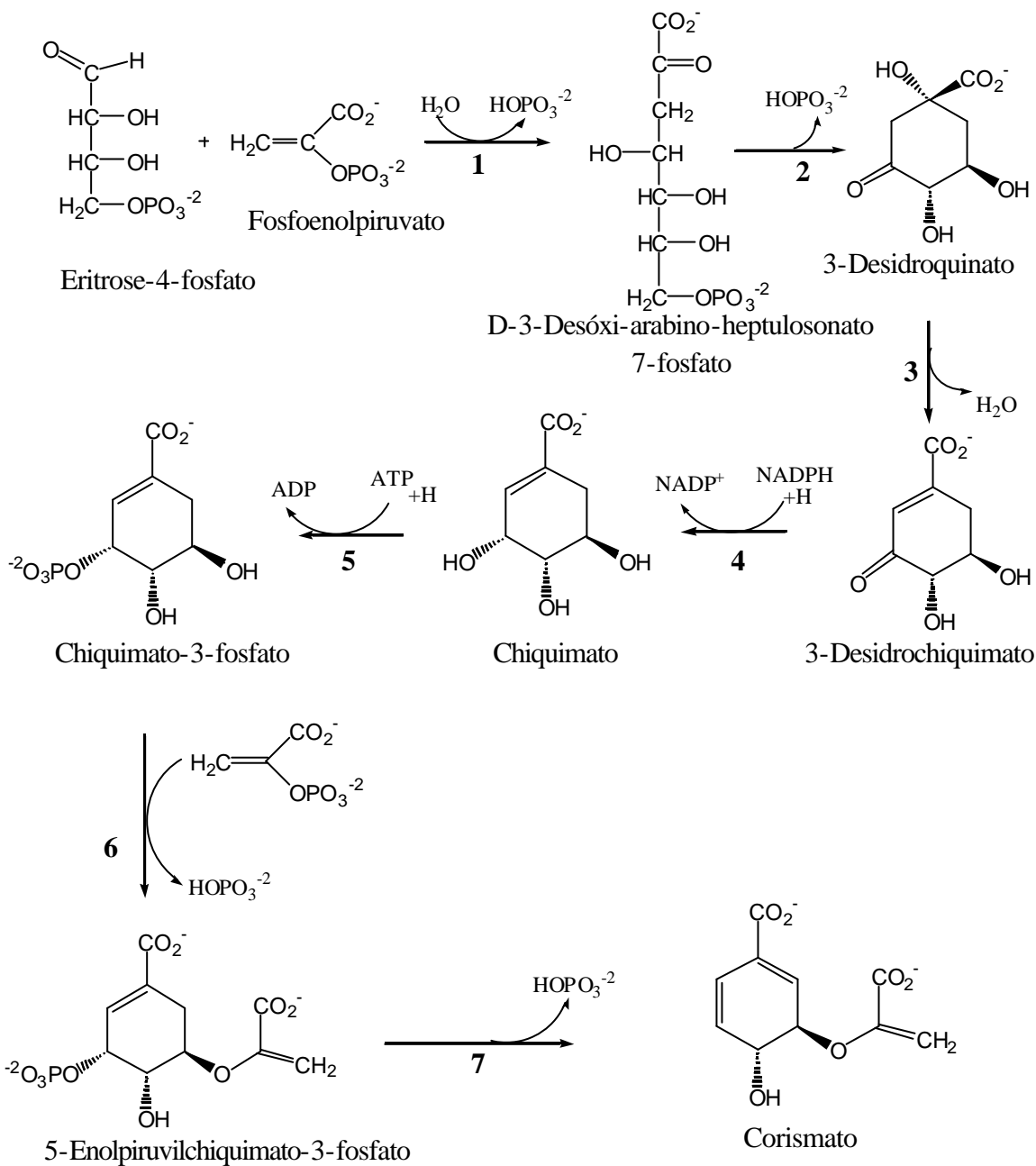


Figura 2.1. Esquema simplificado com as sete etapas principais da via do chiquimato. Cada etapa é catalisada por uma enzima específica.

O corismato é precursor de isocorismato, pufenato e antranilato (DAHM, 1998; VAN TEGELEN *et al.*, 1999). O isocorimato é o precursor da biossíntese de vitamina K. O pufenato é o precursor na biossíntese de fenilalanina e tirosina. A fenilalanina e a tirosina são os precursores na biossíntese de fenilpropanóides e alcalóides isoquinolínicos, respectivamente. O antranilato é o precursor na biossíntese de triptofano e alcalóides indólicos. A Figura 2.2 mostra um esquema simplificado da biossíntese de produtos obtidos a partir do corismato.

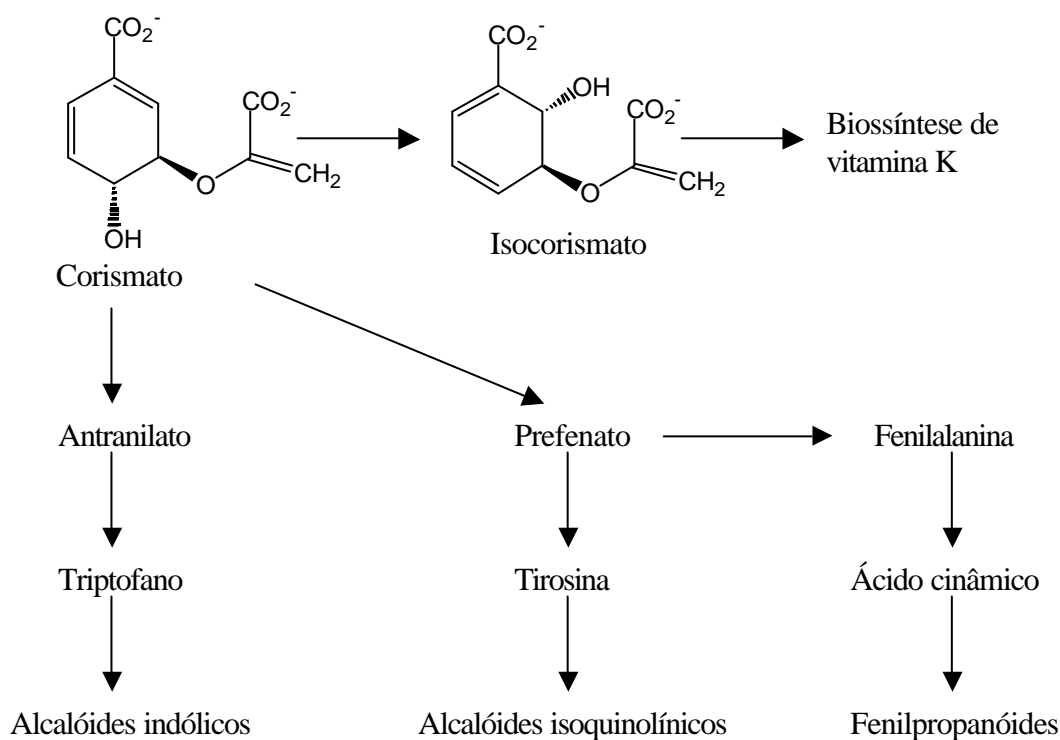


Figura 2.2. Esquema simplificado da biossíntese de produtos tendo como precursor o corismato.

Como pode ser observado no esquema da Figura 2.2, a via do chiquimato é a rota biossintética para obtenção de triptofano, tirosina, fenilalanina e vitamina K. Estes aminoácidos e a vitamina K são essenciais para a sobrevivência de plantas e microorganismos. Como esta rota está ausente em animais, ela é um alvo importante para o desenvolvimento de agentes com propriedades herbicidas, fungicidas e bactericidas.

2.2. A SEXTA ETAPA DA VIA DO CHIQUIMATO

A sexta etapa da via do chiquimato, objeto deste estudo, é catalisada pela enzima EPSPS. Na primeira proposta mecanística para esta reação, foram sugeridas duas etapas, uma adição e uma eliminação. Nessa proposta, na etapa de adição, o S3P liga-se ao PEP, formando um intermediário tetraédrico (IT) e, a seguir, ocorre a formação do produto EPSP com eliminação de fosfato inorgânico (LEVIN e SPRINSO, 1964; BONDINELL *et al.*, 1971).

Outra proposta sugere dois intermediários, sendo um deles formado pelo PEP ligado a um resíduo de aminoácido da enzima, e o outro formado pelo S3P ligado ao PEP e a um resíduo de aminoácido da enzima (STUDELSKA *et al.*, 1997). Estas duas propostas são apresentadas em detalhes nas próximas seções.

2.2.1. COMPLEXOS PEP-ENZIMA E S3P-PEP-ENZIMA

A enzima UDP-*N*-acetilglicosamina enolpiruvil transferase (MurA) é da mesma família da EPSPS e catalisa a reação entre o PEP e a UDP-*N*-acetilglicosamina (UNAG), formando o produto enolpiruvil-UDP-*N*-acetilglicosamina (EP-UNAG). O produto EP-UNAG é o precursor de peptideoglicano, um polímero formador da parede celular de bactérias. Zemel e Anwar isolaram um intermediário dessa reação que propuseram como sendo o complexo PEP-UNAG-enzima (ZEMELL e ANWAR, 1975). Como a enzima MurA é da mesma família da EPSPS, foi sugerido que a reação entre o S3P e o PEP, catalisada pela EPSPS, também formaria um intermediário semelhante, constituído pelo complexo S3P-PEP-enzima.

Anton e colaboradores, em um trabalho onde fizeram reagir PEP e 4,5-didesoxichiquimato-3-fosfato (ddS3P) na presença de solvente marcado com trítio, notaram

que o trítio se incorporava ao PEP (ANTON *et al.*, 1983). Isso foi interpretado como indicativo de que um nucleófilo na enzima estava envolvido na catálise da formação da metila a partir do metileno do PEP, permitindo a troca de átomos de hidrogênio (ou trítio) do solvente, o que estava de acordo com a proposta de formação de um complexo PEP-enzima (ANTON *et al.*, 1983).

Baseado na interpretação de dados de RMN no estado sólido, Studelska e colaboradores propuseram um mecanismo para a reação entre o PEP e o S3P, catalisada pela EPSPS, em que o produto EPSP é formado após quatro etapas, mostradas na Figura 2.3 (STUDELSKA *et al.*, 1997).

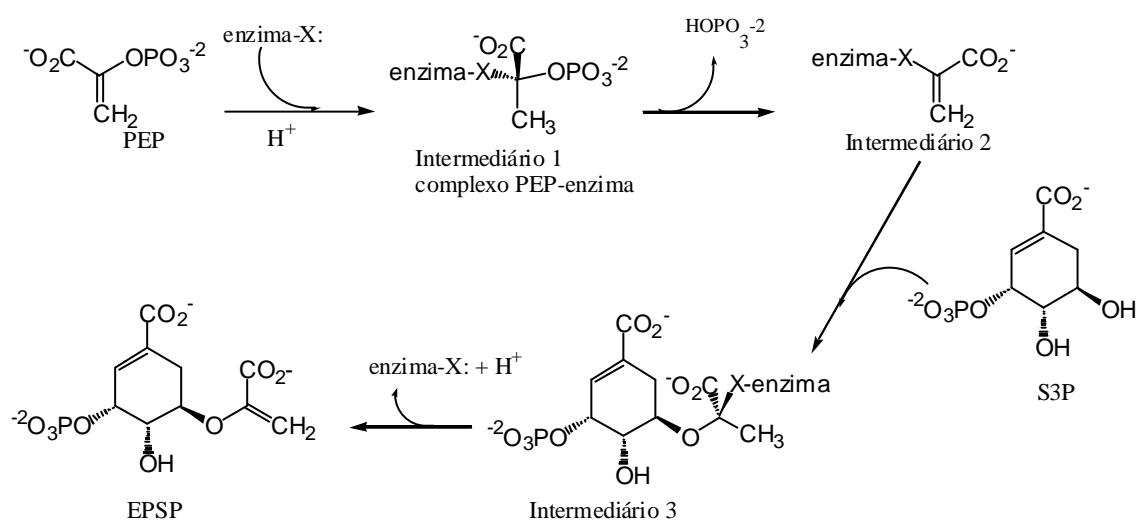


Figura 2.3. Esquema da reação entre o PEP e S3P, catalisada pela EPSPS, com formação do complexo PEP-enzima e mais dois intermediários (STUDELSKA *et al.*, 1997).

Entretanto, Jakeman e colaboradores argumentaram que o método usado por Studelska e colaboradores não era capaz de determinar o caminho de uma reação enzimática porque os supostos intermediários identificados não se convertiam em produtos, sendo portanto artefatos resultantes das condições experimentais (JAKEMAN *et al.*, 1998). Outros trabalhos não haviam conseguido identificar a formação dos complexos S3P-PEP-enzima e PEP-enzima na

presença de ddS3P e indicaram que a enzima se liga ao PEP apenas na ausência do S3P (BARLOW *et al.*, 1989; REAM *et al.*, 1992). Isso levou à conclusão de que não havia provas sobre a formação desses complexos, enfraquecendo o mecanismo proposto por Anton e colaboradores.

2.2.2. MECANISMO DE ADIÇÃO-ELIMINAÇÃO

A primeira proposta mecanística da reação que ocorre na sexta etapa da via do chiquimato foi postulada por Levin e Sprinso (LEVIN e SPRINSO, 1964). Nesta a reação entre o S3P e o PEP, catalisada pela EPSPS, ocorre via mecanismo de adição-eliminação. Na etapa de adição, o átomo de oxigênio do fosfato causa polarização, favorecendo a protonação do carbono β do PEP. Este processo é associado a um ataque nucleofílico da hidroxila ligada ao carbono 5 do S3P ao carbono α do PEP, levando à formação do IT. Na etapa de eliminação, a metila do IT formado perde um próton e um grupo fosfato, restaurando a ligação dupla. A Figura 2.4 mostra um esquema dessa proposta.

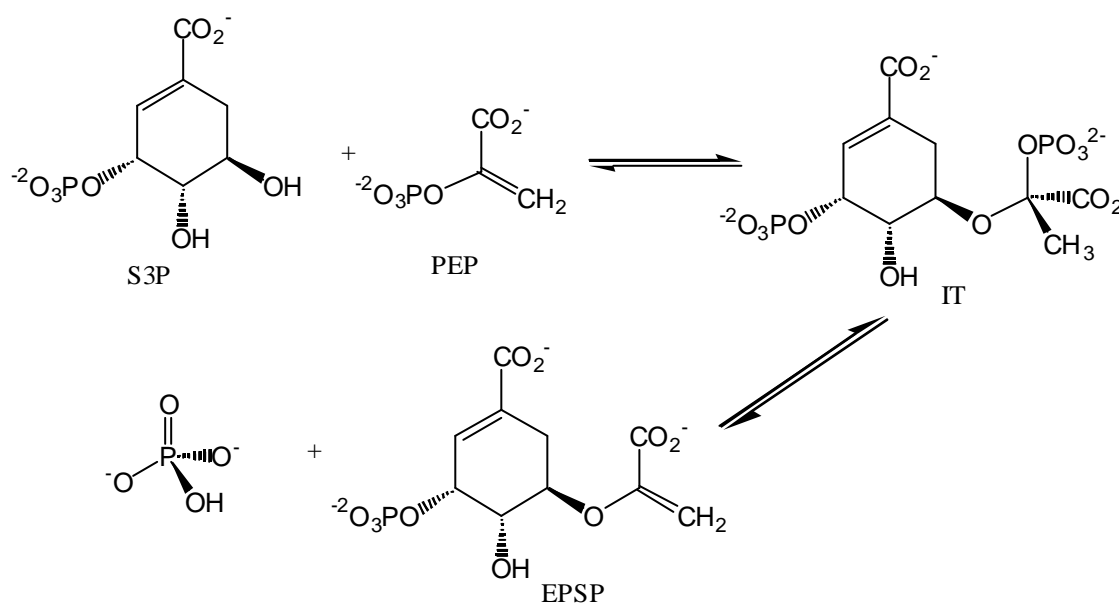


Figura 2.4. Esquema da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS (LEVIN e SPRINSO, 1964).

A primeira evidência experimental que apoia a proposta de Levin e Sprinso (1964) é uma reação entre S3P e PEP, em um meio com água deuterada, catalisada pela EPSPS isolada de *Salmonella*, que ocorre segundo um processo de adição-eliminação com formação de um IT (BONDINELLI *et al.*, 1971).

Grimshaw e colaboradores fizeram reagir S3P com PEP em água marcada com deutério e trítio; S3P com PEP marcado com deutério e trítio em água; S3P com PEP marcado com deutério e trítio, reações catalisadas pela EPSPS de *Aerobacter aerogenes* (GRIMSHAW *et al.*, 1982; GRIMSHAW *et al.*, 1984). Os resultados obtidos também apontam para um IT.

A dupla ligação do PEP forma um plano mostrada na Figura 2.5. Se o S3P e o próton que se ligam ao PEP, para formar o IT, se aproximam pela mesma face desse plano, então a adição é *synperiplanar*. Se o S3P e o próton se aproximam por faces opostas desse plano, então a adição é *antiperiplanar*. Se a abstração do próton da metila e a saída do grupo fosfato ocorrem na mesma face do plano do IT formando a EPSP, então a eliminação é *synperiplanar*. Se ocorrerem em faces opostas então a eliminação é *antiperiplanar*.

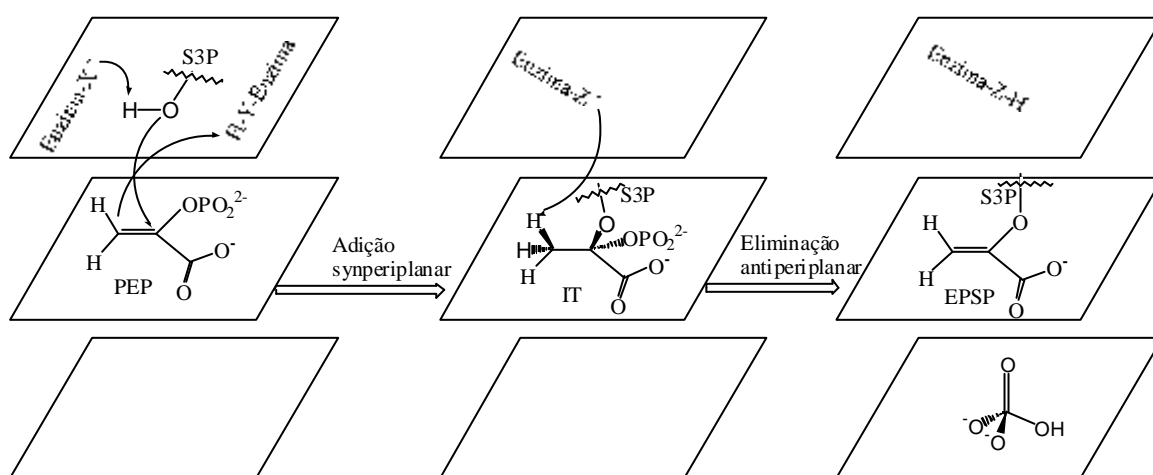


Figura 2.5. Mostra uma adição *synperiplanar* na primeira etapa e *antiperiplanar* na segunda etapa

Foi mostrada que a etapa de adição tem estereoquímica oposta a etapa de eliminação. Se a etapa de adição é *synperiplanar* a eliminação é *antiperiplanar* e vice-versa. (GRIMSHAW *et al.*, 1982; GRIMSHAW *et al.*, 1984).

Em uma reação entre S3P com PEP, marcada com deutério e trítio, catalisada pela EPSPS de *Klebsiella pneumoniae* mutante, os resultados também apontam para uma reação segundo um processo de adição-eliminação, com inversão de estereoquímica (LEE *at al.*, 1984). Outros trabalhos também analisaram a estereoquímica da reação entre o S3P e o PEP, catalisada pela EPSPS, e as conclusões apontam para um processo de adição-eliminação com inversão de estereoquímica (ASANO *et al.*, 1985; LEES e WALSH, 1995; KIM *et al.*, 1996; AN *et al.*, 2003; ESCHENBURG *et at.*, 2003).

O IT foi isolado e sua estrutura confirmada em de estudos da reação entre o PEP e o S3P catalisada pela EPSPS de *Escherichia coli* (ANDERSON *et al.*, 1988b, 1988c). A prova inequívoca da formação do IT foi obtida com o trabalho de Eschenburg e colaboradores que, através da mutação do resíduo Asp313 da EPSPS de *E. coli* para uma alanina, obtiveram a estrutura por cristalografia de raios-X, no momento de formação do IT (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Essa estrutura experimental foi depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1Q36. A Figura 2.6 mostra um recorte dessa estrutura com os resíduos de aminoácidos situados em uma distância de até 6,5 Å do IT.

Visto que a mutação interrompe a reação no momento da formação do IT, os autores supõem que o resíduo Asp313 atue como base na etapa de eliminação, desprotonando o C3 do fragmento PEP do IT.

Neste caso, ao se observar à posição relativa do resíduo Asp313 e do grupo fosfato do fragmento PEP, os autores concluem que a estereoquímica da eliminação deve ser *anti-periplanar* (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Como as etapas de adição e eliminação deste

mecanismo ocorrem com uma inversão de estereoquímica, os autores concluíram também que a etapa de adição deve ser *synperiplanar* (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

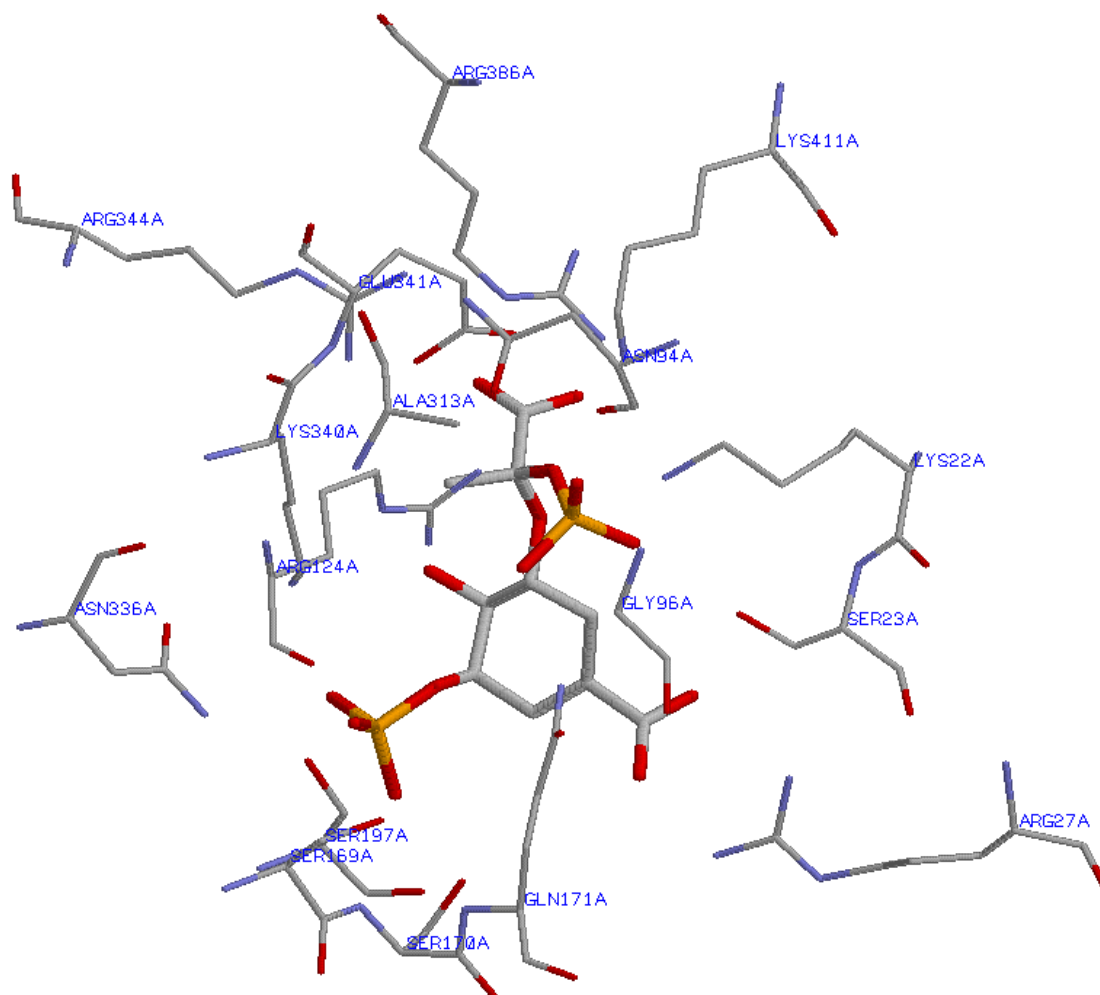


Figura 2.6. Estrutura do sítio ativo da mutante Asp313Ala da EPSPS de *E. coli* complexada ao IT, obtida por cristalografia de raios-X (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza e as cores vermelha, azul, cinza e amarela correspondem aos átomos de oxigênio, nitrogênios, carbono e fósforo, respectivamente.

2.3. INTERAÇÃO DO GLIFOSATO COM O SÍTIO ATIVO DA EPSPS

Como a rota do chiquimato está ausente em animais, esta via biossintética tornou-se um alvo importante para o desenvolvimento de novos compostos com ação fungicida, bactericida e herbicida. Esta idéia também foi fortemente apoiada pela descoberta de que o composto glifosato (*N*-(fosfonometil)glicina) (Figura 2.7) inibe a enzima EPSPS, impedindo a formação do corismato (KISHORE e SHAH, 1988). Sem a formação do corismato, a biossíntese dos compostos aromáticos é interrompida, provocando a morte dos microorganismos patogênicos e das plantas daninhas.

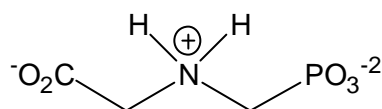


Figura 2.7. Estrutura do glifosato (*N*-(fosfonometil)glicina)

O glifosato é largamente utilizado na agricultura como herbicida. O composto é aplicado nas folhas da planta e é conduzido, via floema, para as raízes e rizomas. As plantas tratadas com glifosato morrem em poucos dias ou semanas e, devido ao deslocamento via floema, nenhuma parte da planta sobrevive (GLASS, 1984; COUTINHO e MAZO, 2005).

A estrutura do complexo ternário da EPSPS de *E. coli* com o S3P e o glifosato, obtido por cristalografia de raios-X, onde se observa que o glifosato ocupa o sítio do PEP, está depositado no PDB sob o código 1G6S (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001). A Figura 2.8 mostra um recorte da estrutura cristalográfica 1G6S com os aminoácidos com pelo menos um átomo a uma distância de 6 Å do S3P e do glifosato.

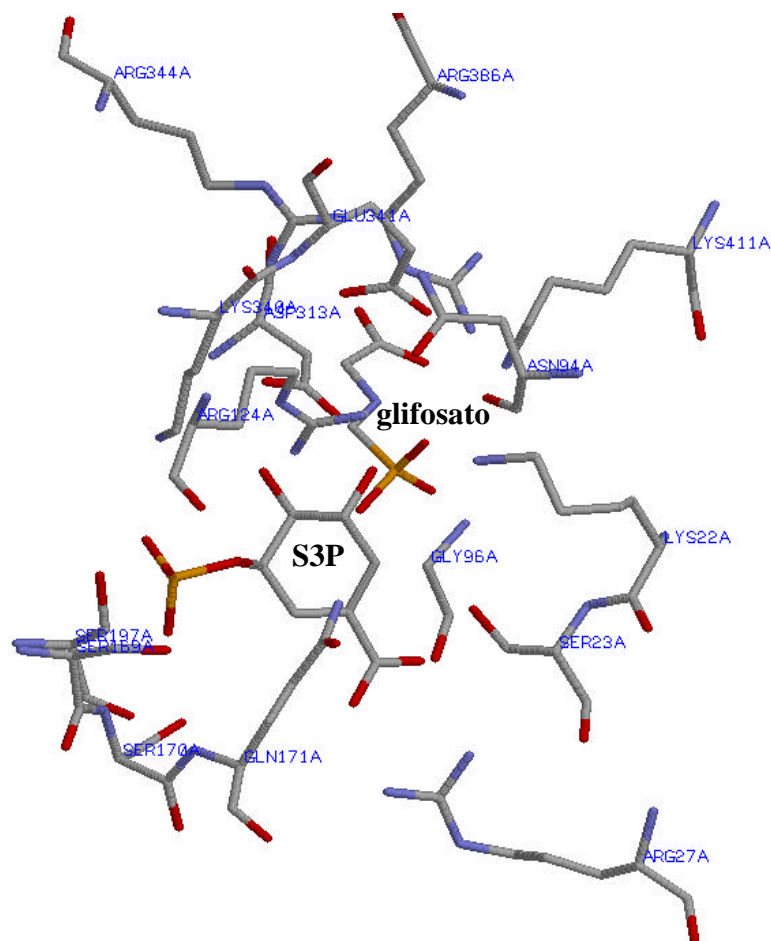


Figura 2.8. Recorte da estrutura cristalográfica 1G6S mostrando os aminoácidos mais próximos do S3P e do glifosato (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001). Os hidrogênios foram omitidos para maior clareza e as cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.

Através da análise dessa estrutura cristalográfica, foi concluído que deve haver forte interação entre os átomos de oxigênio do grupo fosfato, do glifosato, e os resíduos de aminoácido Lys22, Gln171, Arg124, Gly96, Asn94 e Lys411 (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001).

Também, devido à proximidade, conclui-se que o átomo de nitrogênio do glifosato deve interagir fortemente com o resíduo Glu341 e com o átomo de oxigênio ligado ao carbono C5 do S3P, enquanto o grupo carboxilato do glifosato deve interagir com os átomos de nitrogênio dos resíduos Arg344 e Arg386. Através da estrutura cristalográfica, também foi concluído que o grupo fosfato ligado ao carbono C3 do S3P interage com os resíduos de

aminoácidos Lys340, Asn386, Ser197, Ser169 e Ser170, enquanto o grupo carboxilato ligado ao carbono C1 do S3P interage com a Arg27 e a Ser23 (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001).

Devido ao fato do glifosato ocupar a posição do PEP na enzima e do oxigênio ligado ao carbono C5 do S3P interagir fortemente com o átomo de nitrogênio do glifosato, foi concluído que o glifosato compete com o PEP para inibir a enzima (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001).

2.4. PROPOSTAS RECENTES SOBRE O MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O S3P E O PEP CATALISADA PELA EPSPS

Apoiadas em experimentos, algumas propostas da dinâmica de reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS têm sido apresentadas e defendidas. As propostas mais recentes sobre esse mecanismo de reação apresentam argumentos bastante plausíveis; entretanto, alguns deles se contrapõem em alguns pontos.

O ponto comum dessas propostas é que a reação se processa em duas etapas, adição com formação de um IT e eliminação com formação de EPSP e fosfato inorgânico, sendo que há uma inversão de estereoquímica entre estas duas etapas. Os pontos que se contrapõem são aqueles que definem os resíduos de aminoácidos que atuam em cada etapa e a estereoquímica que ocorre primeiro.

São apresentadas, agora, as quatro propostas que surgiram nos últimos anos, sobre a reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS, originadas de experimentos com marcação isotópica (GRIMSHAW *et al.*, 1982; GRIMSHAW *et al.*, 1984; LEE *et al.*, 1984), cinética de reações, isolamento do IT (ANDERSON *et al.*, 1988b, 1988c), obtenção da estrutura cristalográfica da EPSPS contendo o S3P e o glifosato (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001), análise de partição (MIZYED *et al.*, 2003) e da obtenção da estrutura cristalográfica da EPSPS no momento de formação do IT (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

Será apresentada inicialmente a proposta de Schönbrunn e colaboradores (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2003) que será chamada de proposta de mecanismo 1. Nessa proposta, os resíduos Glu341 e Asp334 atuam como catalisadores na etapa de adição, enquanto Lys22 atua na etapa de eliminação. A seguir apresentaremos a proposta formulada por Mizyed e colaboradores (MIZYED *et al.*, 2003), a proposta de mecanismo 2. Nesta proposta, o resíduo Lys22 atua como base e Glu341 atua como ácido na etapa de adição, enquanto na etapa de eliminação a Lys22 atua como ácido e o Glu341 atua como base. A proposta de mecanismo 3 foi formulada por An e colaboradores (AN *et al.*, 2003); nessa proposta, o resíduo Glu341 atua como ácido e Asp334 atua como base na etapa de adição. Na etapa de eliminação ocorre um processo catalítico interno, chamado de auto-catálise. A proposta de mecanismo 4 foi formulada por Eschenburg e colaboradores (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Nessa proposta, o resíduo Lys22 atua como ácido e base na etapa de adição enquanto o Asp334 atua como base na etapa de eliminação.

2.4.1. PROPOSTA DE MECANISMO 1

A estrutura da EPSPS de *E. coli* em complexo com o S3P e o glifosato, obtida por cristalografia de raios-X, foi usada para propor os resíduos de aminoácidos que provavelmente interagem com o IT (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001). Pela análise da estrutura (Figura 2.7), foi sugerido que, na etapa de adição, Glu341 (forma neutra) poderia atuar como doador de próton para o grupo CH₂ da ligação dupla do PEP, formando um carbocátion no carbono C2 do fragmento PEP e que Asp313 atuaria como acceptor de próton da hidroxila do carbono C5 do S3P. A seguir, o oxigênio desprotonado do S3P se ligaria ao carbocátion do PEP, formando o IT. Foi sugerido também que, na etapa de eliminação, o resíduo Lys22

atuaria como a base que abstrai um próton da metila do fragmento de PEP do IT, liberando o grupo fosfato e formando a ligação dupla do produto EPSP (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001). A Figura 2.9 mostra um esquema do mecanismo dessa proposta de reação catalisada pela EPSPS.

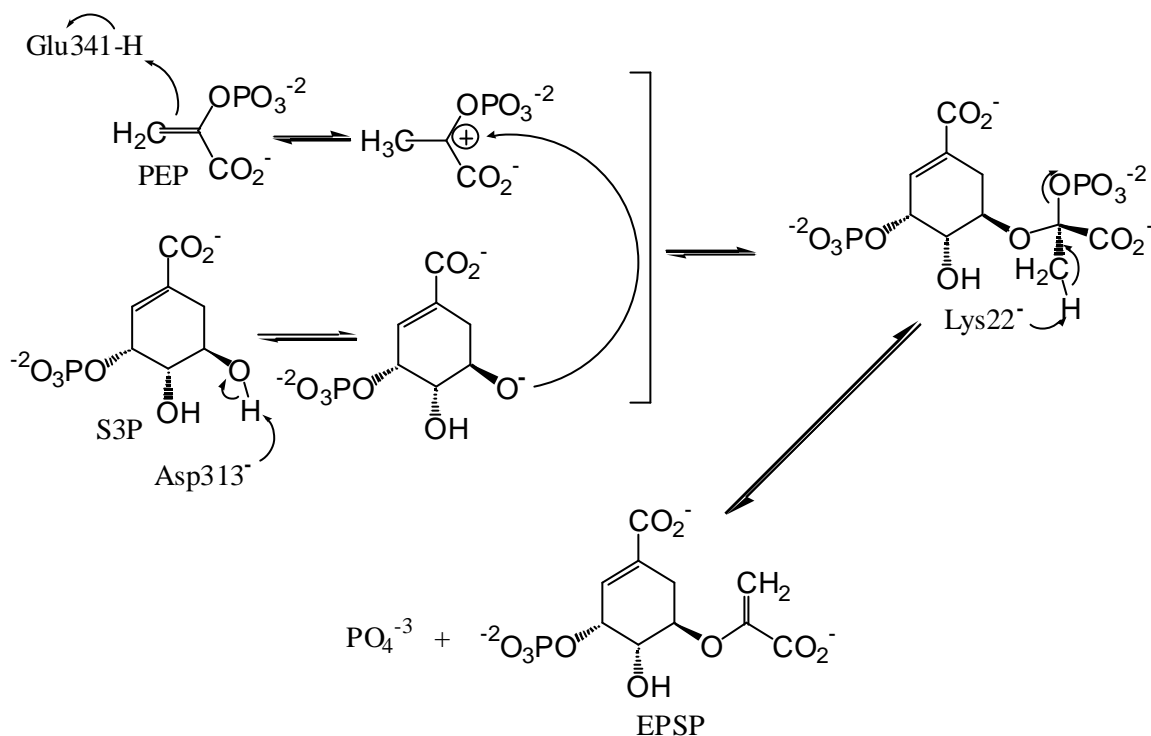


Figura 2.9 Mecanismo da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS, segundo proposto por Schönbrunn e colaboradores (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001).

Foi mostrado que a participação de Glu341 como ácido e de Asp313 como base, na etapa de adição, definiria uma estereoquímica *antiperiplanar* para essa etapa, enquanto que a posição do resíduo Lys22, atuando como base na etapa de eliminação, em relação ao grupo de saída fosfato definiria uma estereoquímica *synperiplanar* de eliminação (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001). Esse resultado concorda com a inversão de estereoquímica sugerida, por outros autores (GRIMSHAW *et al.*, 1982; GRIMSHAW *et al.*, 1984; LEE *et al.*, 1984; ASANO *et al.*, 1985; LEES e WALSH, 1995), para esta reação.

2.4.2. PROPOSTA DE MECANISMO 2

Um estudo da atividade de EPSPS de *E. coli*, envolvendo 18 mutações em 14 resíduos do sítio ativo, foi realizado com objetivo de determinar quais resíduos atuariam preferencialmente na etapa de adição ou de eliminação (MIZYED *et al.*, 2003). Os resultados indicaram que nenhum dos resíduos de aminoácidos participaria de apenas uma das etapas do mecanismo. Segundo os autores, os resultados também mostraram evidências de que apenas Lys22 e Glu341 estariam corretamente localizados no sítio ativo, embora vários outros resíduos teriam participação na estabilização do estado de transição (catálise de conjunto).

Os autores propuseram que na etapa de adição, Lys22 atuaria como a base que abstrai um próton do oxigênio ligado ao C5 do S3P e Glu341 (forma neutra) atuaria como um ácido que cede um próton para o C3 do PEP. Na etapa de eliminação, Glu341 desprotonado abstrairia um próton do carbono da metila do IT, enquanto Lys22 protonaria o grupo fosfato, facilitando sua saída e levando à formação do produto EPSP. A Figura 2.10 mostra um esquema desse mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS (MIZYED *et al.*, 2003).

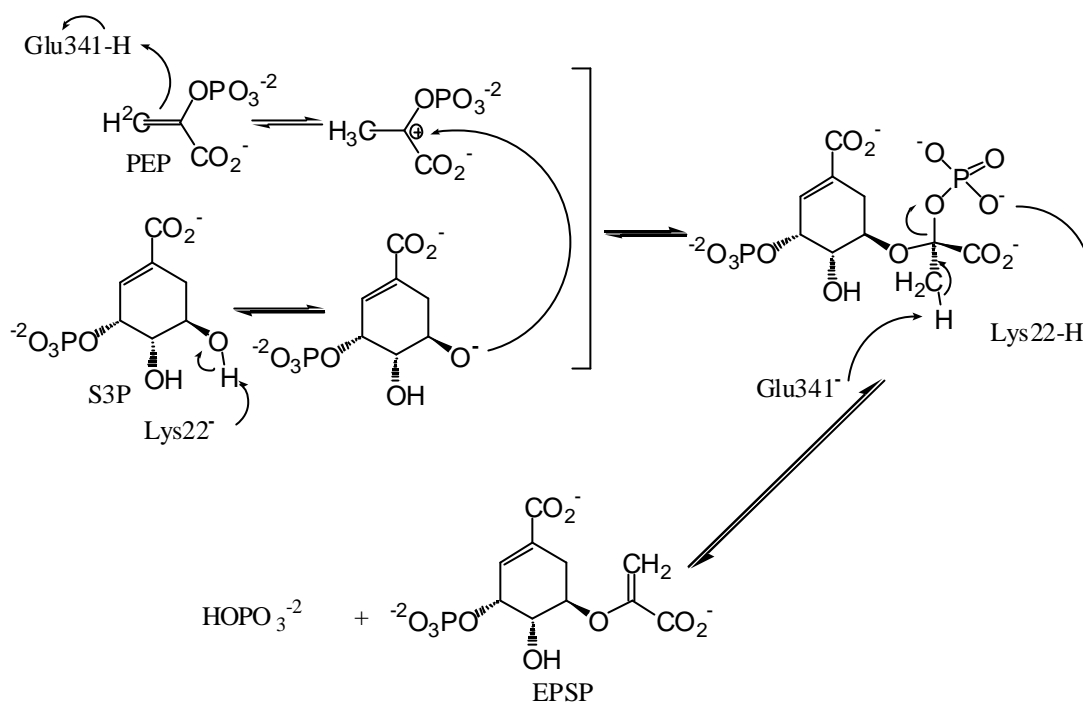


Figura 2.10 Esquema da proposta de Mized e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS (MIZYED *et al.*, 2003).

2.4.3. PROPOSTA DE MECANISMO 3 (AUTO-CATÁLISE)

A partir de experiências com síntese de *R* e *S*, com substituintes halogenados no carbono 3 do fragmento do PEP do IT, foi sugerido que a reação entre o S3P e o PEP, catalisada pela EPSPS, leva à formação de um IT com configuração *S* (AN *et al.*, 2003). Estes resultados em conjunto com os dados da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o EPSPS, S3P e glifosato (SCHÖNBRUNN *et al.*, 2001), reforçaram a idéia de que Glu341 seria o ácido que doa um próton ao C3 do PEP e que Asp313 seria a base que abstrai um próton do oxigênio ligado ao C5 do S3P, catalisando a formação do IT em um processo *antiperiplanar*. Foi observado também, que embora Glu341 esteja em melhor posição, relativa aos outros resíduos, para abstrair um próton da metila do fragmento do PEP, seu

carboxilato está orientado cerca de 90° da ligação C-OPO₃²⁻ a ser quebrada na etapa de eliminação, que deveria ocorrer com estereoquímica *synperiplanar*. Foi sugerido, por An e colaboradores (AN *et al.*, 2003), que para alinhar o IT e o resíduo Glu341 na etapa eliminação seria necessário uma drástica e, provavelmente, impossível reorganização do complexo IT-enzima. Foi sugerido então, por esses autores, que a base em uma posição mais favorável para remover um átomo de hidrogênio da metila, seria um átomo de oxigênio do próprio grupo do fosfato, em um processo de eliminação *synperiplanar* intramolecular (AN *et al.*, 2003). A Figura 2.11 mostra um esquema com essa proposta de reação.

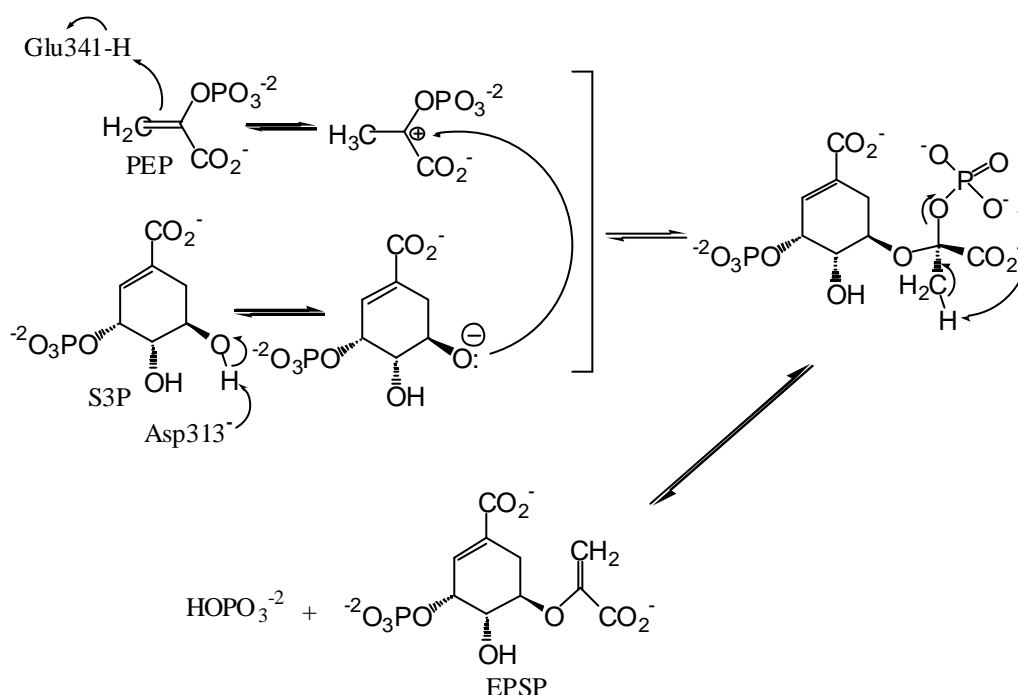


Figura 2.11 Esquema da proposta de An e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSP (AN *et al.*, 2003).

O processo de auto-catálise do fosfato também foi sugerido em outras propostas de mecanismos de reações catalisadas por enzimas (WIDLANSKI *et al.*, 1989; SKARZYNSKI *et al.*, 1998). Os resultados obtidos por An e colaboradores, para a etapa de adição, foram semelhantes às conclusões de Schönbrunn e colaboradores. Entretanto, a auto-catálise foi uma nova proposta para a etapa de eliminação do mecanismo de reação.

2.4.4. PROPOSTA DE MECANISMO 4

Conforme apresentado no item 2.2.2, a mutação Asp313Ala no sítio ativo da EPSPS de *E.coli* tornou possível obter a estrutura cristalográfica dessa enzima, por difração de técnicas de raios-X, no momento de formação do IT e identificar os aminoácidos que podem atuar como catalisadores da reação entre o S3P e o PEP (ESCHENBURG *et al.*, 2003) (Figura 2.6).

Como após a mutação de Asp313 ainda se forma o IT, mas a etapa de eliminação é interrompida, foi concluído que esse resíduo não participa da etapa de adição, mas desempenha um papel fundamental na etapa de eliminação (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Esse resultado foi surpreendente por causa da distância relativamente grande entre Asp313 e a metila (C3') do IT. Foi proposto então que o resíduo Asp313 atuaria como a base abstraindo primeiro um próton do átomo de oxigênio ligado ao átomo C4 do IT (Figura 2.12). A seguir, o átomo de oxigênio desprotonado abstrairia um próton ligado a C3', provocando a saída do fosfato e, conseqüentemente, levando à formação da ligação dupla e ao produto EPSP, por um processo de eliminação *antiperiplanar* (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

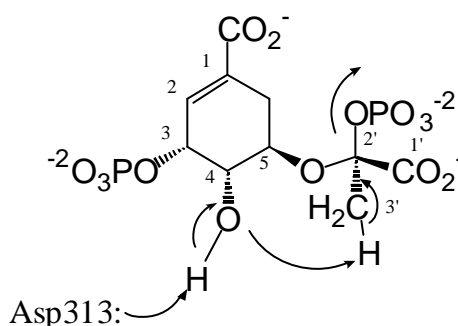


Figura 2.12. Descrição da participação do resíduo Asp313 na etapa de eliminação, atuando como base indireta por um processo *antiperiplanar* (ESCHENBURG *et al.*, 2003)

Os dados cristalográficos sugerem um processo de eliminação com estereoquímica *antiperiplana*. Então o processo de adição deve ocorrer com estereoquímica *synperiplana*. Segundo os autores, o resíduo Lys22 é o único que ocuparia uma posição favorável a uma reação através de um processo com estereoquímica *synperiplana* na etapa de adição. Por isso, foi sugerido que este resíduo participaria na transferência dos dois prótons nessa etapa. Primeiro, Lys22 abstrairia um próton da hidroxila ligada ao C5 do S3P e depois cederia um próton para o C3 do PEP, facilitando a ligação entre o oxigênio ligado ao C5 do S3P com o C2 do PEP e formando o IT (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

A Figura 2.13 mostra um esquema das duas etapas dessa proposta de reação entre o S3P e o PEP.

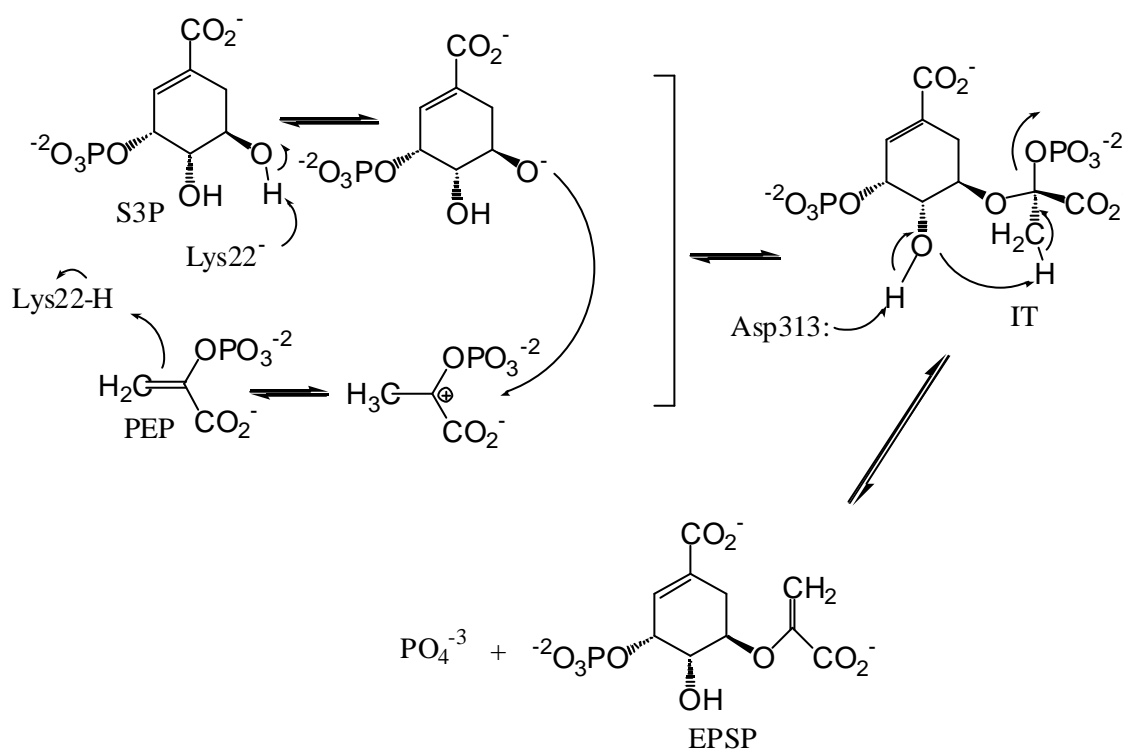


Figura 2.13. Proposta de Eschenburg e colaboradores para a reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

2.5. COMPARAÇÃO DOS MECANISMOS PROPOSTOS

A revisão bibliográfica do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP, catalisado pela EPSPS, mostra que as propostas para esse mecanismo de reação apresentam contradições quando se trata da base e do ácido que atuam nas etapas de adição e eliminação. A Tabela 2.1 mostra os aminoácidos que, segundo cada proposta, atua nas etapas de adição e eliminação. Para uma melhor compreensão as propostas são chamadas de 1, 2, 3 e 4.

Tabela 2. 1 Propostas para a reação entre o S3P e o PEP com os respectivos aminoácidos que atuam nas etapas de adição e eliminação

Proposta	adição	eliminação
1	Base Asp313 Ácido Glu341	Base Lys22
2	Base Lys22 Ácido Glu341	Base Glu341 Ácido Lys22
3	Base Asp313 Ácido Glu341	Auto-catálise
4	Base Lys22 Ácido Lys22	Base Asp313

A proposta de mecanismo para a etapa de adição entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS sugerida por An e colaboradores (proposta 3) é idêntica à proposta de Schönbrunn e colaboradores (proposta 1). A diferença está na etapa de eliminação, na qual Schönbrunn e colaboradores (proposta 1) propõem que o resíduo Lys22 atue como base, abstraindo um hidrogênio da metila do IT, enquanto An e colaboradores (proposta 3) sugerem que o hidrogênio da metila é abstraído por um oxigênio do grupo fosfato em um processo de auto-catálise.

A proposta de Mizyed e colaboradores (proposta 2) para a etapa de adição sugere que o ácido que cede um próton para o PEP é o resíduo Glu341, concordando com os grupos de

An e colaboradores(proposta 3) e Schönbrunn e colaboradores (proposta 1). Entretanto, Mizyed sugere que a base que abstrai o hidrogênio da hidroxila, ligada ao C5 do S3P, nessa mesma etapa, é Lys22 e que a base que abstrai um próton da metila na etapa de eliminação é Glu341, discordando dos grupos de Schönbrunn e An.

A proposta do grupo de Eschenburg (proposta 4) sugere que Lys22 é a base que abstrai um próton da hidroxila ligada ao C5 do S3P na etapa de adição, concordando nesse ponto apenas com a proposta de Mizyed e colaboradores (proposta 2). A proposta do grupo de Eschenburg (proposta 4) também sugere que Lys22 também atua como ácido na etapa de adição e que Asp313 atua como base na etapa de eliminação, discordando de todas as outras propostas. Essa proposta também requer uma estereoquímica *synperiplanar* para a etapa de adição e *antiperiplanar* para a de eliminação, discordando das outras propostas para esse mecanismo.

3. OBJETIVOS

A revisão bibliográfica do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS, mostrou que os estudos experimentais usando técnicas de marcação isotópica, mutações sítio-dirigidas, análise cinética de reações e isolamento de intermediários permitiu avanços na elucidação do mecanismo dessa reação. Esses estudos permitem concluir que a reação ocorre em duas etapas, sendo a primeira de adição e a segunda de eliminação, com uma inversão de estereoquímica entre elas. Entretanto permanecem ainda em aberto pontos considerados fundamentais para o entendimento desse mecanismo de reação, tais como, qual estereoquímica ocorre primeiro: *synperiplanar* ou *antiperiplanar*? Quais aminoácidos participam das etapas de adição ou eliminação? As respostas contraditórias a essas perguntas, alcançadas pela interpretação de dados obtidos com diferentes técnicas experimentais, mostram que esse mecanismo de reação ainda não é completamente conhecido, necessitando de estudos utilizando outras técnicas que complementem o seu entendimento.

Para se alcançar esse objetivo, serão exploradas neste estudo técnicas de modelagem molecular. Utilizando as estruturas cristalográficas obtidas através de raios-X, serão realizadas simulações do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP, catalisado pela EPSPS, buscando acrescentar novos conhecimentos aos já existentes e proporcionar avanços na elucidação desse mecanismo. Este estudo será concentrado na segunda etapa do mecanismo, isto é na etapa de eliminação. Para a modelagem adequada desse sistema, é necessário um método quântico para avaliação da quebra e formação de ligações químicas, mas que ao mesmo tempo seja rápido o suficiente para permitir cálculos de estruturas com um número elevado de átomos, incluindo o efeito do solvente. Nesse contexto, temos os seguintes objetivos, utilizando o método de orbital molecular semi-empírico:

- 1- Determinar os estados de protonação mais prováveis de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima EPSPS.

- 2- Estudar, através de simulações computacionais, incluindo o efeito do solvente, os mecanismos de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela enzima EPSPS de uma planta, usando como enzima um modelo de *Oryza sativa*. O uso de uma enzima de *O. sativa* para esta etapa se deveu ao interesse de se compreender o mecanismo de ação da EPSPS de uma espécie vegetal representativa, visto que a principal aplicação para a inibição desta enzima é o controle de plantas competidoras. Além da presença explícita de moléculas de água, o efeito do solvente foi incluído porque vários resíduos e o próprio IT têm um número elevado de cargas e o mecanismo deve ser fortemente influenciado pela constante dielétrica do meio.
- 3- Utilizar os conhecimentos adquiridos, neste trabalho e em trabalhos anteriores, para avaliar os possíveis mecanismos de ação de novos compostos sintetizados por nosso grupo (NOGUEIRA, 2007) como inibidores propostos para a enzima EPSPS.

4. METODOLOGIA

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A substituição do aminoácido Asp313 por uma alanina, na enzima EPSP sintase de *E. coli*, permitiu a obtenção por cristalografia de raios-X da estrutura dessa enzima no momento de formação do intermediário tetraédrico da reação entre o PEP e o S3P (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

Para realizar o estudo do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP, catalisado pela enzima EPSPS de *O. sativa*, através de simulações computacionais, é necessária a estrutura tridimensional da enzima. Como esta estrutura não está disponível na literatura, foi construído um modelo por homologia partindo-se da seqüência primária da EPSPS de *O. sativa*, depositada no sítio do *Swiss Prot* com o código Q93VK6, e da estrutura cristalográfica da EPSPS de *E. coli* que está depositada no sítio do *Protein Data Bank* (PDB) com o código 1Q36 (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Assim como a estrutura cristalográfica da EPSPS de *E. coli*, a estrutura modelada não contém os hidrogênios e esses precisam ser adicionados para o estudo do mecanismo da reação. Uma dificuldade que surge para se adicionar os átomos de hidrogênio é que alguns aminoácidos básicos podem estar protonados ou não. Por isso, há a necessidade de se avaliar os possíveis estados de protonação de alguns aminoácidos do sítio ativo da estrutura cristalográfica, antes da construção do modelo final e das simulações computacionais do mecanismo de reação.

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PM3 PARA ESTUDAR OS ESTADOS DE PROTONAÇÃO EM ENZIMAS

A escolha do método mais adequado para avaliar os estados de protonação de alguns resíduos básicos da EPSPS de *E. coli* foi baseada, em um primeiro momento, no estudo de um complexo formado entre metilamina e metilfosfato como um modelo simples para as interações entre um resíduo de lisina e um grupo fosfato do intermediário tetraédrico. As geometrias foram otimizadas com métodos semi-empíricos e *ab initio*. Foi utilizado o programa Mopac 6.0 para os cálculos semi-empíricos com os hamiltonianos AM1 (DEWAR *et al.*, 1985) e PM3 (STEWART *et al.*, 1989). Para os cálculos *ab initio* foi usado o programa Spartan`02 (Wavefunction, Inc) com o método de cálculo HF/6-311+G. A estrutura de energia mais baixa obtida com o método AM1 mostrou uma conformação bifurcada com cada átomo de hidrogênio do grupo amino da metilamina fazendo uma ligação hidrogênio com um oxigênio do metilfosfato. Esse resultado não concordou com o obtido com o método *ab initio*, o qual contém apenas uma ligação hidrogênio, mais curta, entre os grupos amino e fosfato. Quando as geometrias obtidas com os métodos *ab initio* e PM3 foram comparadas, observou-se estruturas similares. Esse resultado está de acordo com registros da literatura, onde se demonstrou que o PM3 é o método semi-empírico mais adequado para prever as geometrias de vários tipos de ligações de hidrogênio intermoleculares (SCHRÖDER *et al.*, 1991; ZHENG e MERZ., 1992; JUREMA e SHIELDS., 1993; LIVELY *et al.*, 1994).

Um teste para avaliar a eficiência do método PM3 (STEWART., 1989) na previsão de estados de protonação de aminoácidos básicos, em proteínas, foi realizado comparando-se resultados obtidos com esse método semi-empírico com dados de difração de nêutrons das proteínas *D*-xilose isomerase, com resolução de 2,2 Å, e β -tripsina, com resolução de 1,8 Å, depositadas no *Protein Data Bank* com os códigos 2GVE (KATZ *et al.*, 2006) e 1NTP (KOSSIAKOFF, 1984), respectivamente. A técnica de espalhamento de nêutrons é um

método que permite localizar átomos de hidrogênio pela introdução de deutério na proteína, identificando-se quais átomos de hidrogênio são trocados por deutério e a extensão da troca. Os dados da difração de nêutrons, em uma resolução próxima de ~ 2 Å, permitem a definição da posição dos átomos de hidrogênio em uma proteína.

Nessa parte do trabalho, três arquivos de entrada para os cálculos foram construídos a partir das estruturas 2GVE e 1NTP, utilizando-se o programa Rasmol 2.6 (SAYLE., 1993). Um dos arquivos de entrada foi construído selecionando-se o resíduo de Lys149 da *D*-xilose isomerase, e os resíduos de aminoácidos e as moléculas de água em contato direto com esse aminoácido. Os outros dois arquivos foram construídos a partir de dois resíduos de histidina da β -tripsina, His57 e His40, selecionando-se os resíduos de aminoácidos e as moléculas de água em contato direto com esses aminoácidos.

Para a transformação de coordenadas dos arquivos de dados foi utilizado o programa Babel 1.6 (WALTERS e STAHL., 1992). Nos cálculos foi utilizado o programa Mopac 6.0 com o método PM3.

4.3. AVALIAÇÃO DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS DO SÍTIO ATIVO

Para avaliar os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos básicos do sítio ativo foi usada a estrutura cristalográfica da enzima EPSPS de *Escherichia coli*, obtida através de raios-X (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Com o programa Rasmol 2.7, foram selecionados os aminoácidos dessa enzima e as moléculas de água (oito) com ao menos um átomo situado em uma esfera de 6 Å ao redor do intermediário da reação. Os aminoácidos selecionados foram: Lys22, Ser23, Val24, Arg27, Asp49, Asn94, Ala95, Gly96, Thr97, Ala98, Arg100, Met121, Arg124, Val168, Ser169, Ser170, Gln171, Thr174, Val196, Ser197, Tyr200, Ile203, Thr204,

Pro312, Ala313, Met316, Asn336, Lys340, Glu341, Arg344, Asp384, His385, Arg386, Lys411 e Thr412. Após a seleção dos aminoácidos e moléculas de água, foi usado o programa Babel 1.6 para adicionar os átomos de hidrogênio e para conversão de coordenadas. Os aminoácidos e moléculas de água com seus respectivos hidrogênios somaram cerca de 650 átomos. Nessa estrutura, há quatro resíduos de aminoácidos básicos, His385, Lys22, Lys340 e Lys411. Permutando os estados de protonação desses quatro resíduos de aminoácidos, foram obtidas 16 estruturas. As estruturas foram otimizadas com o programa Mopac2002 (Fujitsu, Ltd.), utilizando-se o método semi-empírico PM3 (STEWART, 1989). Para incluir o efeito de água na minimização das estruturas foi usado o método COSMO (KLAMT e SCHÜÜMANN, 1993). Como os modelos tinham várias centenas de átomos, foi usado o método de escalonamento linear Mozyme (STEWART, 1996), que reduz significativamente o tempo de cálculo pelo uso de orbitais moleculares localizados, cujo número foi ajustado com a palavra-chave NLMO (*Number of Localized Molecular Orbitals*) conforme a necessidade. Foi usado como método de busca de mínimos de energia a rotina EF (*Eingenvector Following*). A norma de gradiente foi de 5,0 kcal/(Å ou rad).

4.4. CONSTRUÇÃO DO MODELO DA ENZIMA EPSPS DE *Oryza sativa*

Para avaliar o mecanismo de inibição da EPSPS, foi construído um modelo por homologia a partir da seqüência de aminoácidos da enzima de *O. sativa*, depositada no sítio *Swiss Prot* com o código Q93VK6, e de duas estruturas cristalográficas da EPSPS de *E. coli*, depositadas no sítio do *Protein Data Bank* sob os códigos 1X8R (PRIESTMAN *et al.*, 2005) e 1G6S (SCHÖBRUNN *et al.*, 2001). A estrutura cristalográfica 1X8R tem como ligante o análogo *S*-fosfonato do IT da EPSPS, enquanto na estrutura 1G6S o ligante é um complexo formado pelo S3P e o herbicida glifosato. O molde da seqüência primária foi encontrado com a ferramenta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), que procura o molde mais apropriado para o servidor Swiss-Model (SCHWEDE *et al.*, 2003; GUEX., 1997., PEITSH., 1995) construir o modelo. Após a seleção dos moldes, o modelo 3D foi construído com o modo de primeira aproximação do Swiss-Model, incluindo geração do modelo com ProMod e minimização de energia com o campo de força GROMOS96 (VAN GUNSTEREN *et al.*, 1996). Os moldes apresentam uma identidade de 55,4% com a seqüência primária de *O. sativa* e têm excelente resolução (1.5 Å). A este modelo foram adicionadas as coordenadas do IT e das moléculas de água conforme determinadas na estrutura cristalográfica 1Q36. Para tornar viável o uso de cálculos quânticos, foi realizada uma seleção, utilizando o software Rasmol 2.6 (SAYLE, 1993), de todos os aminoácidos com ao menos um átomo localizado em um raio de 6,5 Å a partir do IT. No interior da esfera selecionada, através deste recorte, ficaram o IT e 38 resíduos de aminoácidos (Lys26, Ser27, Leu28, Asn30, Arg31, Asp53, Asn102, Ala103, Gly104, Thr105, Ala106, Arg108, Met131, Arg134, Ile180, Ser181, Ser182, Gln183, Tyr184, Ser186, Ile208, Ser209, Tyr212, Val213, Met215, Thr216, Asn330, Pro333, Asp334, Ser357, Val360, Lys361, Glu362, Arg365, Asp405, Arg407, Lys432 e Thr433), além de oito moléculas de água. Após a seleção, os

respectivos átomos de hidrogênio foram adicionados com o programa Babel 1.6 (WALTERS E STAHL, 1996), sendo que algumas correções nos estados de protonação de alguns resíduos de aminoácidos foram feitas, após cuidadosa inspeção visual. O modelo, através do qual foi avaliado o mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa* é mostrado na Figura 4.1.

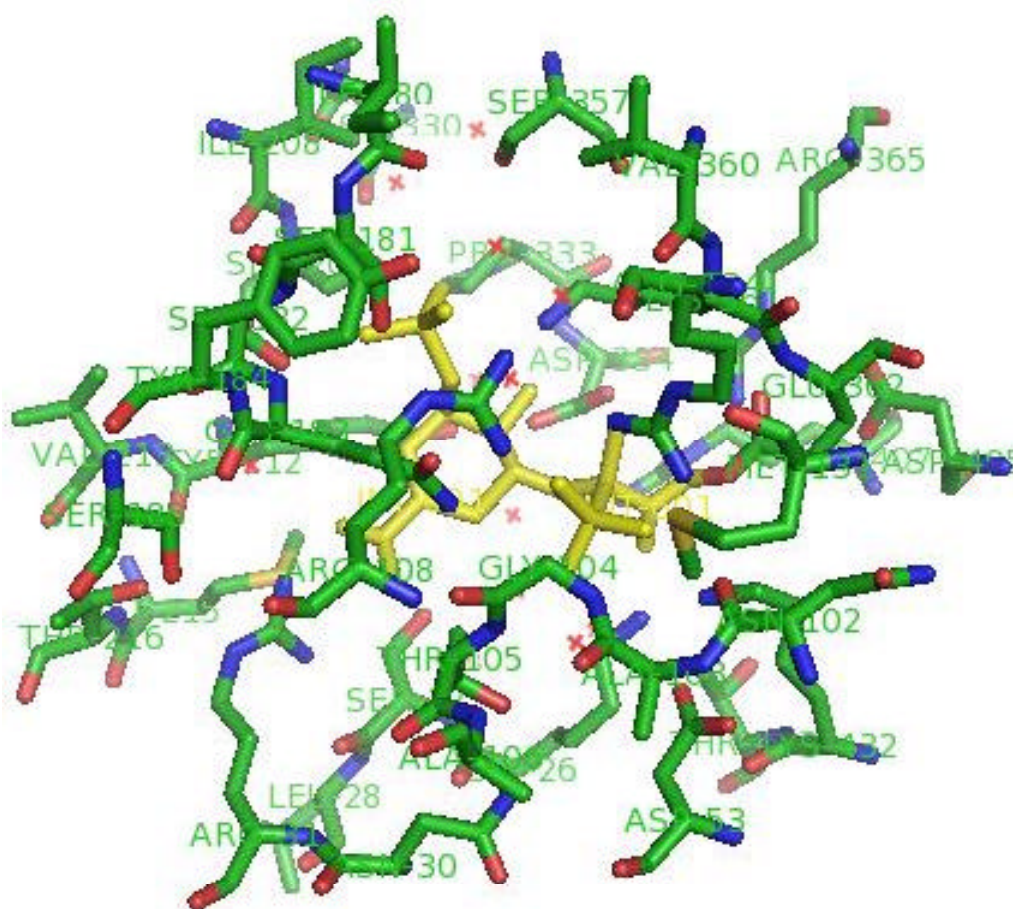


Figura 4.1. Recorte do modelo de homologia obtido a partir da sequência de aminoácidos da EPSPS de *Oryza sativa*, contendo o intermediário tetraédrico (em amarelo). Átomos de H foram omitidos para maior clareza. Átomos de C: verde; átomos de O: vermelho; átomos de N: azul.

4.5. METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O S3P E O PEP CATALISADA PELA EPSPS DE *ORYZA SATIVA*

Os mesmos procedimentos de cálculo descritos no item 4.3 foram em geral adotados nesta etapa do trabalho. O modelo de homologia construído conforme relatado no item anterior corresponde à enzima EPSPS no momento de formação do IT. Foi observada a região do sítio ativo com o objetivo de identificar quais resíduos de aminoácidos poderiam atuar como base ou ácido nas etapas de adição e eliminação, levando à formação dos produtos. Os resíduos Lys432, Glu362 e Asp334 estão localizados no sítio ativo em uma posição que os tornam candidatos a desempenhar o papel catalítico na etapa de eliminação.

Quando foi comparada a posição dos resíduos do modelo de enzima EPSPS de *O. sativa*, com aqueles da estrutura cristalográfica do EPSPS de *E. coli*, foi constatado que os resíduos Glu362, Asp334, e Lys432 correspondem, respectivamente, aos resíduos Glu341, Asp313 e Lys411.

A possibilidade de Glu362 atuar como base, na etapa de eliminação, concorda com a proposta de Mizyed e colaboradores (MIZYED *et al.*, 2003). Por outro lado, foi observado que Asp334 ocupa uma posição favorável para abstrair um próton da hidroxila ligada ao carbono 4 do fragmento do IT. O oxigênio da hidroxila, desprotonado, poderia abstrair um hidrogênio da metila, levando à formação do produto EPSP com liberação de grupo fosfato, em concordância com a proposta de Eschenburg e colaboradores (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

Por estarem protonados e pela sua proximidade com o grupo fosfato, há dois resíduos que poderiam atuar como ácidos na etapa de eliminação, Lys26 e Lys432. O nitrogênio da cadeia lateral de Lys26 está próximo do oxigênio que liga o grupo fosfato ao C2 do fragmento de PEP do IT, enquanto o nitrogênio da cadeia lateral de Lys432 está próximo de um dos oxigênios aniônicos do grupo fosfato do fragmento de PEP do IT. Por envolver uma interação

com um oxigênio aniônico, que receberia mais facilmente o próton, consideramos Lys432 como o provável catalisador ácido. Essa proposta é inovadora, porque esse resíduo nunca foi considerado como candidato a catalisador ácido para a eliminação.

A Figura 4.2 mostra o intermediário tetraédrico e os aminoácidos avaliados neste estudo como ácido ou base no mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela enzima EPSPS de *O. sativa*.

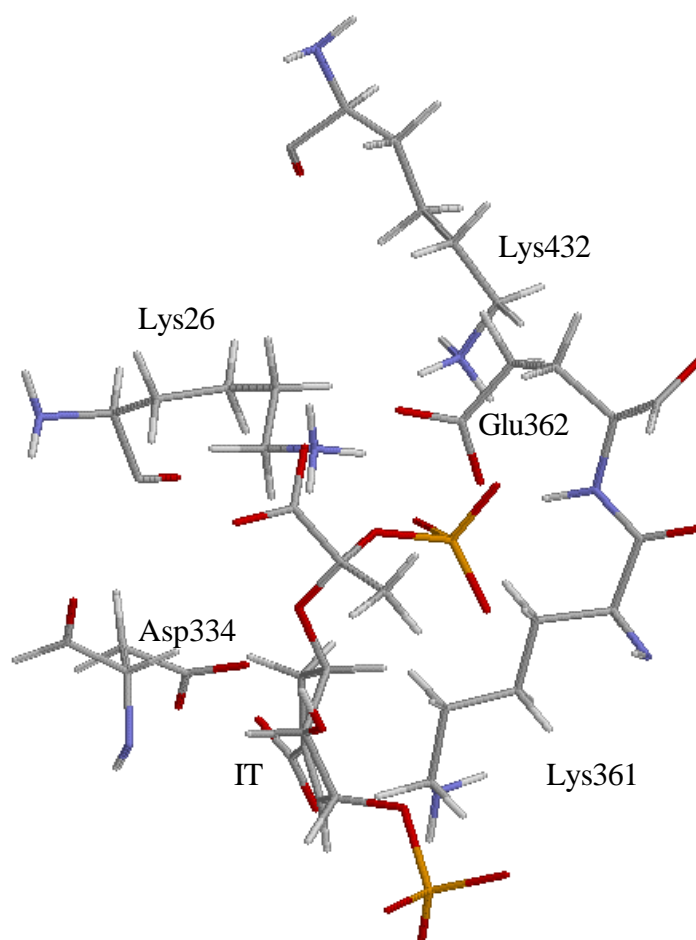


Figura 4.2. Intermediário tetraédrico (IT) e os resíduos de aminoácidos Glu362, Asp334, Lys26, Lys432 e Lys361; que são os possíveis catalisadores que atuam na reação entre o S3P e o PEP. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.

4.5.1. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE BÁSICA DIRETA

Na etapa de eliminação um aminoácido atua como base abstraindo um hidrogênio da metila do IT provocando a saída do grupo fosfato, restaurando a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 do fragmento do PEP e formando o EPSP. Conforme dito no item anterior, no modelo construído pode ser observado que os aminoácidos que podem atuar como base nessa etapa de reação, através de um processo direto, são os resíduos Glu362 e Asp334.

A simulação computacional, nessa etapa de reação, foi realizada aproximando-se um átomo de hidrogênio metílico da base e simultaneamente afastando-se o grupo fosfato do carbono 2 do fragmento do PEP. A aproximação do hidrogênio e o afastamento do fosfato foram realizados através de pequenas variações na ligação entre o hidrogênio e o C3 do fragmento PEP e entre a ligação do oxigênio do fosfato e o C2 do fragmento do PEP, que correspondem, respectivamente, às distâncias d_1 e d_2 mostradas na Figura 4.3.

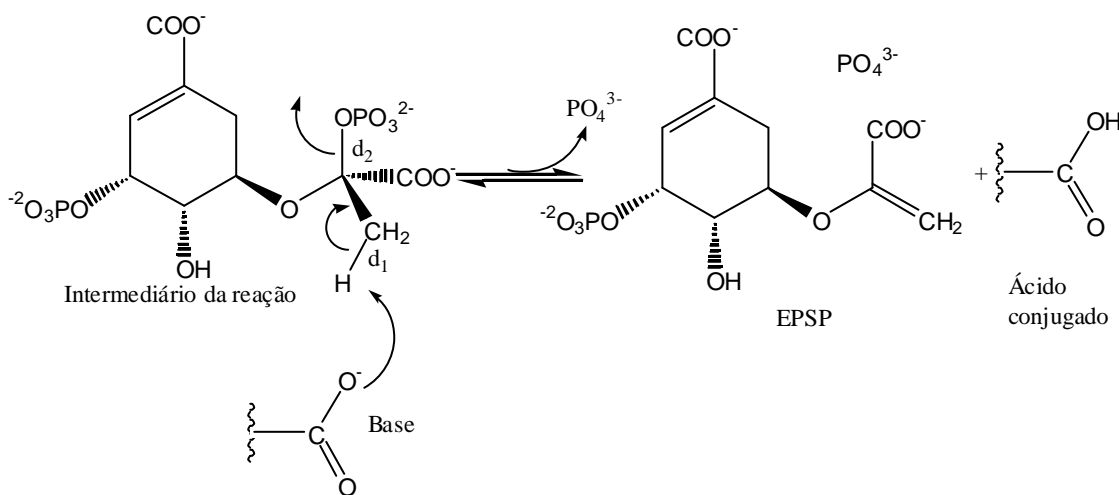


Figura 4.3. Esquema da reação na etapa de eliminação, onde uma base abstrai um próton da metila do IT provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.

Para cada variação de d_1 e d_2 , a geometria do modelo foi otimizada e o respectivo calor de formação calculado. Os resultados foram analisados através de tabelas, gráficos e superfícies de energia potencial.

4.5.2. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE BÁSICA INDIRETA

Observando o modelo construído, foi constatado que o resíduo Asp334 também pode atuar como uma base indiretamente, abstraindo um próton da hidroxila ligada ao C4 do IT. O átomo de oxigênio desprotonado poderia então abstrair um próton da metila do fragmento do PEP, provocando a saída do grupo fosfato, restaurando a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 do fragmento do PEP e formando o EPSP.

A simulação computacional, nessa etapa de reação, foi realizada afastando-se inicialmente o átomo de hidrogênio da hidroxila de C4, aproximando-se um átomo de hidrogênio metílico do oxigênio desta hidroxila e afastando-se o grupo fosfato do C2 do fragmento do PEP do IT.

O afastamento do átomo de hidrogênio da hidroxila, a aproximação do átomo de hidrogênio metílico e o afastamento do grupo fosfato foram realizados, respectivamente, através de variações nos comprimentos das distâncias d_1 , d_2 e d_3 mostradas na Figura 4.4.

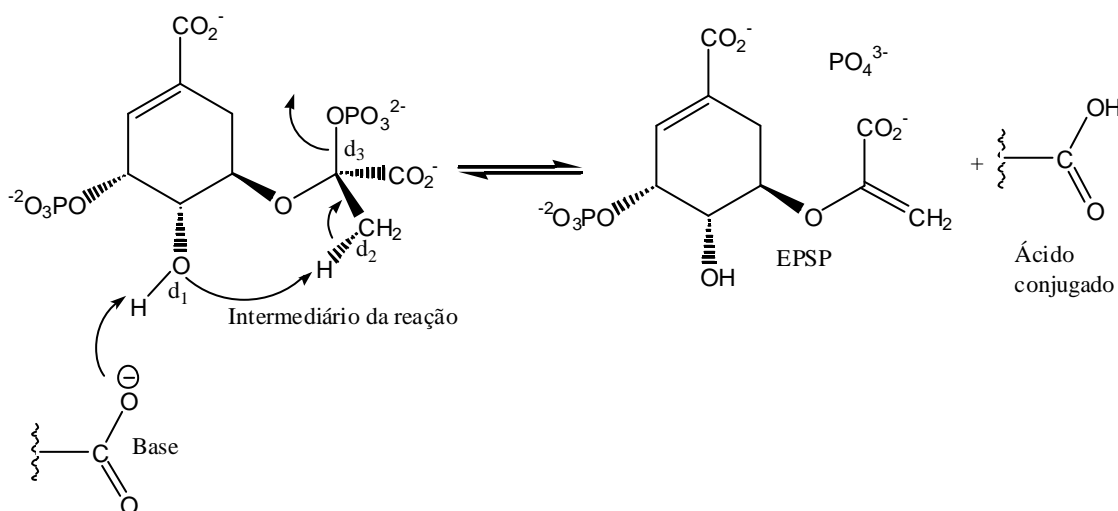


Figura 4.4. Esquema da reação na etapa de eliminação, onde uma base abstrai um próton da hidroxila ligada ao carbono 4 do fragmento do S3P. A seguir, o átomo de oxigênio desprotonado abstrai um próton da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.

Para cada variação de d_1 , d_2 e d_3 , a geometria do modelo foi otimizada e o respectivo calor de formação calculado. Os resultados foram analisados através de gráficos e superfícies de energia potencial.

4.5.3. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE ÁCIDA E COM CATÁLISE BÁSICA DIRETA

Outra possibilidade para o mecanismo de reação, na etapa de eliminação, envolve um ácido doando um próton para um dos átomos de oxigênio do grupo fosfato e de uma base abstraindo um próton da metila. Um esquema dessa reação é mostrado na Figura 4.5.

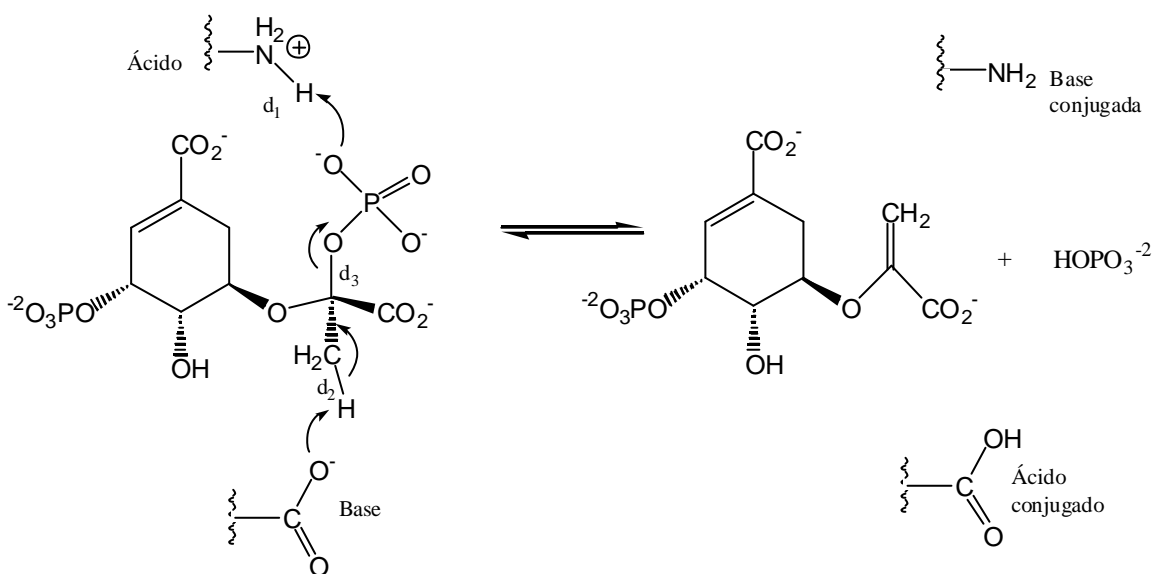


Figura 4. 5.Esquema da reação na etapa de eliminação onde um ácido doa um próton para um átomo de oxigênio do fosfato enquanto uma base abstrai um próton da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.

Essa simulação computacional foi realizada aproximando-se o átomo de hidrogênio do catalisador ácido do átomo de oxigênio do grupo fosfato e, em seguida, aproximando-se o átomo de hidrogênio metílico da base e afastando-se o grupo fosfato do carbono 2 do

fragmento do PEP do IT. As aproximações dos átomos hidrogênio foram realizadas aumentando as distâncias d_1 e d_2 , enquanto o afastamento do grupo fosfato foi realizado aumentando a distância d_3 . Para cada pequena variação em d_1 , d_2 e d_3 a geometria do modelo foi otimizada e o respectivo calor de formação calculado. Os resultados foram analisados através de tabelas, gráficos e superfícies de energia potencial.

4.5.4. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO COM CATÁLISE ÁCIDA E COM CATÁLISE BÁSICA INDIRETA

Essa proposta de mecanismo para a etapa de eliminação envolve um ácido doando um próton para um dos átomos de oxigênio do grupo fosfato e uma base abstraindo um próton da hidroxila do C4 do fragmento do S3P. A seguir, o átomo de oxigênio desprotonado abstrai um próton da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP. A Figura 4.6 mostra um esquema da catálise.

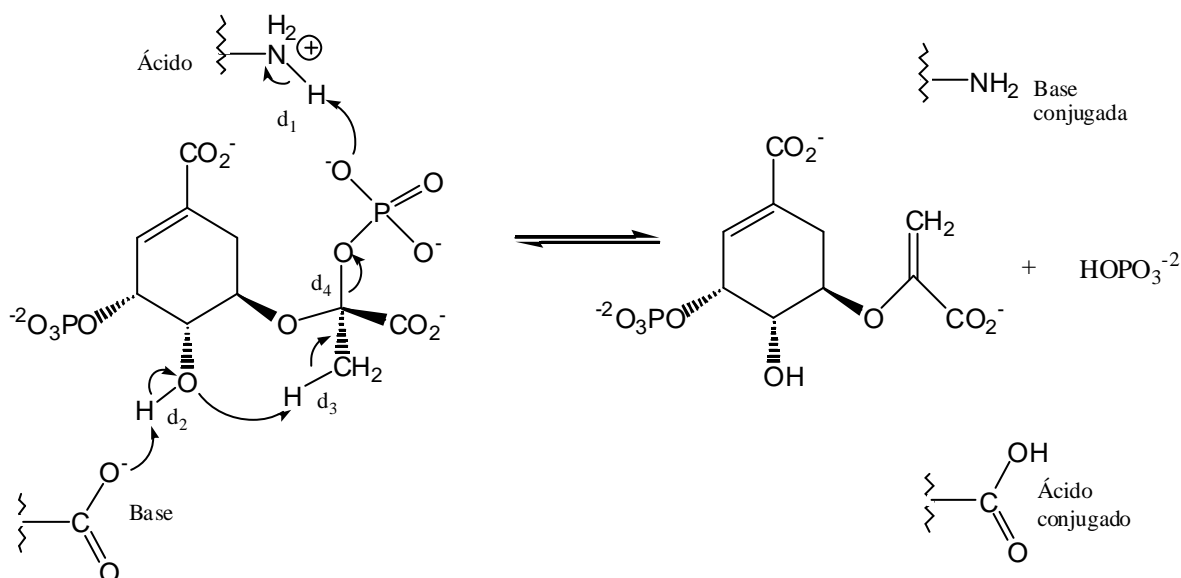


Figura 4.6. Esquema da reação na etapa de eliminação onde um ácido doa um próton para um oxigênio do fosfato, enquanto uma base abstrai um próton da hidroxila ligada ao carbono 4 do fragmento do S3P do intermediário tetraédrico. O átomo de oxigênio desprotonado abstrai um átomo de hidrogênio da metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do EPSP.

Essa simulação computacional foi realizada aproximando-se o hidrogênio do catalisador ácido do oxigênio do grupo fosfato enquanto o hidrogênio da hidroxila ligada ao C4 do fragmento do S3P do intermediário tetraédrico é aproximada da base. A seguir um átomo de hidrogênio metílico é aproximado da hidroxila desprotonada com o afastamento simultâneo do grupo fosfato, levando à formação do EPSP. As aproximações dos átomos de hidrogênios foram realizadas aumentando as distâncias d_1 , d_2 e d_3 , enquanto o afastamento do grupo fosfato foi realizado aumentando a distância d_4 . Para cada variação nas distâncias d_1 , d_2 , d_3 e d_4 , a geometria do modelo foi otimizada e o respectivo calor de formação calculado. Os resultados foram analisados através de tabelas, gráficos e superfícies de energia potencial.

4.6. INTERAÇÃO DE DIISOBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA E DIBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA COM A EPSPS DE *ORYZA SATIVA*

Os compostos organofosforados e acilidrazonas se tornaram importantes agentes químicos aplicados na indústria farmacêutica e agroindústria nos últimos anos (RESZKA E RODAN, 2003; BARREIRO, 2002). Dois compostos que conjugam os principais grupos funcionais destas famílias de substâncias, dibutilfosforil-*p*-carboxifenilidrazona (**1**) e diisobutilfosforil-*p*-carboxifenilidrazona (**2**) (Figura 4.7), foram sintetizados por nosso grupo e tiveram suas atividades biológicas testadas (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Foi constatado que **1** apresentava significativa atividade inibitória da germinação de sementes de plantas, enquanto **2** era inativo.

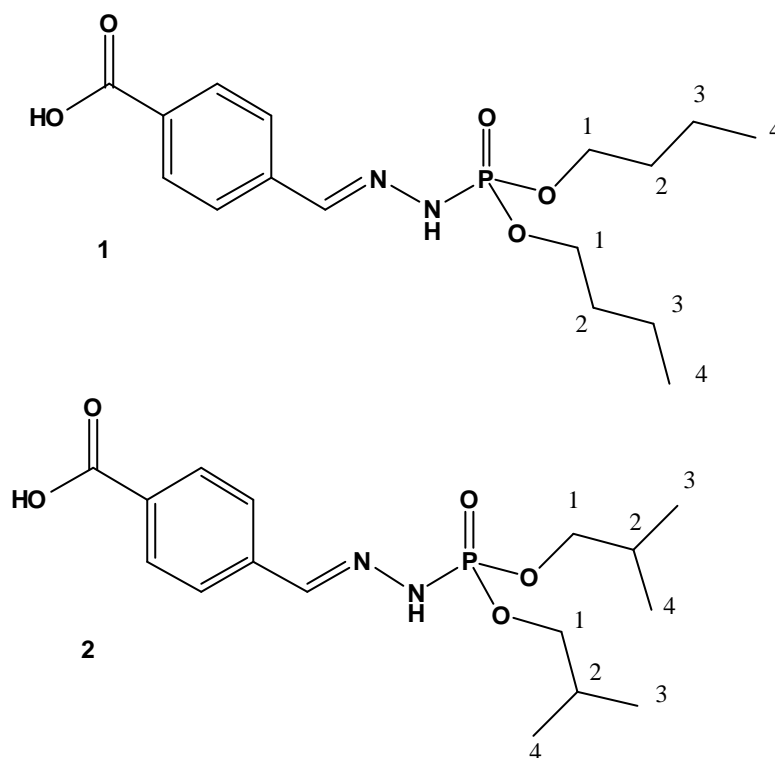


Figura 4.7. Estruturas das fosforilidrazonas **1** e **2** sintetizadas e testadas como inibidores de germinação por nosso grupo (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Os átomos de hidrogênio foram omitidos.

Com o objetivo de tentar entender os comportamentos diferentes dos compostos **1** e **2**, foi executado um estudo teórico da interação desses dois compostos com os aminoácidos do sítio ativo do modelo da EPSPS de *O. sativa*. A escolha dessa enzima se baseia no fato dela ser comprovadamente um alvo de herbicidas organofosforados, como o herbicida glifosato.

Os dois compostos foram colocados separadamente no interior do modelo da EPSPS de *Oriza sativa*, em uma posição análoga àquela ocupada pelo S3P e o glifosato na estrutura cristalográfica 1G6S (SCHÖNBRUNN et al., 2001). As estruturas dos compostos **1** e **2** foram construídas no interior do sítio ativo com o programa Spartan`02 (Wavefunction, Inc) a partir das estruturas do S3P e do glifosato, fazendo-se as modificações de forma incremental e otimizando-se a geometria do ligante a cada passo com o método MMFF. Após essa etapa prévia de construção de cada estrutura, os sítios ativos contendo os compostos **1** e **2** foram selecionados e reotimizados com o método PM3 do programa Mopac 2002, com o mesmo protocolo descrito para o estudo dos mecanismos de reação. Foi utilizado o método COSMO para simular efeitos de solvente e também o método de escalonamento linear MOZYME para reduzir o tempo de cálculo.

4.7. MÉTODOS DE CÁLCULO

4.7.1. A EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER

Segundo a Mecânica Quântica, qualquer estado de um sistema físico com \mathbf{q} partículas pode ser descrito por uma função de onda Ψ e cada grandeza física do sistema corresponde a um operador a ser aplicado sobre esta função. No presente trabalho, o operador de interesse é o Hamiltoniano \mathbf{H} associado à energia do sistema através do formalismo proposto por Erwin Schrödinger. Nesta formulação, o estado físico de um sistema com q partículas, em um tempo t , é descrito pela função de onda Ψ que obedece à equação de Schrödinger dependente do tempo (TANNOUDI *et al.*, 1997).

$$\mathbf{H}\Psi(\mathbf{q}_i, t) = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{q}_i, t) \quad (1)$$

onde $\mathbf{q}_i, i = 1, \dots, 3q$, representam as coordenadas espaciais dos elétrons e dos núcleos. O Hamiltoniano \mathbf{H} é o operador hermitiano correspondente à energia total do sistema.

Quando \mathbf{H} independe do tempo, obtém-se soluções estacionárias, $\mathbf{y}(\mathbf{q}_i)$, independentes do tempo, através de

$$\mathbf{H}\mathbf{y}(\mathbf{q}_i) = E\mathbf{y}(\mathbf{q}_i) \quad (2)$$

que levam à $\Psi(\mathbf{q}_i, t)$ pela relação

$$\Psi(\mathbf{q}_i, t) = \mathbf{y}(\mathbf{q}_i) \exp\left(-\frac{iEt}{\hbar}\right). \quad (3)$$

A equação de Schrödinger independente do tempo $\mathbf{H}\mathbf{y}(\mathbf{q}_i) = E\mathbf{y}(\mathbf{q}_i)$ é uma equação diferencial de autovalores E e autofunções $\mathbf{y}(\mathbf{q}_i)$. Os autovalores E são os valores permitidos

de energia para o sistema. As correspondentes funções de onda $\mathbf{y}(\mathbf{q}_i)$ são as autofunções do operador Hamiltoniano \mathbf{H} . Essa equação é de difícil resolução e poucos são os problemas que possuem soluções exatas. Pode-se, no entanto, recorrer a métodos aproximados de solução.

O primeiro passo para resolver a equação de Schrödinger independente do tempo é obter o operador Hamiltoniano \mathbf{H} do sistema e o segundo passo é impor condições de contorno (Y limitada e contínua) o que leva à obtenção dos autovalores de energia E (GEORGE, 1992).

4.7.2. UM SISTEMA DE M NÚCLEOS E N ELÉTRONS

Para um sistema de M núcleos e N elétrons, o operador Hamiltoniano deverá conter interações coulombianas elétron-elétron, elétron-núcleo, núcleo-núcleo, além da energia cinética de cada elétron e de cada núcleo. A equação (4) mostra o operador Hamiltoniano para um sistema com M núcleos e N elétrons.

$$\mathbf{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{A=1}^M \left(\frac{1}{m_A} \nabla_A^2 \right) - \frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^N \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 + \sum_{B=1}^M \sum_{A \neq B} \frac{Z_A Z_B e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{AB}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{iA}} + \sum_{j=1}^N \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (4)$$

Os termos da equação (4) representam, respectivamente, a energia cinética dos núcleos, a energia cinética dos elétrons, a energia potencial de repulsão entre os núcleos, a energia potencial de atração entre os elétrons e cada um dos núcleos e a energia potencial de repulsão entre os elétrons. Os índices A e B estão relacionados aos núcleos, i e j estão relacionados aos elétrons; \mathbf{r}_i e \mathbf{r}_A representam, respectivamente, as posições de elétrons e núcleos e constituem o conjunto \mathbf{q}_i .

4.7.3. APROXIMAÇÃO DE BORN-OPPENHEIMER

Como a massa do núcleo é muito maior que a massa do elétron, este responde quase instantaneamente às interações com os núcleos. Por isso, foi proposto resolver a equação de Schrödinger para os elétrons, considerando os núcleos fixos em um determinado arranjo, isto é, com um potencial eletrostático núcleo-núcleo constante e energia cinética dos núcleos igual a zero (BORN e OPPENHEIMER, 1927). Com essa aproximação, o Hamiltoniano mostrado na equação (4) é reduzido para \mathbf{H}_e mostrado na equação abaixo.

$$\mathbf{H}_e = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^N \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{iA}} + \sum_{j=1}^N \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (5)$$

O hamiltoniano escrito na forma da equação (5) é chamado de Hamiltoniano eletrônico, que em unidade atômicas é dado por

$$\mathbf{H}_e = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{j=1}^N \sum_{i \neq j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (6)$$

Utilizando o Hamiltoniano eletrônico, a equação de Schrödinger pode ser escrita como

$$\mathbf{H}_e \mathbf{y}_e = E_e \mathbf{y}_e \quad (7)$$

A energia total do sistema (E_{tot}) é a soma entre a energia eletrônica (E_e) e o termo constante de interação entre os núcleos (E_{nuc}).

$$E_{\text{tot}} = (E_e) + (E_{\text{nuc}}) \quad (8)$$

onde

$$E_{\text{nuc}} = \sum_{B=1}^M \sum_{A \in B} \frac{Z_A Z_B e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{AB}} \quad (9)$$

4.7.4. DETERMINANTE DE SLATER

Foi proposto que a função de onda ψ_e pode ser escrita como o produto de funções monoelétrônicas $\psi_e = \psi_i(r_i)$, isto é

$$\psi_i(r_i) = c_1(r_1) c_2(r_2) c_3(r_3) \dots c_N(r_N) \quad (10)$$

onde r_i representa o i -ésimo elétron.

Levando em conta que elétrons são férmions, a função de onda deve ser antissimétrica com relação à troca das coordenadas de quaisquer duas partículas, concordando com o princípio de Pauli. A função (10) não tem essa propriedade e, por isso, Slater (SLATER, 1929) propôs que poderíamos escrever a função de onda para um sistema de N elétrons, com spin-orbitais c_1, \dots, c_N como um determinante

$$\psi(r_1, \dots, r_N) = f_{\text{SD}} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} c_1(r_1) & \dots & c_1(r_N) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_N(r_1) & \dots & c_N(r_N) \end{vmatrix} \quad (11)$$

onde $c_i(r_i)$ são funções de coordenadas espaciais e de spins de um único elétron.

As coordenadas espaciais e de spin são separadas através das relações

$$c_i(\mathbf{r}_i) = \phi_p(\mathbf{r}_i)\alpha \text{ ou } c_i(\mathbf{r}_i) = \phi_p(\mathbf{r}_i)\beta \quad (12)$$

onde ϕ_p representam os orbitais moleculares, α representa a auto-função de spin com auto-valor $+1/2$ para o operador projeção de spin no eixo z e β representa a auto-função de spin com auto-valor $-1/2$, para o operador projeção de spin também no eixo z. A constante $1/(N!)^{1/2}$ é introduzida para garantir a normalização da \mathbf{y} . Os spin-orbitais moleculares são ortogonais e também normalizados.

No determinante acima, as colunas mantêm fixas as coordenadas eletrônicas \mathbf{r}_i , enquanto que nas linhas fixam-se os índices $1, \dots, N$ que classificam os spin-orbitais moleculares c_i . No determinante de Slater os índices de orbitais devem ser diferentes quando estão associados a spins diferentes. Portanto dois índices iguais representam a situação de dois elétrons no mesmo conjunto de números quânticos, anulando-se assim o determinante (duas linhas iguais). Se duas colunas são iguais o determinante também se anula. Essa situação representa elétrons na mesma posição do espaço com mesmo spin. Por outro lado, se trocarmos duas colunas ou duas linhas quaisquer, o sinal do determinante muda e a anti-simetria é mantida garantindo o princípio de Pauli.

Outra forma de escrever a função $\mathbf{y}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = f_{SD}$ equivalente ao determinante de Slater é

$$\mathbf{y}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = f_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \sum_{i=1}^{N!} (-1)^{p_i} \mathbf{P}_i \{c_1(\mathbf{r}_1) c_2(\mathbf{r}_2) \dots c_N(\mathbf{r}_N)\} \quad (13)$$

onde \mathbf{P}_i é o operador que gera a i -ésima permutação dos índices de \mathbf{r} e p_i é o número de trocas necessárias para transformar a seqüência original 1, 2, 3,..., N na i -ésima permutação (MORGON e COUTINHO, 2007).

A energia eletrônica E_e que corresponde às contribuições devido a energia cinética dos elétrons, as contribuições devido a interação dos elétrons com os núcleos e devido as interações entre os elétrons é dado pelo valor esperado do Hamiltoniano eletrônico, mostrado na equação (14).

$$E_e = \langle f_{SD} | \mathbf{H}_e | f_{SD} \rangle \quad (14)$$

Substituindo \mathbf{H}_e pela igualdade da equação (6) obtemos a equação (15) abaixo.

$$E_e = \langle f_{SD} | \left[-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^N \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A e^2}{4\pi \epsilon_0 \mathbf{r}_{iA}} + \sum_{j=1}^N \sum_{i \langle j} \frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 \mathbf{r}_{ij}} \right] | f_{SD} \rangle \quad (15)$$

Substituindo f_{SD} da equação (15) pelo lado direito da equação (13), a energia eletrônica pode ser escrita como

$$E_e = \sum_{i=1}^N \langle \chi_a | \left(-\frac{1}{2} \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{\mathbf{r}_{iA}} \right) | \chi_a \rangle + \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N \left[\langle \chi_a(1) \chi_b(2) | \frac{1}{\mathbf{r}_{12}} | \chi_a(1) \chi_b(2) \rangle - \langle \chi_a(1) \chi_b(2) | \frac{1}{\mathbf{r}_{12}} | \chi_b(1) \chi_a(2) \rangle \right] \quad (16)$$

Usando a notação

$$\langle \chi_a | \left(-\frac{1}{2} \frac{1}{m_e} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{\mathbf{r}_{iA}} \right) | \chi_a \rangle = \langle \mathbf{a} | \mathbf{h}_a | \mathbf{a} \rangle \quad (17)$$

e

$\langle \mathbf{ab} | \mathbf{cd} \rangle = \langle \chi_a(1) \chi_b(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_c(1) \chi_d(2) \rangle$, a equação (16) pode ser escrita como

$$E_e = \sum_{a=1}^N \langle \mathbf{a} | \mathbf{h}_a | \mathbf{a} \rangle + \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N [\langle \mathbf{ab} | \mathbf{ab} \rangle - \langle \mathbf{ab} | \mathbf{ba} \rangle] \quad (18)$$

4.7.5. A EQUAÇÃO DE HARTREE-FOCK

Na metodologia de Hartree-Fock foi definido um funcional que é um operador \mathbf{f} tal que

$$\mathbf{f}_a = \mathbf{h}_a + \sum_{b=1}^N (\mathbf{J}_b - \mathbf{K}_b) \quad (19)$$

onde

$$\mathbf{J}_b = \langle \chi_b(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_b(2) \rangle \quad (20)$$

é o operador de Coulomb,

$$\mathbf{K}_b = \langle \chi_b(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_a(2) \rangle \quad (21)$$

é o operador de troca.

Os spins-orbitais $|\chi_a\rangle$ são soluções da equação

$$\mathbf{f}_a |\chi_a\rangle = \varepsilon_a |\chi_a\rangle \quad (22)$$

que é a equação de Hartree-Fock.

As energias dos spins-orbitais ε_a e dado pelo valor esperado do operador de Fock que é

$$\varepsilon_a = \langle \chi_a | \mathbf{f}_a | \chi_a \rangle \quad (23)$$

Substituindo a equação do operador de Fock mostrada na equação (19) na expressão (23), pode-se escrever a energia do spin-orbital como

$$\varepsilon_a = \langle \chi_a | \{ \mathbf{h}_a + \sum_{b=1}^N (\mathbf{J}_b - \mathbf{K}_b) \} | \chi_a \rangle \quad (24)$$

Usando a notação introduzida na equação (17) e as expressões dos operadores de Coulomb (\mathbf{J}_b) e de Troca (\mathbf{K}_b), dados pelas equações (20) e (21), substituídos na equação (24) pode-se escrever a energia dos spins-orbitais como

$$\varepsilon_a = \langle a | \mathbf{h}_a | a \rangle + \sum_{b=1}^N [\langle \mathbf{ab} | \mathbf{ab} \rangle - \langle \mathbf{ab} | \mathbf{ba} \rangle] \quad (25)$$

Usando a energia dos spins-orbitais dado pela equação (25), a equação (18) que é a expressão da energia eletrônica E_e do sistema, pode ser reescrita como

$$E_e = \sum_{a=1}^N \varepsilon_a - \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N [\langle \mathbf{ab} | \mathbf{ab} \rangle - \langle \mathbf{ab} | \mathbf{ba} \rangle] \quad (26)$$

A equação (26) dá a energia eletrônica no método de Hartree-Fock. Observando essa equação podemos constatar que a energia eletrônica não é igual à soma das energias dos orbitais. A soma das energias dos orbitais implica em contar a energia de repulsão elétron-elétron duas vezes. Por isso ela tem que ser subtraída da energia eletrônica.

4.7.6. EQUAÇÃO DE HARTREE-FOCK PARA CAMADAS FECHADAS

Supondo que cada orbital molecular (ϕ_p) está ocupado por um elétron α e outro elétron β , então a equação de Hartree-fock pode ser escrita separando as partes espaciais e de spins como mostrado na equação (12).

Os spins-orbitais $c_i(\mathbf{r}_i)$ podem ser escritos em função dos orbitais moleculares (ϕ_p) das auto-funções de spin como

$$c_i(\mathbf{r}_i) = \phi_p(\mathbf{r}_i)\alpha \text{ ou } c_i(\mathbf{r}_i) = \phi_p(\mathbf{r}_i)\beta.$$

Na metodologia de Hartree-Fock também foi definido um funcional para camada fechada que é um operador \mathbf{f}_p , tal que

$$\mathbf{f}_p = \mathbf{h}_p + \sum_{q=1}^N (2\mathbf{J}_q - \mathbf{K}_q). \quad (27)$$

O termo \mathbf{J}_q é o operador de Coulomb para camadas fechadas, dado pela expressão

$$\mathbf{J}_q = \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_q \rangle. \quad (28)$$

Já o termo \mathbf{K}_b é o operador de troca para camadas fechadas e sua expressão é

$$\mathbf{K}_b = \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_p \rangle. \quad (29)$$

Os orbitais moleculares $|\phi_p\rangle$ são soluções da equação

$$\mathbf{f}_p |\phi_p\rangle = \epsilon_q |\phi_p\rangle \quad (30)$$

que é a equação de Hartree-Fock para camadas fechadas.

A energia do orbital molecular para camada fechada ϵ_q é dada pelo valor esperado do operador de Fock \mathbf{f}

$$\varepsilon_q = \langle \phi_p | \mathbf{f} | \phi_p \rangle \quad (31)$$

Substituindo o operador de Fock para camadas fechadas mostrado na equação (27) na equação (31) obtemos

$$\varepsilon_q = \langle \phi_p | [\mathbf{h}_p + \sum_{q=1}^N (2\mathbf{J}_q - \mathbf{K}_q)] | \phi_p \rangle \quad (32)$$

As equações do operador de Coulomb (\mathbf{J}_q) e do operador de Troca (\mathbf{K}_q), dados pelas equações (28) e (29), substituídos na equação (32) permite escrever a energia dos orbitais moleculares como

$$\varepsilon_q = \langle \phi_p | \mathbf{h}_p | \phi_p \rangle + \sum_{q=1}^N [2\langle \phi_p | \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_q \rangle | \phi_p \rangle - \langle \phi_p | \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_p \rangle | \phi_p \rangle] \quad (33)$$

Usando as definições

$$\langle \phi_p | \mathbf{h}_p | \phi_p \rangle = \langle p | \mathbf{h} | p \rangle \text{ e}$$

$$\langle ab | cd \rangle = \langle \phi_a \phi_b | \frac{1}{r_{12}} | \phi_c \phi_d \rangle$$

a equação (33), que dá a energia dos orbitais moleculares, pode ser escrita como

$$\varepsilon_q = \langle p | \mathbf{h} | p \rangle + \sum_{q=1}^N [2\langle pq | pq \rangle - \langle pq | qp \rangle] \quad (34)$$

Considerando que para cada orbital molecular existem duas possibilidades de spins e considerando também que separando os spins orbitais em coordenadas espaciais e de spins, a energia eletrônica para camadas fechadas pode ser escrita partindo da equação (26) como

$$E_e = 2 \sum_p \langle p | \mathbf{h} | p \rangle + \sum_p \sum_q [2\langle pq | pq \rangle - \langle pq | qp \rangle] \quad (35)$$

Os operador de Fock, para camada aberta e para camada fechada, depende das soluções das equações das respectivas equações de Hartree-Fock.

$$\mathbf{f}_p|\phi_p\rangle = \epsilon_q|\phi_p\rangle$$

$$\mathbf{f}_a|\chi_a\rangle = \epsilon_a|\chi_a\rangle$$

Como existe uma equação para cada orbital que depende dos outros orbitais através do operador de Fock, as equações devem ser resolvidas de forma iterativa ou autoconsistente. No final do processo iterativo os orbitais que são soluções das equações de Hartree-fock devem ser os mesmos a partir dos quais se obteve o operador de Fock. Um método para se construir os orbitais moleculares é através da combinação linear de orbitais atômicos (LCAO) formalizada por Roothaan.

4.7.7. MÉTODO DA COMBINAÇÃO LINEAR DE ORBITAIS ATÔMICOS (LCAO)

O método LCAO consiste em expandir os orbitais moleculares $\phi_p(\mathbf{r})$ em termos de orbitais atômicos $\varphi_v(\mathbf{r})$, isto é,

$$\phi_p(\mathbf{r}) = \sum_{v=1}^K C_{vp} \varphi_v(\mathbf{r}) \quad (36)$$

O conjunto $\{\varphi_v(\mathbf{r}), v= 1, 2, 3, \dots, k\}$ é chamado de base atômica e deve ser previamente escolhida e C_{vp} são os coeficientes a serem determinados. Esta aproximação é baseada na observação de que, se um elétron em uma molécula está próximo de um núcleo é esperado que o efeito desse núcleo sobre o elétron seja maior que o efeito devido aos outros núcleos, conseqüentemente é razoável assumir que o orbital molecular deste elétron é similar ao orbital atômico neste ponto.

A função $\varphi_v(\mathbf{r})$ é um orbital atômico centrado num dos átomos da molécula. É possível gerar p orbitais moleculares linearmente independentes a partir da equação (36), pois os orbitais atômicos $\varphi_v(\mathbf{r})$ são linearmente independentes.

Substituindo a expansão da equação (36) na equação de Hartree-Fock de camada fechada temos que

$$\mathbf{f}(\mathbf{r}) \sum_{n=1}^K C_{vp} \varphi_v(\mathbf{r}) = \varepsilon_p \sum_{n=1}^K C_{vp} \varphi_v(\mathbf{r}) \quad (37)$$

Multiplicando a equação (37) pelo complexo conjugado de $\varphi_\mu(\mathbf{r})$ e integrando, temos

$$\sum_{n=1}^K C_{vp} \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) | \mathbf{f}(\mathbf{r}) | \varphi_v(\mathbf{r}) \rangle = \varepsilon_p \sum_{n=1}^K C_{vp} \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) | \varphi_v(\mathbf{r}) \rangle \quad (38)$$

A equação (38) pode ser escrita como

$$\sum_{n=1}^K \mathbf{F}_{\mu\nu} C_{vp} = \varepsilon_p \sum_{n=1}^K \mathbf{S}_{\mu\nu} C_{vp} \quad (39)$$

O termo $\mathbf{S}_{\mu\nu}$ é definido como matriz de recobrimento sendo igual a

$$\mathbf{S}_{\mu\nu} = \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) | \varphi_\nu(\mathbf{r}) \rangle \quad (40)$$

O termo $\mathbf{F}_{\mu\nu}$ é definido como matriz de Fock sendo igual a

$$\mathbf{F}_{\mu\nu} = \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) | \mathbf{f}(\mathbf{r}) | \varphi_\nu(\mathbf{r}) \rangle \quad (41)$$

A equação (39) também pode ser escrita em forma de matriz como

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SCe} \quad (42)$$

Essa equação na forma de matriz é conhecida como equação de Hartree-Fock-Roothaan.

O operador de Fock para camadas fechadas, dado na equação (27), substituído na equação (41) fornece

$$\mathbf{F}_{\mu\nu} = \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \mathbf{h}_p | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle + \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \sum_{q=1}^N (2\mathbf{J}_q - \mathbf{K}_q) | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle \quad (43)$$

Substituindo \mathbf{J}_q e \mathbf{K}_q pelo lado direito das equações (28) e (29), respectivamente, teremos

$$\mathbf{F}_{\mu\nu} = \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \mathbf{h}_p | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle + \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \sum_{q=1}^N 2 \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_q \rangle - \langle \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_p \rangle | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle \quad (44)$$

ou

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{\mu\nu} = & \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \mathbf{h}_p | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle + \sum_{q=1}^N 2 \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \phi_q \rangle \\ & - \sum_{q=1}^N \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) \phi_q | \frac{1}{r_{12}} | \phi_q \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle \end{aligned} \quad (45)$$

Substituindo ϕ_q pela combinação linear de orbitais atômicos, mostrados na equação (36), permite escrever a equação (45) como

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{\mu\nu} = & \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \mathbf{h}_p | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle + 2 \sum_q \sum_{l,s} C_{\lambda q}^* C_{\sigma q} \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) \varphi_{\lambda}(\mathbf{r}) | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \varphi_{\sigma}(\mathbf{r}) \rangle \\ & - \sum_q \sum_{l,s} C_{\lambda q}^* C_{\sigma q} \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) \varphi_{\lambda}(\mathbf{r}) | \frac{1}{r_{12}} | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \varphi_{\sigma}(\mathbf{r}) \rangle \end{aligned} \quad (46)$$

Definindo como elementos da matriz Hamiltoniana do caroço como $\mathbf{H}_{\mu\nu}$ tal que

$$\mathbf{H}_{\mu\nu} = \langle \varphi_{\mu}(\mathbf{r}) | \mathbf{h}_p | \varphi_{\nu}(\mathbf{r}) \rangle \quad (47)$$

Definindo como elementos da matriz densidade como $\mathbf{P}_{\sigma\lambda}$ tal que

$$\mathbf{P}_{\sigma\lambda} = 2 \sum_q C_{\lambda q}^* C_{\sigma q} \quad (48)$$

Substituindo as equações (47) e (48) na equação (46) teremos

$$\mathbf{F}_{\mu\nu} = \mathbf{H}_{\mu\nu} + \mathbf{G}_{\mu\nu} \quad (49)$$

onde o termo $\mathbf{G}_{\mu\nu}$ é

$$\begin{aligned} \mathbf{G}_{\mu\nu} = & \sum_{ls} \mathbf{P}_{\sigma\lambda} \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) \varphi_\lambda(\mathbf{r}) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_\nu(\mathbf{r}) \varphi_\sigma(\mathbf{r}) \rangle \\ & - \sum_{ls} \frac{1}{2} \mathbf{P}_{\sigma\lambda} \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) \varphi_\lambda(\mathbf{r}) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_\sigma(\mathbf{r}) \varphi_\nu(\mathbf{r}) \rangle \end{aligned} \quad (50)$$

Usando as notações

$$\langle \mu\lambda | \nu \sigma \rangle = \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) \varphi_\lambda(\mathbf{r}) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_\nu(\mathbf{r}) \varphi_\sigma(\mathbf{r}) \rangle \text{ e}$$

$$\langle \mu\lambda | \sigma\nu \rangle = \langle \varphi_\mu(\mathbf{r}) \varphi_\lambda(\mathbf{r}) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_\sigma(\mathbf{r}) \varphi_\nu(\mathbf{r}) \rangle$$

A equação (50) pode ser escrita como

$$\mathbf{G}_{\mu\nu} = \sum_{ls} \mathbf{P}_{\sigma\lambda} [\langle \mu\lambda | \nu \sigma \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\lambda | \sigma\nu \rangle] \quad (51)$$

Observando a equação (47) se constata que a matriz de Fock \mathbf{F} depende da matriz dos coeficientes \mathbf{C} de forma que essa equação tem que ser resolvida de forma autoconsistente. Também na maioria dos casos o conjunto de funções da base não são ortogonais de forma que \mathbf{S} não é diagonal. Então é necessário fazer uma transformação linear sobre as funções de base, expandindo os orbitais moleculares em termos de um novo conjunto de funções de base $\{\mathbf{j}_n(\mathbf{r})\}$, tal que

$$\phi_p(\mathbf{r}) = \sum_n C_{vp} \mathbf{j}_n(\mathbf{r}) \quad (52)$$

e

$$\mathbf{j}_n(\mathbf{r}) = \sum_n X_{\sigma n} \phi_n(\mathbf{r}) \quad (53)$$

Substituindo (53) em (52) teremos

$$\phi_p(\mathbf{r}) = \sum_{ns} C'_{vp} X_{\sigma n} \phi_n(\mathbf{r}) \quad (54)$$

Comparando a equação (54) com a equação (36) podemos observar que

$$C_{\sigma p} = \sum_n X_{\sigma n} C'_{vp} \quad (55)$$

A equação (55) pode ser escrita na forma matricial com

$$\mathbf{C} = \mathbf{X} \mathbf{C}' \quad (56)$$

Substituindo a equação (56) na equação de Hartree-Fock-Roothaan (42) e multiplicando pela transposta de \mathbf{X} teremos

$$\mathbf{X}^+ \mathbf{F} \mathbf{X} \mathbf{C}' = \mathbf{X}^+ \mathbf{S} \mathbf{X} \mathbf{C}' \quad (57)$$

Como a matriz \mathbf{S} é hermitiana, é possível encontrar uma transformação \mathbf{X} , tal que $\mathbf{X}^+ \mathbf{S} \mathbf{X}$ seja diagonal. Definindo $\mathbf{F}' = \mathbf{X}^+ \mathbf{F} \mathbf{X}$ como a matriz de Fock transformada, a equação de Hartree-Fock-Roothaan toma a forma

$$\mathbf{F}' \mathbf{C}' = \mathbf{C}' \epsilon \quad (58)$$

A equação (58) é uma equação de auto valor matricial onde \mathbf{F}' depende de \mathbf{C}' e portanto ela deve ser resolvida de forma autoconsistente.

A energia eletrônica do sistema é dado pela equação (35)

$$E_e = 2 \sum_p \langle p | \mathbf{h} | p \rangle + \sum_p \sum_q [2 \langle pq | pq \rangle - \langle pq | qp \rangle]$$

Se nessa equação os orbitais moleculares forem expandidos em termos dos orbitais atômicos (36), teremos

$$E_e = \sum_{\mu\nu} \mathbf{P}_{\mu\nu} \left(\mathbf{H}_{\nu\mu} + \frac{1}{2} \mathbf{G}_{\nu\mu} \right) \quad (59)$$

A equação (59) em forma de matriz pode ser escrita da seguinte forma

$$E_e = \frac{1}{2} \text{tr}[\mathbf{P} (\mathbf{H} + \mathbf{G})] \quad (60)$$

O método SCF torna o trabalho mais simples por considerar um elétron interage com o campo médio formado por todos os outros elétrons em uma molécula. Um cálculo SCF sempre se inicia pela estimativa da função de onda que descreve os orbitais atômicos e suas respectivas repulsões. Baseado nessa estimativa, o programa calcula uma nova função de onda e compararam os dois resultados obtidos. O processo é, então repetido até que o orbital torna-se mais próximo do real, chegando enfim ao ponto em que o limite de convergência é alcançado.

4.7.8. MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS

Mesmo com o aumento da velocidade e memória dos computadores e com o desenvolvimento de algoritmos mais eficientes, a aplicação dos métodos de primeiros princípios em sistemas com um número muito grande de átomos ainda pode levar a tempos de cálculo excessivamente longos. Uma alternativa é utilizar métodos semi-empíricos para resolver de forma autoconsistente e aproximada as equações de Hartree-Fock-Roothann utilizando parâmetros obtidos por ajuste numérico ou derivados de resultados experimentais. Os métodos semi-empíricos permitem reduzir de forma drástica o tempo computacional no

cálculo de estrutura eletrônica em sistemas com muitos átomos como, por exemplo, uma enzima.

Dentre os métodos semi-empíricos, podemos citar o Método de Hückel Simples, Método de Hückel Estendido, o método ZDO (Zero Differential Overlap), o método CNDO (Complete Neglect Differential Overlap), o método INDO (Intermediate Neglect Differential Overlap), o método MNDO (Modified Neglect Differential Overlap), AM1 (Austin Model 1) PM3, PM5 e PM6, além de outros (POPLE E BEVERIDGE, 1970; BALLHAUSEN E GRAY, 1965; LOWE, 1993; MORGON e COUTINHO, 2007)

O método CNDO (POPLE e BEVERIDGE, 1970) tem a tendência de superestimar as repulsões entre átomos. Por isso, foram incluídas funções gaussianas nas integrais de repulsão do caroço, gerando o método AM1 (DEWAR *et al.*, 1985). A estrutura dos algoritmos matemáticos dos métodos AM1, PM3, PM5 e PM6 é a mesma, a diferença está nos método de parametrização e nos parâmetros (DEWAR *et al.*, 1985; STEWART, 1989a; STEWART, 1989b; STEWART, 1999; STEWART, 2007). Neste trabalho utilizamos o método PM3 (STEWART, 1989) disponível no programa Mopac2002 (Fujitsu, Ltd) e os algoritmos matemáticos são descritos abaixo.

O método PM3 usa uma base mínima de funções STO (orbitais do tipo Slater) formada por um orbital s e três orbitais p para cada átomo, com exceção do átomo de hidrogênio que usa apenas um orbital s. Nesse método as integrais de repulsão eletrônica que dependem do overlap de densidade de cargas de orbitais atômicos centrados em átomos diferentes são nulas, isto é

$\langle \mu\nu | \lambda\sigma \rangle \neq 0$, se μ e ν estiverem centrados no átomo A e λ e σ estiverem centrados no átomo B.

A matriz de Fock para sistemas de camadas fechadas é dada pela expressão

$$F_{\mu\mu} = H_{\mu\mu} + \sum_n^A P_{\nu\nu} [\langle \mu\mu | \nu\nu \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\nu | \mu\nu \rangle] + \sum_B \sum_{l,s} P_{\lambda\sigma} \langle \mu\mu | \lambda\sigma \rangle \quad (61)$$

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + P_{\mu\nu} [3 \langle \mu\nu|\mu\nu \rangle - \langle \mu\mu|\nu\nu \rangle] + \sum_B \sum_{I,s}^B P_{\lambda\sigma} \langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle \quad \mu \text{ e } \nu \in A \quad (62)$$

$$F_{\mu\lambda} = H_{\mu\lambda} - \frac{1}{2} \sum_n^A \sum_s^B P_{\nu\sigma} \langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle \quad \mu \in A \text{ e } \lambda \in B \quad (63)$$

onde

$$P_{\lambda\sigma} = \sum_i^{occ} c_{Ii}^* c_{Si} \quad (64)$$

$F_{\mu\mu}$ são os elementos da diagonal da matriz de Fock, isto é quando $\mu = \nu$.

$F_{\mu\nu}$ são os elementos da matriz de Fock que estão fora da diagonal mas os orbitais estão localizados no mesmo centro.

$F_{\mu\nu}$ são os elementos da matriz de Fock que estão fora da diagonal mas os orbitais estão localizados em centros diferentes.

Com o conhecimento dos elementos da matriz de Fock dada pelos algoritmos acima podemos calcular a matriz densidade, a energia total e o calor de formação do sistema. O calor de formação é obtido através de uma transformação da energia total da molécula segundo o algoritmo

$$H_f^{\text{mol}} = E_{\text{tot}} + \sum_A (\Delta H_f^A - E_{el}^A) \quad (65)$$

E_{el} é a energia eletrônica dos átomos, calculada usando os parâmetros ajustáveis ΔH_f^A é o calor de formação experimental dos elementos A em seu estado padrão.

As integrais monoatômicas de repulsão eletrônica são derivadas de dados experimentais.

$$G_{ss} = \langle ss|ss \rangle \quad G_{pp} = \langle pp|pp \rangle \quad G_{sp} = \langle ss|pp \rangle \quad G_{p^2} = \langle pp|p^2 \rangle$$

$$H_{sp} = \langle sp|sp \rangle$$

A fórmula geral para a integral de dois elétrons é dada por

$$\langle \mu\nu | \lambda\sigma \rangle = \sum_{l_1, l_2, m} \frac{e^2}{2^{l_1+l_2}} \left(\sum_{i=1}^{2l_1} \sum_{j=1}^{2l_2} \frac{1}{R_{ij}^2 + (\mathbf{r}_{l_1}^A + \mathbf{r}_{l_2}^B)^{1/2}} \right) \quad (66)$$

Onde R_{ij} é a distância entre as distribuições de cargas i e j , obtidos das distâncias interatômicas entre os átomos A e B.

A integral de um elétron ou hamiltoniano do caroço $H_{\mu\mu}$ é aproximada como a soma de uma parcela que representa a energia cinética parametrizada $U_{\mu\mu}$, somada a uma parcela associada a interação elétron-núcleo calculada a partir das integrais de repulsão eletrônica.

$$H_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} - \sum_{B \neq A} \langle \mu\mu | s_{BSB} \rangle \quad (67)$$

A integral $H_{\mu\mu}$ representa a energia que m elétrons, no orbital ϕ_{μ} , teria se todos os demais elétrons fossem removidos.

Para a integral de um elétron e dois centros o algoritmo é

$$H_{\mu\lambda} = \frac{1}{2} S_{\mu\lambda} (\beta_{\mu} + \beta_{\lambda}) \quad (68)$$

As integrais de repulsão do caroço são calculadas das seguintes formas:

i. Para N-H e O-H

$$E_N(A,H) = Z_A Z_H \langle s_{ASA} | s_H s_H \rangle (1 + R_{AH} e^{-a_A R_{AH}} + e^{-a_H R_{AH}}) \quad (69)$$

ii. Para os demais pares de átomos

$$E_N(A,B) = Z_A Z_B \langle s_{ASA} | s_B s_B \rangle (1 + e^{-a_A R_{AB}} + e^{-a_B R_{AB}}) \quad (70)$$

A diferença entre o método AM1 e o método MNDO é a introdução de gaussianas para corrigir a tendência do método MNDO de superestimar as repulsões entre átomos. Portanto, no método AM1 as integrais de caroço são calculadas da seguinte forma

$$E_N(A,B) = EM^{MNDO}(A,B) + \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \left(\sum_k a_{k_A} e^{b_{k_A} (R_{AB} - c_{k_A})^2} \sum_l a_{l_B} e^{-b_{l_B} (R_{AB} - c_{l_B})^2} \right) \quad (71)$$

Ou

$$E_N(A,B) = Z_A Z_B \langle S_{A_S} | S_B S_B \rangle (1 + e^{-a_A R_{AB}} + e^{-a_B R_{AB}}) + \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \left(\sum_k a_{k_A} e^{b_{k_A} (R_{AB} - c_{k_A})^2} \sum_l a_{l_B} e^{-b_{l_B} (R_{AB} - c_{l_B})^2} \right) \quad (72)$$

onde a , b e c são coeficientes ajustáveis que definem respectivamente a intensidade, largura e posição das funções gaussianas.

O método PM3 usa o mesmo formalismo matemático do AM1. A diferença entre eles é que no método AM1 são usadas duas gaussianas para cada átomo enquanto que no PM3 são usadas entre duas e quatro gaussianas para cada átomo. Além disso, no PM3 os parâmetros foram obtidos com técnicas mais aprimoradas.

4.7.9. MÉTODO DE ESCALONAMENTO LINEAR MOZYME

O tempo computacional de cálculos semi-empíricos para sistemas como, por exemplo, uma enzima; está limitada pelo número de bases matemáticas utilizadas para descrever os orbitais atômicos e conseqüentemente também está limitado pelo número de átomos do sistema. Nesse trabalho foi usado o método de Hartree-Fock com os parâmetros PM3 para resolver a equação de Schrödinger de forma auto-consistente. Os orbitais moleculares são gerados pela combinação linear dos orbitais atômicos e através da diagonalização da matriz de

Fock são usados para construir a matriz densidade. Devido ao fato dos orbitais moleculares serem estendidos sobre toda a molécula e do cálculo ser auto-consistente, o tempo computacional é proporcional a N^3 , onde N é o número de bases matemáticas usadas para descrever os orbitais atômicos. Na construção de um orbital molecular, as maiores contribuições são devido a um, dois ou no máximo três átomos, enquanto as contribuições dos outros átomos do sistema são menores. Essas contribuições dos átomos restantes são pequenas e têm valores iguais ou próximos de zero quando envolvem átomos que estão a nove ou mais comprimentos de ligação. Embora próximas de zero, a existência dessas contribuições são responsáveis por quase todo o tempo computacional gasto na manipulação matemática dos orbitais moleculares. A técnica do orbital molecular localizado inclui apenas contribuições em uma região da molécula. Nesse trabalho foi utilizada a distância de corte padrão do MOZYME, que é de 12 Å.

4.7.10. O MODELO DE EFEITO DE SOLVENTE COSMO

O COSMO é um método que pertence aos modelos de solvatação de contínuo. Trata-se de um método computacional bastante eficiente para simular um meio contínuo como, por exemplo, um solvente dentro do qual está se executando uma reação química. Assume-se que o solvente alcança a “superfície” da cavidade onde se encerra a molécula, constituída de esferas aproximadas por pequenos políedros, nas distâncias atômicas de van der Waals. Se o solvente fosse um condutor ideal, o potencial elétrico na superfície deveria desaparecer. Se a distribuição da carga em uma molécula for conhecida, então deve ser possível calcular a carga q^* na superfície. Para solventes reais, pode-se assumir que a carga q é igual a q^* multiplicado por um fator f , dependente da constante dielétrica do meio,

$$f(\epsilon) = \frac{(\epsilon - 1)}{(\epsilon + 0,5)} \quad (73)$$

Assim, a partir das cargas q na superfície e das cargas da molécula, pode-se calcular a energia de interação entre o solvente e a molécula solvatada. A expressão para a energia de blindagem total é simples o suficiente para permitir que as derivadas primeiras da energia em função das coordenadas atômicas sejam facilmente calculadas.

Nesse trabalho todos os cálculos foram executados simulando efeito de solvente com água utilizando o modelo COSMO com constante dielétrica $\epsilon = 74,8$. Embora a constante dielétrica no interior de enzimas possa ser diferente da constante da água, consideramos o uso deste valor de ϵ mais adequado, devido à proximidade do sítio ativo da EPSPS do solvente externo.

5. RESULTADOS

5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nessa parte do trabalho são apresentados os resultados sobre o estudo dos estados de protonação de alguns resíduos de aminoácidos da EPSPS de *Escherichia coli* e da simulação computacional da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *O. sativa*.

Inicialmente, são apresentados os resultados comparando os cálculos com os estados de protonação de resíduos de aminoácidos, obtidos com o método PM3, com os resultados experimentais obtidos por difração de nêutrons. Esses cálculos foram executados com a intenção de validar o método PM3 para avaliar estados de protonação em enzimas. A seguir, são apresentados os resultados do estudo dos estados de protonação de quatro resíduos do sítio ativo da EPSPS de *E. coli*: His385, Lys22, Lys340 e Lys411. Para estudar os estados de protonação desses aminoácidos foi utilizada a estrutura cristalográfica 1Q36 depositada no *Protein Data Bank* (ESCHENBURG *et al.*, 2003). Os resultados dos estudos sobre os estados de protonação foram utilizados na simulação da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *O. sativa*. Para realizar as simulações computacionais da etapa de eliminação entre o S3P e o PEP foram escolhidos aminoácidos que estão próximos ao IT no sítio ativo e que podem atuar como ácido ou base nessa etapa, levando à formação do produto EPSP. As análises dos resultados foram realizadas através de superfícies de entalpia em função das coordenadas de reações.

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PM3 PARA AVALIAR ESTADOS DE PROTONAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM ENZIMAS

Nessa parte do trabalho são comparados os resultados obtidos com o método PM3 com os dados experimentais obtidos por difração de nêutrons, que possibilita a localização dos átomos de hidrogênio na estrutura. As comparações foram feitas por sobreposição das estruturas experimentais com as otimizadas com o PM3 e da análise de distâncias de ligação (SOUZA e SANT'ANNA, 2008).

O resíduo de aminoácido Lys149 da *D*-xilose isomerase (2GVE) (KATZ *et al.*, 2006) foi selecionado por estar em contato com dois resíduos neutros e um carregado. A Tabela 5.1 mostra as distâncias utilizadas na análise dos resultados, que incluíram 3 diferentes orientações do grupo amino de Lys149 em relação aos outros resíduos de aminoácido, no caso da lisina estar neutra.

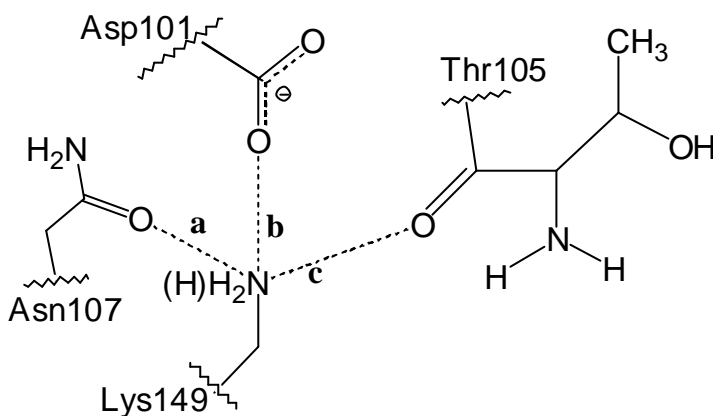


Tabela 5.1 Comparação dos dados das estruturas otimizadas (método PM3) com os resultados de difração de nêutrons (estrutura 2GEV depositada no PDB)

Distância*	Experimental	Lys149 protonada	Lys149 neutra	Lys149 neutra	Lys149 neutra
a	2,58	2,77	5,85	3,58	3,94
b	2,98	2,74	3,69	4,65	2,82
c	2,99	2,79	2,85	3,83	3,42

*Todos os valores em Å.

Observando-se a Tabela 5.1, pode ser constatado que quando a Lys149 está protonada as distâncias são mais curtas e próximas dos valores experimentais. Os resultados obtidos com o método PM3 sugerem que a Lys149 está protonada, de acordo com o observado experimentalmente por difração de nêutrons.

Dois outros modelos foram construídos a partir da estrutura da β -tripsina (1NTP) (KOSSIAKOFF., 1984). Um desses modelos foi construído a partir do resíduo His57 e o outro a partir do resíduo His40. O resíduo His57 foi escolhido porque está próximo de dois grupos aniônicos, um carboxilato e grupo fosfato, enquanto que o resíduo His40 foi escolhido porque está próximo a dois resíduos neutros. Três possíveis estados de protonação para as histidinas foram modelados: duas formas neutras, uma com o átomo de N^ε com hidrogênio e a outra com o átomo N^δ com hidrogênio, e uma terceira, catiônica, com ambos os átomos de nitrogênio protonados. A Tabela 5.2 mostra esses modelos e, em destaque, as distâncias **a**, **b**, **c** e **d** que foram utilizadas na comparação dos resultados otimizados com aqueles obtidos experimentalmente.

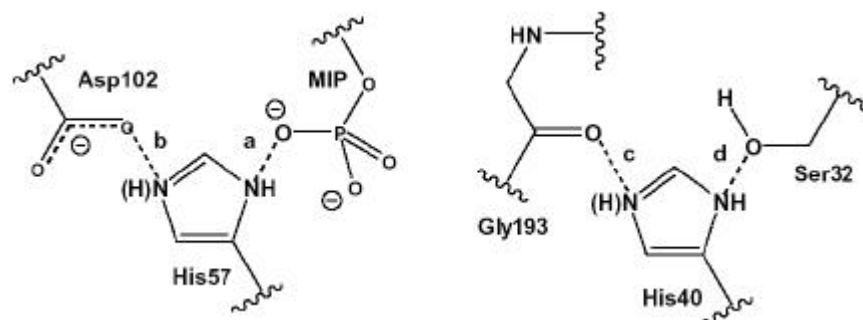


Tabela 5.2 Comparação dos dados das estruturas otimizadas (método PM3) com os resultados de difração de nêutrons (estrutura 1NTP depositada no PDB)

Distância*	Experimental	His57	His57	His57	His40	His40	His40
		protonada	(N ^ε)	(N ^δ)	protonada	(N ^ε)	(N ^δ)
			neutra	neutra		neutra	neutra
a	2,63	2,72	2,35	3,37	-	-	-
b	2,48	2,69	3,64	2,80	-	-	-
c	2,67	-	-	-	2,84	2,89	3,89
d	2,59	-	-	-	2,76	2,74	3,31

*Todos os valores em Å.

Observando a Tabela 5.2, pode ser constatado que quando a His57 está protonada (estado catiônico) as distâncias **a** e **b** são, em geral, mais próximas dos valores experimentais de difração de nêutrons. Esses resultados obtidos com o método PM3 sugerem que a His57 está protonada, o que concorda com os resultados obtidos por a difração de nêutrons.

A Tabela 5.2 também mostra que para a His40 os valores otimizados das distâncias **c** e **d** são maiores do que o valor experimental, para todos os estados de protonação. Além disso, tanto para o estado catiônico quanto para o neutro com o átomo N^ε com hidrogênio, as distâncias **c** e **d** tem valores muito próximos, o que conduz a conclusões similares quando

comparados com os experimentais, não sendo possível definir o estado de protonação de forma inambígua para este resíduo com os resultados da modelagem. Este resultado sugere que a definição do estado de protonação de resíduos de His, quando somente interagindo com grupos neutros, com é o caso de His40, deve ser usado com cautela.

5.3. AVALIAÇÃO DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS DO SÍTIO ATIVO

A análise dos resultados para a identificação da estrutura mais adequada para descrever os estados de protonação da enzima EPSPS de *E. coli* foi realizada por comparação das 16 estruturas, cujos estados de protonação foram permutados, com a estrutura cristalográfica da enzima nativa. Foi observado que a posição do IT e dos resíduos de aminoácidos Thr412, His385, Glu341, Lys411, Lys340, Asn336 e Lys22 eram as mais adequadas para a definição do estado de protonação que melhor representa a estrutura experimental, pela análise das distâncias mostradas na Figura 5.1 (SOUZA e SANT'ANNA, 2008).

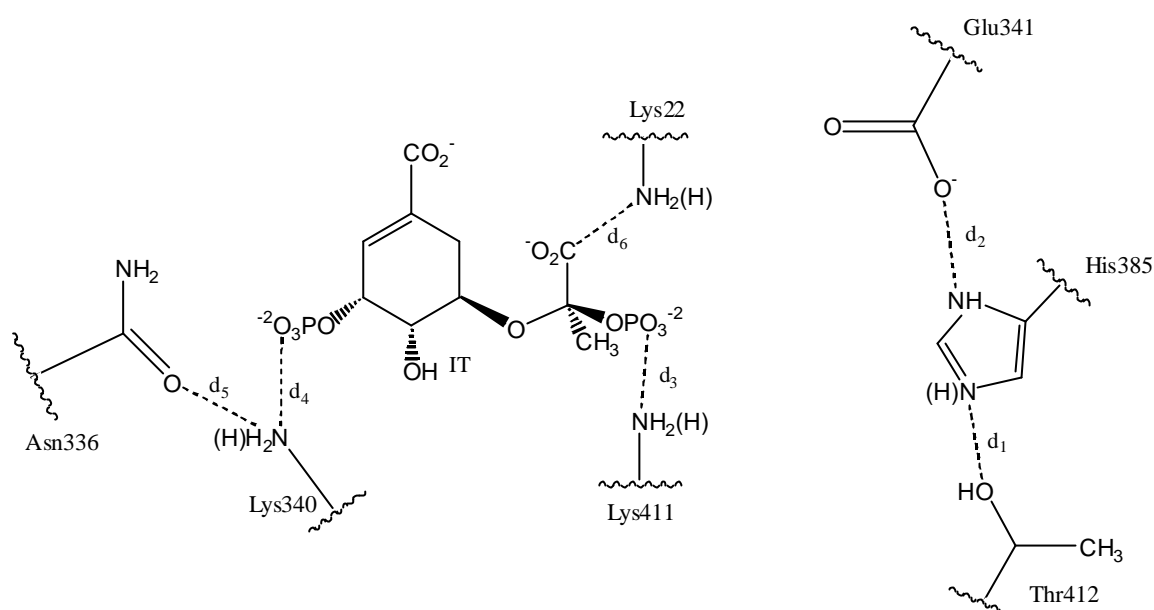


Figura 5.1 Intermediário tetraédrico (IT) e as distâncias importantes na definição do estado de protonação que melhor representa a estrutura nativa observada experimentalmente.

A Tabela 5.3 mostra os 16 modelos com as respectivas permutações dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos His385, Lys22, Lys340 e Lys411. Nas seis últimas colunas da Tabela 5.3 são mostradas, respectivamente as distâncias obtidas após a otimização de cada modelo. Na última linha da Tabela 5.3 são mostrados os valores experimentais, obtidos por cristalografia de raios-X, para as distâncias avaliadas.

Tabela 5.3 Modelos com as respectivas permutações dos estados de protonação dos resíduos His385, Lys22, Lys340 e Lys411 e as distâncias d_1 , d_2 , d_3 , d_4 , d_5 , e d_6 usadas para avaliar os estados de protonação da estrutura cristalográfica da EPSPS de *E. coli*.

Estruturas ^a	Resíduos básicos				Distâncias					
	His385	Lys22	Lys340	Lys411	d_1	d_2	d_3	d_4	d_5	d_6
1	P	N	N	N	2,72	2,45	3,91	2,82	3,80	3,81
2	N	N	N	N	2,80	2,54	3,46	3,42	3,58	3,74
3	N	N	N	P	2,76	2,68	2,72	2,82	3,80	4,10
4	P	N	N	P	2,69	2,61	2,70	2,82	3,68	4,13
5	P	P	N	N	2,71	2,45	3,78	3,53	3,48	2,81
6	N	P	N	N	2,78	2,59	4,08	3,48	3,50	2,79
7	N	P	N	P	2,75	2,68	2,71	2,83	3,66	2,81
8	P	P	N	P	2,70	2,61	2,69	2,81	3,54	2,81
9	P	N	P	N	2,70	2,47	4,06	2,66	2,76	3,93
10	N	N	P	N	2,78	2,57	4,15	2,66	2,77	3,81
11	N	N	P	P	2,76	2,70	2,72	2,65	2,76	4,16
12	P	N	P	P	2,67	2,62	2,71	2,64	2,75	3,96
13	P	P	P	N	2,71	2,48	4,03	2,66	2,75	2,80
14	N	P	P	N	2,77	2,58	4,08	2,66	2,76	2,80
15	N	P	P	P	2,74	2,70	2,72	2,65	2,74	2,82
16	P	P	P	P	2,69	2,63	2,70	2,66	2,73	2,82
Média Prot.					2,70	2,54	2,71	2,66	2,75	2,81
Média neutra					2,77	2,74	3,94	3,07	3,63	3,96
15W ^b					2,78	2,68	2,64	2,72	2,71	2,76
experimental					2,80	2,71	2,88	2,62	2,89	2,66

^a Distâncias d_1 a d_6 em Å. ^b Modelo 15 otimizado com o modelo COSMO.

A definição do estado de protonação da His385 foi feita pela análise das distâncias d_1 e d_2 . Quando as distâncias d_1 , calculadas para cada modelo, são comparadas com a distância experimental, pode ser constatado que os modelos com a His385 neutra representam melhor a enzima nativa. A média dos valores da distância d_1 quando a His385 está protonada é 2,70 Å, enquanto que a média dessa distância com esse resíduo no estado neutro é 2,77 Å, mais próxima do valor experimental (2,80 Å). Observando-se os valores da distância d_2 , constata-se que nos modelos com a His385 neutra eles são mais próximos do valor experimental (2,71 Å). A média dos valores da distância d_2 quando a His385 está protonada é 2,54 Å, enquanto que a média dessa distância com esse resíduo no estado neutro é 2,74 Å. Pelo que foi discutido no item 5.2, essa segunda distância é um critério mais confiável para definir o estado de protonação de histidinas, porque envolve a interação com um grupo aniônico. Além disso, ao se visualizar os resíduos de aminoácidos dos modelos, pode ser observado que há um resíduo de arginina (Arg386) próximo de His385 (Figura 5.2). Devido ao forte caráter básico ($pK_a = 12,48$), o resíduo Arg386 deve estar protonado no sítio ativo. Assim, se o resíduo His385 estivesse também protonado, haveria forte repulsão eletrostática entre esses dois resíduos. Fica claro, na Figura 5.2, uma maior semelhança entre a estrutura cristalográfica e um modelo onde His385 está neutra (modelo 15); principalmente para a conformação da cadeia lateral de Arg386.

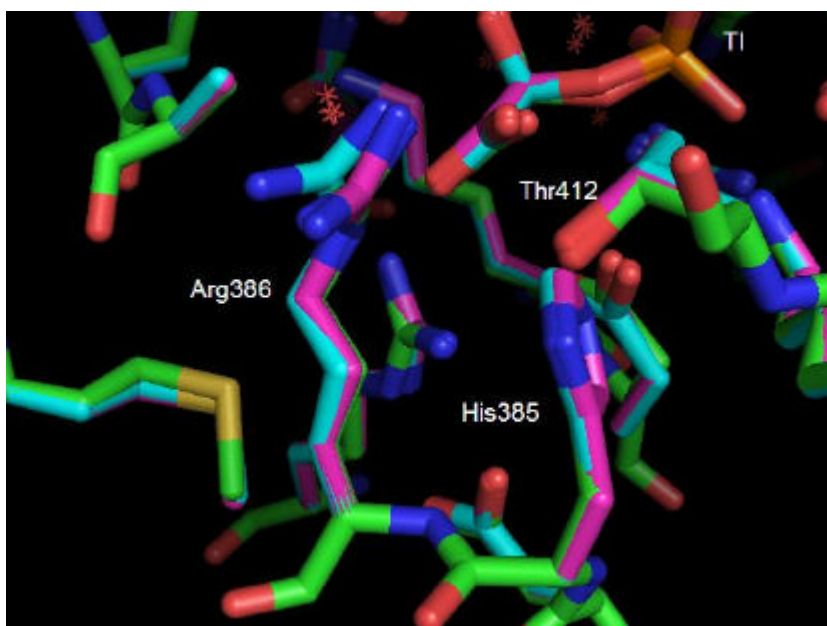


Figura 5.2 Superposição da estrutura cristalográfica (átomos de C em verde) e dos modelos 15 (átomos de C em magenta) e 16 (átomos de C em ciano), destacando o intermediário tetraédrico e os resíduos Arg386, Thr412 e His385.

A avaliação do estado de protonação do resíduo Lys411 foi feita pela análise da distância d_3 . Para Lys411 protonada, os valores de d_3 calculados estão entre 2,69 Å e 2,72 Å, enquanto que para esse resíduo na forma neutra essa distância está entre 3,46 Å e 4,15 Å. A média das distâncias d_3 quando a Lys411 está neutra é 3,94 Å e quando esse resíduo está protonado a média dessa distância é 2,71 Å, embora subestimada, está mais próxima do valor experimental de 2,88 Å.

A avaliação do estado de protonação do resíduo Lys340 foi feita através das análises das distâncias d_4 e d_5 . Para esse resíduo protonado os valores da distância d_4 estão entre 2,64 Å e 2,66 Å (média de 2,65 Å), enquanto para esse resíduo na forma neutra essa distância está entre 2,81 Å e 3,48 Å (média de 3,07 Å). O resíduo protonado resulta em valores mais próximos do valor experimental, que é 2,62 Å. Os valores das distâncias d_5 estão entre 2,73 Å

e 2,77 Å, enquanto para esse resíduo na forma neutra essa distância está entre 3,48 Å e 3,80 Å. A média das distâncias d_5 quando a Lys340 está neutra é 3,63 Å e quando esse resíduo está protonado é 2,75 Å, mais próximo, portanto, do valor experimental, 2,89 Å. As comparações entre os valores otimizados e experimentais das distâncias d_4 e d_5 apontam para o resíduo Lys340 protonado no momento de formação do IT.

A avaliação do estado de protonação do resíduo Lys22 foi decidida através da análise da distância d_6 . Para a Lys22 protonada os valores das distâncias d_6 estão entre 2,79 Å e 2,82 Å (valor médio de 2,81 Å), enquanto para esse resíduo na forma neutra a distância está entre 3,79 Å e 4,16 Å (valor médio de 3,96 Å). A distância na estrutura cristalográfica é de 2,66 Å. Esse resultado mostra que o resíduo Lys22 protonado representa melhor a estrutura cristalográfica experimental. As análises indicam que o modelo 15 representa melhor a estrutura cristalográfica experimental e corresponde a His385 neutra e as três lisinas protonadas.

O modelo 15 teve sua energia minimizada simulando água como solvente com o método COSMO. As distâncias para essa simulação são mostradas na penúltima linha da Tabela 5.3. Ao comparar essas distâncias com as obtidas em fase gasosa e com a estrutura experimental, pode ser constatado que as distâncias obtidas usando água como solvente conduzem ao mesmo resultado sobre os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos estudados.

Em resumo, a comparação entre os valores das distâncias otimizadas e aquelas obtidas por cristalografia de raios-X permite concluir que, no momento de formação do IT, o resíduo His385 está neutro, enquanto os resíduos das Lys22, Lys340 e Lys411 estão protonados (SOUZA e SANT'ANNA., 2008).

5.4. MODELO POR HOMOLOGIA DA ENZIMA EPSPS DE *Oryza sativa*

Os valores de RMSD para os átomos C α , entre o modelo e a cadeia A da estrutura 1X8R e a cadeia A da estrutura 1G6S foram, respectivamente, 0,27 Å e 0,23 Å. Há duas inserções de resíduos na seqüência da EPSPS de *O. sativa*: Lys90-Asp91-Ala92-Asp93 e Gly311-Pro313-Arg314-Glu315-Pro316-Tyr317-Gly318 as quais foram modeladas como laços na superfície da enzima, longe do sítio ativo. O escore Z para todos os ângulos diedros impróprios da estrutura estão dentro dos limites normais. Comprimentos de ligação e ângulos foram encontrados com desvios padrões normais. O escore que representa quão bem as conformações da cadeia principal de todos os resíduos estão nas áreas permitidas do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN e SASISKEHARAN., 1968) está dentro dos limites esperados para modelos bem refinados.

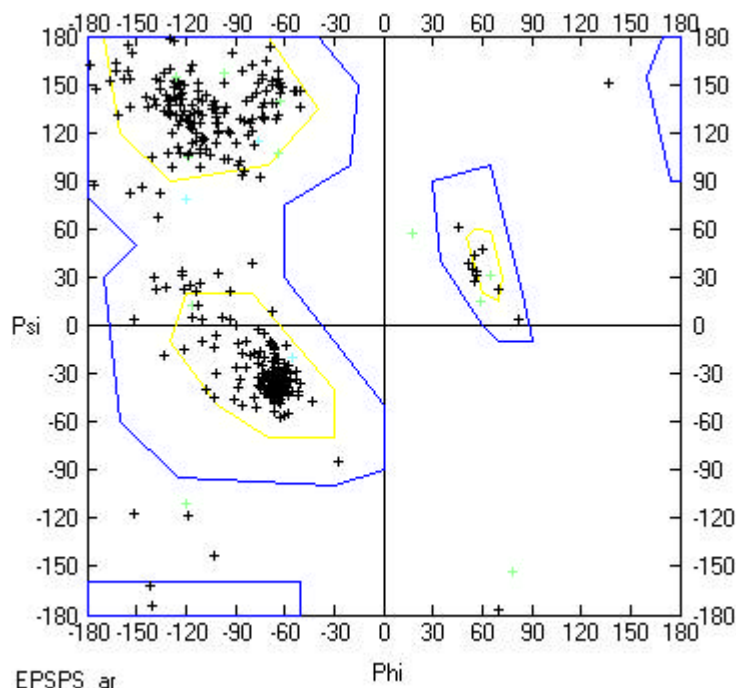


Figura 5.3 Gráfico de Ramachandran do modelo homólogo da *O. sativa*. As cruzes em ciano e verde representam resíduos localizados nas seqüências de inserção.

Ignorando os resíduos de glicina e prolina, apenas oito resíduos estão localizados fora das áreas permitidas. São eles: Glu89, Lys93, Asn120, Leu154, Asp205, Lys320, His321 e Lys361. Os resíduos de Leu154 e Lys361 correspondem a resíduos que também estão fora das áreas permitidas nas enzimas moldes (Glu144 e Lys340). Os resíduos Glu89, Lys93 e Lys340 estão localizados nos laços de inserção. Nenhum dos três resíduos remanescentes estão perto da área do sítio ativo que é a região importante para as simulações computacionais da reação.

5.5. MECANISMOS DE REAÇÃO

Após definição dos estados de protonação dos resíduos básicos do sítio ativo da EPSPS e da construção do modelo homólogo da enzima de uma espécie vegetal, *O. sativa*, tendo como moldes as estruturas cristalográficas 1X8R e 1G6S, foi desenvolvido o estudo dos possíveis mecanismos da etapa de eliminação da reação. Esses resultados são discutidos separadamente para cada proposta mecanística, seguindo-se de uma comparação final entre eles.

É importante notar que, pela análise das estruturas otimizadas, o resíduo Lys26, que corresponde a Lys22 na EPSPS de *E. coli*, está do lado oposto de C3'. Logo, esse resíduo não poderia atuar como o ácido que protona o metileno do PEP na etapa de adição, como sugerido na literatura (ESCHENBURG et al., 2003; MYZIED et al., 2003). É necessário algum doador de prótons para a formação do IT e o único resíduo que pode atuar como doador de prótons e está do mesmo lado que C3' é Lys361.

Há dois problemas com essa proposta: primeiro, o estudo dos estados de protonação com a enzima mutante de *E. coli* levou à conclusão de que todos os resíduos de lisina estão protonados após a formação do IT, incluindo Lys340, que é o resíduo que corresponde a Lys361; segundo, a distância entre o N da cadeia lateral de Lys361 e C3' é longa no modelo

da EPSPS de *O. sativa*, próxima a 3,5 Å. Entretanto, é fácil aproximar esses átomos através de torções da cadeia lateral do resíduo de lisina, com um baixo custo de energia. Portanto, propomos que tanto a conformação adotada pela cadeia lateral quanto o estado protonado desse resíduo, podem ser resultado de eventos ocorridos após a formação do IT, que podem ter ocorrido, porque a enzima mutante original não foi capaz de concluir a reação, formando EPSP e fosfato. Assim, diferente das outras lisinas, o resíduo Lys361 foi considerado neutro nos cálculos do mecanismo de eliminação com a EPSPS de *O. sativa*, uma vez que ele era o único capaz de ser o ácido que protonou o átomo C3 do PEP na etapa de adição.

5.5.1. GLU362 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

No modelo construído da EPSPS de *O. sativa*, um dos oxigênios do resíduo Glu362 está a uma distância de 2,26 Å de um dos hidrogênios da metila do IT conforme mostrado na Figura 5.4.

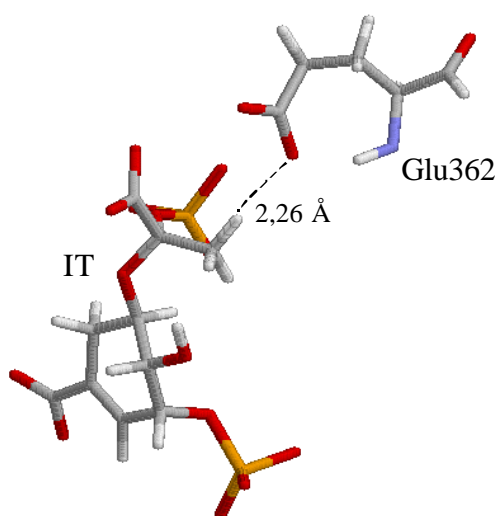


Figura 5.4 Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Glu362 no modelo da EPSPS de *O. sativa*; os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.

A essa distância, Glu362, na forma aniônica, torna-se um potencial candidato a ser a base que abstrai um hidrogênio da metila provocando a saída do fosfato inorgânico e levando à formação da dupla ligação do produto EPSP.

A Figura 5.5 mostra um esquema desse mecanismo proposto submetido à simulação computacional. A numeração adotada através deste Item e dos próximos é apresentada na figura. A simulação computacional da reação em nosso modelo foi realizada aumentando as distâncias d_1 e d_2 . O aumento de d_1 aproxima um dos hidrogênios do grupo metila do resíduo Glu362 e o aumento de d_2 provoca a saída do grupo fosfato. A permutação dessas distâncias resultou em 50 estruturas cujos calores de formação foram calculados após otimização.

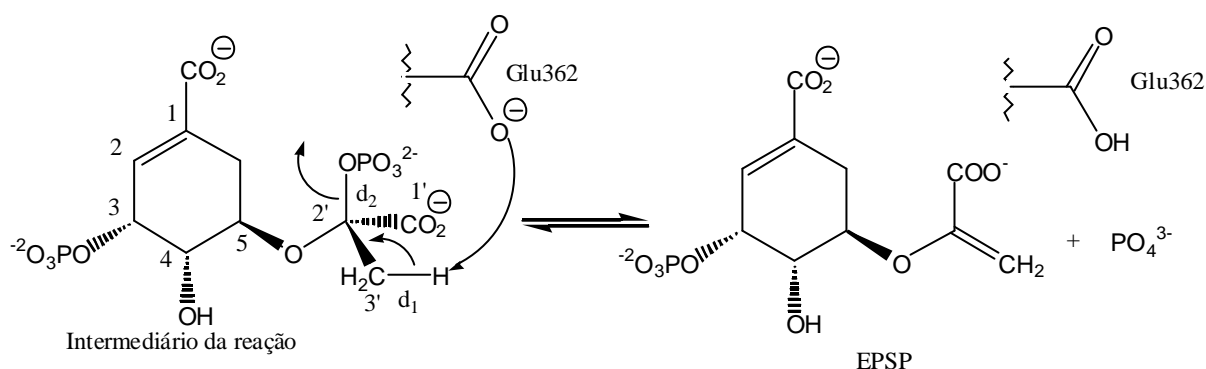


Figura 5.5 Descrição do mecanismo estudado, com Glu362 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

Com o cálculo dos calores de formação para cada estrutura, obtivemos 50 pontos que foram utilizados para construir a superfície de entalpia relativa, de nosso modelo, em função de d_1 e d_2 , mostrada na Figura 5.6.

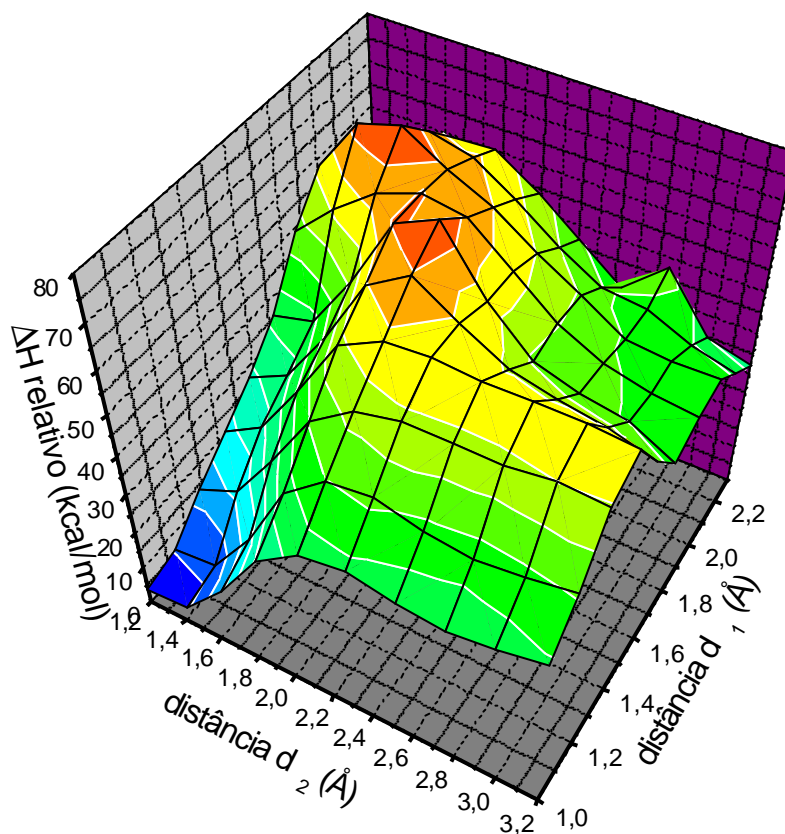


Figura 5.6 Superfície da entalpia de reação, com Glu362 atuando como uma catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

Observando-se a Figura 5.6, pode-se constatar que este mecanismo de reação não deve ser concertado, porque no caminho de menor entalpia há um adiantamento na saída do grupo fosfato, quando comparada com a perda do próton pela metila. Isto sugere que o caminho mais favorável para que este mecanismo se realize envolve duas etapas. Na primeira etapa há a saída do grupo PO_4^{3-} , formando um carbocátion. Na segunda etapa o resíduo básico Glu362 catalisaria a retirada de um próton da metila formando o produto EPSP. Isso pode ser melhor observado através do gráfico com os contornos da superfície de entalpia em função de d_1 e d_2 mostrado na Figura 5.7.

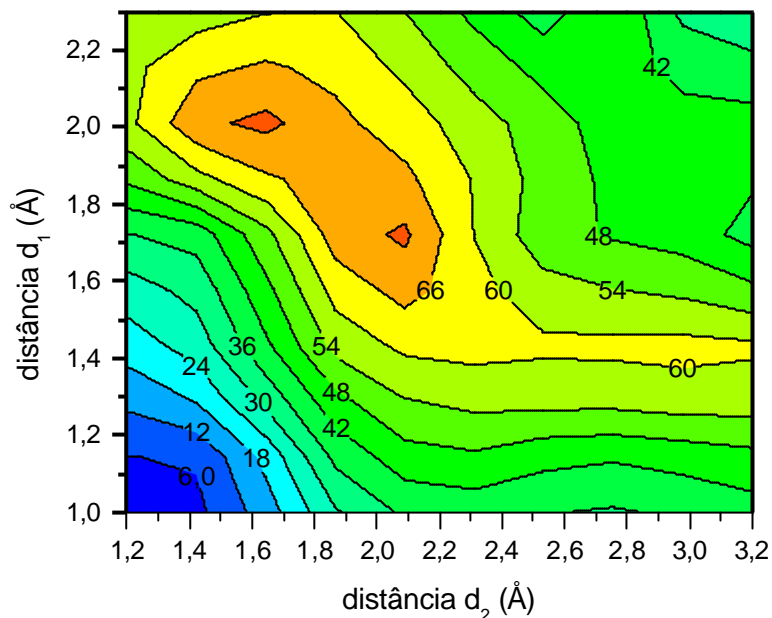


Figura 5.7 Superfície com os contornos de entalpia da reação, com Glu362 atuando como um catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

Pode-se constatar que para ocorrer a primeira parte da reação, saindo o grupo fosfato e formando o carbocátion, é necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de aproximadamente 36 kcal/mol. Após a formação do carbocátion ocorre a abstração do hidrogênio da metila pelo Glu362 após ultrapassar uma barreira de entalpia de 30 kcal/mol, formando o produto EPSP.

Com o objetivo de obter informações sobre as razões da estabilidade do carbocátion intermediário, foi avaliada a carga do carbono C2 do fragmento do PEP e do átomo de oxigênio ligado a ele, em função da distância d_2 . Com os valores das cargas desses dois átomos, calculadas para cada estrutura com a distância d_1 fixa em 1,09 Å, foram construídas as duas curvas mostradas na Figura 5.8.

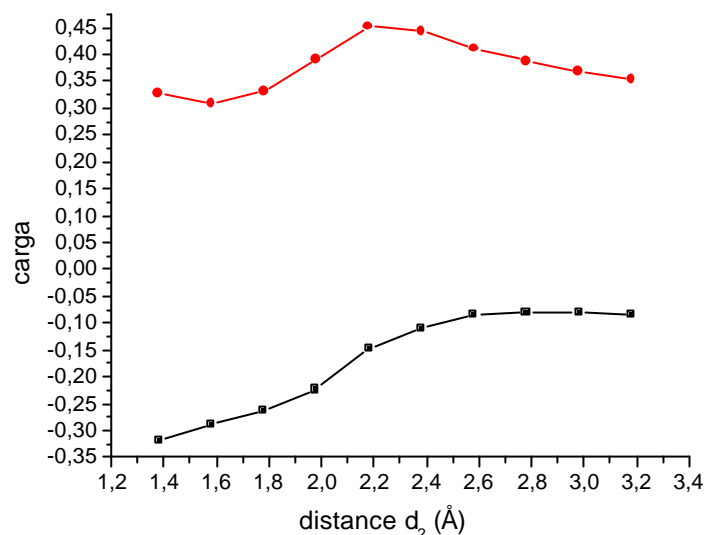


Figura 5.8 Cargas do carbono C2' (em vermelho) e do oxigênio ligado ao carbono C5 (O5) em função da distância d_2 ; neste gráfico, o valor de d_1 foi mantido fixo em 1,09 Å.

Através da observação da Figura 5.8, pode se constatar que a carga parcial positiva de C2' tem de início um aumento, mas logo a seguir um decréscimo, estabilizando-se. Pode-se constatar também que, pela diminuição do valor da carga parcial negativa, o oxigênio ligado a C5 (e a C2') comporta-se como um doador de elétrons por ressonância, sendo por isso responsável pela estabilização do carbocátion.

A Figura 5.9 mostra as duas etapas (mecanismo do tipo E1) baseadas nos resultados obtidos através da simulação computacional da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*. Na primeira etapa ocorre a saída do fosfato com formação de um carbocátion no átomo de carbono C2'. Esse carbocátion é estabilizado pelo átomo de oxigênio ligado a ele. Na segunda etapa, o resíduo Glu362 abstrai um próton da metila do fragmento do PEP formando o produto EPSPS.

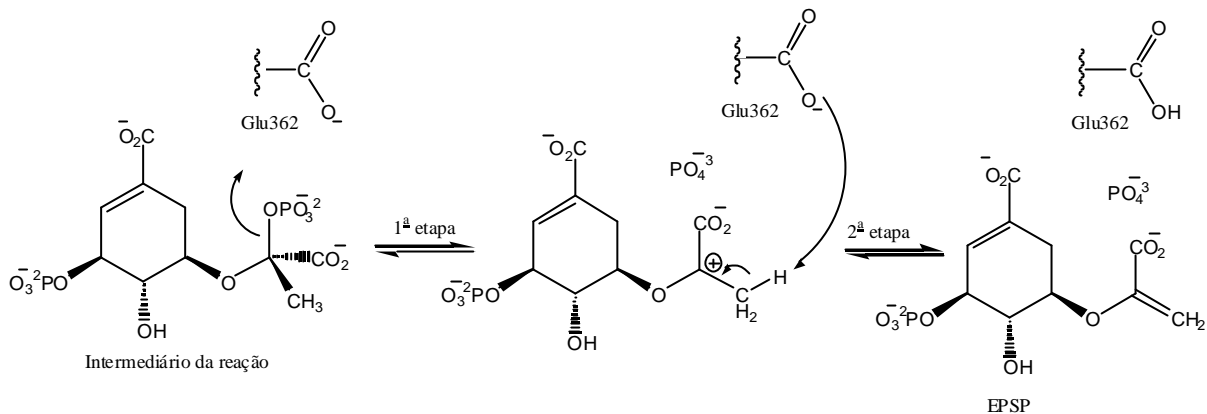


Figura 5.9 Mecanismo proposto da reação com Glu362 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

5.5.2. ASP334 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

No modelo construído da EPSPS de *O. sativa*, um dos átomos de oxigênio do resíduo Asp334 está a uma distância de 2,58 Å de um dos hidrogênios da metila do IT, conforme mostrado na Figura 5.10. A essa distância, Asp334 também é um possível candidato a ser o catalisador básico que participa diretamente da etapa de eliminação do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *O. sativa*.

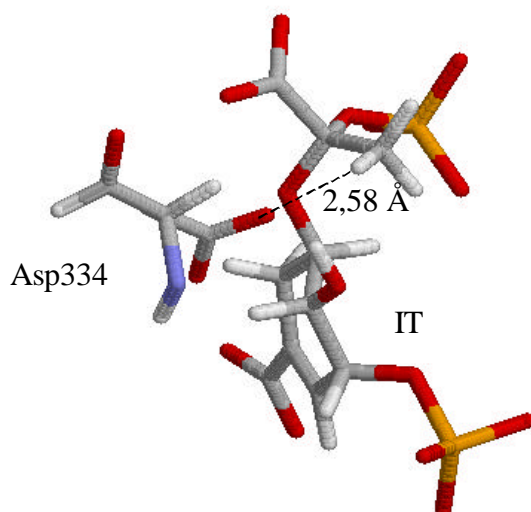


Figura 5.10 Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Asp334 no modelo da EPSPS de *O. sativa*. Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, oxigênios, nitrogênios, carbonos e fósforo.

Nessa proposta de mecanismo, o resíduo Asp334 é a base que abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metila provocando a saída do grupo PO_4^{3-} , levando à formação do produto EPSP. A Figura 5.11 mostra um esquema desse mecanismo, com participação direta do Asp334. A simulação computacional dessa proposta de mecanismo, em nosso modelo, foi realizada aumentando-se as distâncias d_1 e d_2 . O aumento da distância d_1 aproxima um átomo de hidrogênio, ligado a metila do IT, do resíduo Asp334 e o aumento da distância d_2 provoca

a saída do grupo fosfato levando à formação do produto EPSP. A permutação dessas distâncias resultou em 50 estruturas cujos calores de formação foram calculados após otimização.

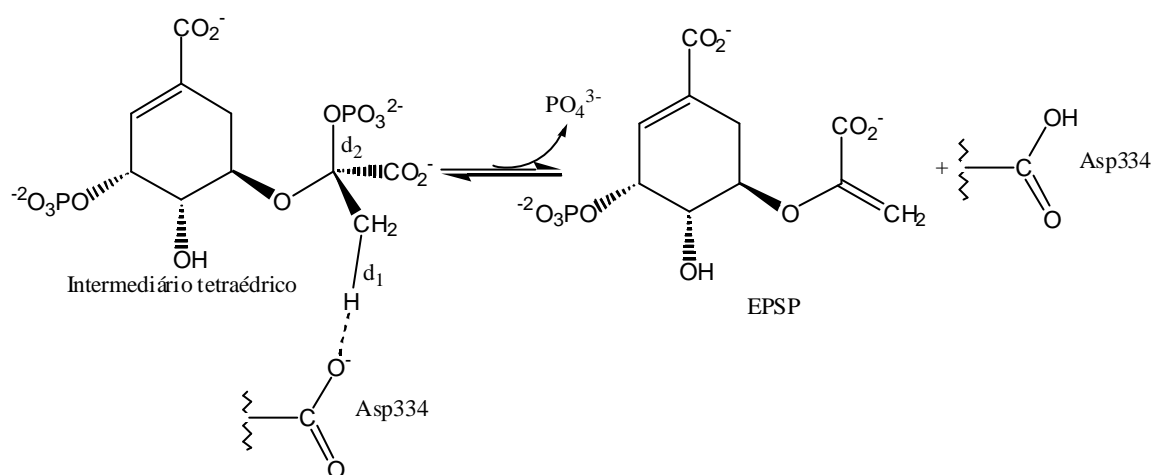


Figura 5.11 Descrição do mecanismo estudado, com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

Ao se observar as 50 estruturas, pode-se constatar que houve a formação da dupla ligação do produto EPSP com a liberação do fosfato. Com o respectivo calor de formação relativo, calculado para cada estrutura, foram obtidos 50 pontos utilizados para construir a superfície de entalpia relativa deste modelo, em função de d_1 e d_2 , mostrada na Figura 5.12.

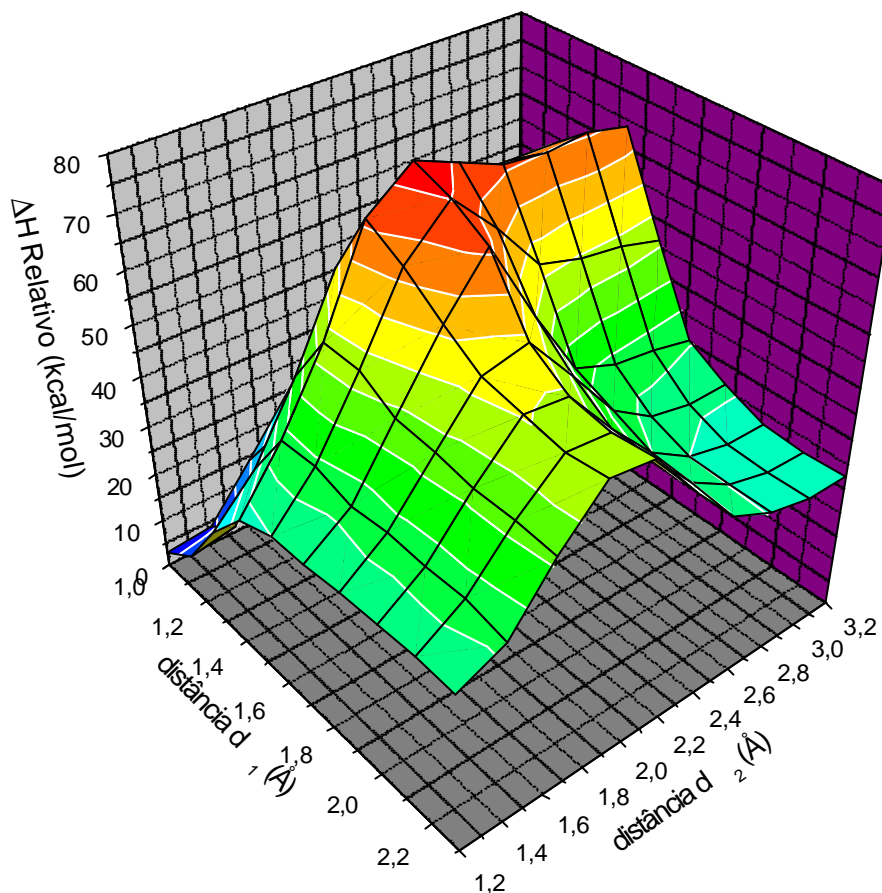


Figura 5.12 Superfície da entalpia de reação referente ao mecanismo com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

A análise da superfície de entalpia, mostrada na Figura 5.12, permite definir o caminho de menor energia para esta etapa de eliminação com participação do Asp334 atuando como base direta. Observa-se na superfície que o caminho de menor energia novamente não é o concertado, mas agora ocorre primeiro a saída do H da metila, formando um carbânion; em seguida, ocorre a saída do PO_4^{3-} levando ao produto EPSP. A formação de carbânions é um evento observado em algumas reações catalisadas por enzimas, mas os carbânions formados são geralmente estabilizados por grupos vizinhos capazes de deslocalizar a carga por

ressonância ou pela presença de cargas positivas em átomos vizinhos, como demonstrado para a enzima β -cetoácido desidrogenase (MACCHIUS et al., 2006). Uma exceção notável parece ser a orotidina 5'-monofosfato descarboxilase (OMPDC). Resultados experimentais indicam que a saída de CO_2 do substrato orotidina 5'-monofosfato envolve um intermediário do tipo carbânion, sem efeitos clássicos de estabilização (TOTH et al., 2007). Embora estruturalmente bastante diferente da EPSPS, esse resultado da OMPDC indica que a formação de carbânions não estabilizados é um evento possível nos sítios ativos enzimáticos.

Os resultados obtidos nesta modelagem da reação sugerem que a etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP com participação do Asp334 como base direta ocorreria em duas etapas, com um mecanismo do tipo E1cB. As barreiras de entalpia envolvidas nessas duas etapas podem ser observadas com o gráfico da superfície de contornos de entalpia em função das distâncias d_1 e d_2 mostrado na Figura 5.13.

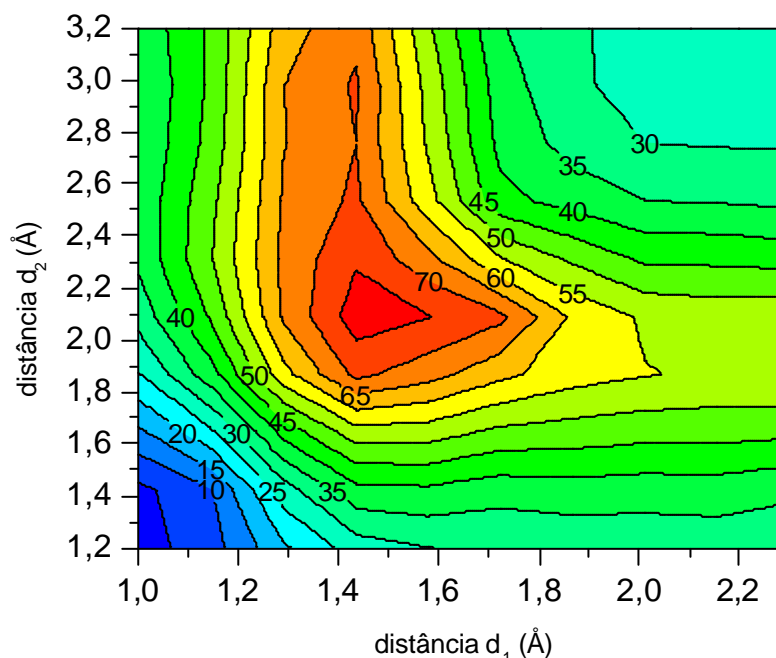


Figura 5.13 Superfície com os contornos de entalpia referente ao mecanismo com Asp334 atuando como catalisador básico na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

Ao se observar a Figura 5.13 pode-se constatar que, para ocorrer a primeira etapa com formação do carbânion, é necessário ultrapassar uma barreira de energia entre 30 e 35 kcal/mol. Após a formação do carbânion, é necessário ultrapassar uma barreira de energia entre 15 e 20 kcal/mol para ocorrer a eliminação do fosfato e formar a EPSP.

Com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade da formação do carbânion foram avaliadas as cargas de alguns átomos da estrutura, apresentadas na Figura 5.14.

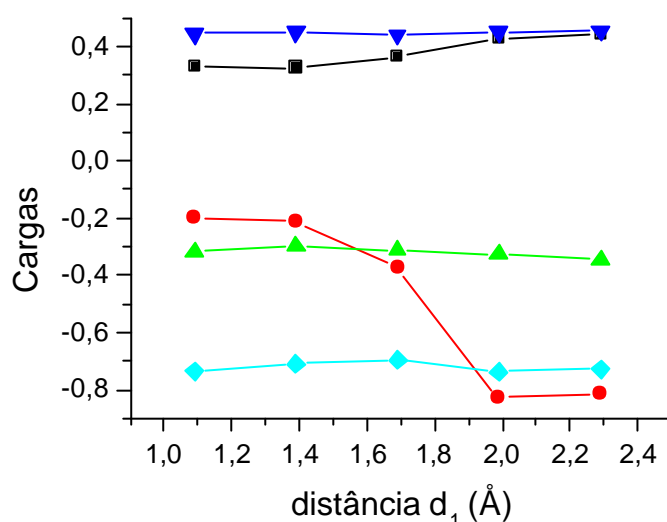


Figura 5.14. Cargas do átomos C1' (azul), C2' (preto) e C3' (vermelho); do oxigênio que liga o grupo fosfato a C2' (ciano) e do oxigênio ligado aos átomos C2' e C5 (verde) em função da distância d_1 . Distância d_2 está fixa em 1,38 Å

As curvas de C1' e dos dois átomos de oxigênio mostram que não há variação significativa nas cargas. Pode ser observado, como esperado, um aumento significativo na carga parcial negativa de C3'. A curva de C2' mostra valores de carga parcial sempre positivos, com pequeno aumento quando C3' se torna mais negativo. Essa carga parcial positiva pode ser resultado da ligação de C2' aos dois átomos de oxigênio e deve facilitar a formação do carbânion em C3'. Esses resultados sugerem que, dos átomos vizinhos, apenas C2' pode ter alguma participação na estabilização do carbânion formado.

Os resultados obtidos, partindo-se do intermediário da reação, sugerem como possível mecanismo a participação do resíduo Asp334 como um catalisador básico, abstraindo um hidrogênio do grupo metila e levando à formação de um carbânion. Após a formação deste carbânion ocorre a liberação do fosfato e a formação do produto EPSP. Baseado nestes resultados pode-se constatar que o caminho mais favorável para que este mecanismo proposto se realize, em nosso modelo, envolve as duas etapas mostradas na Figura 5.15.

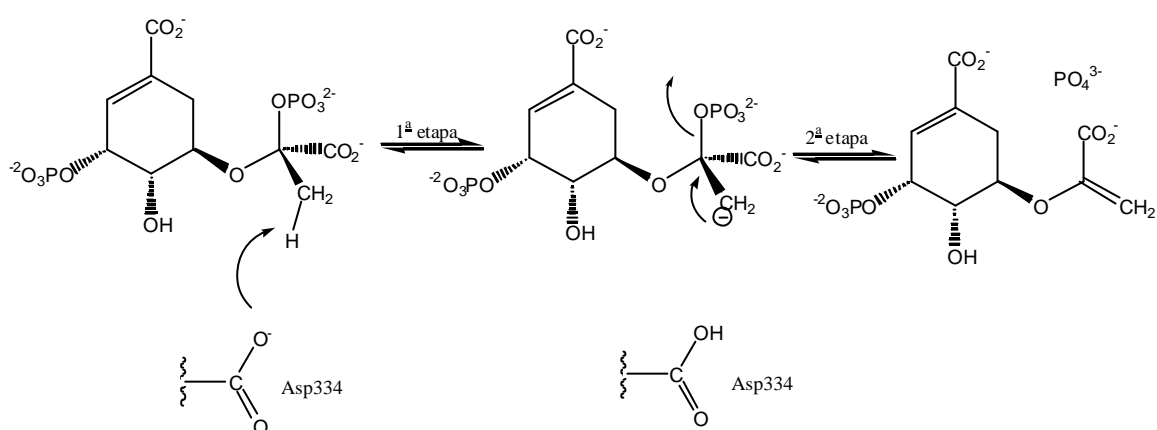


Figura 5.15 Mecanismo proposto da reação com Asp334 atuando como uma base na etapa de eliminação para a formação do produto EPSP.

5.5.3. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E GLU362 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

No modelo construído da EPSPS de *O. sativa*, um dos átomos de hidrogênio do N da cadeia lateral da Lys432 está a uma distância de 1,70 Å de um dos oxigênios do grupo fosfato do fragmento do PEP do IT. A posição dos resíduos Glu362 e Lys432 e do intermediário no modelo construído são mostrados na Figura 5.16.

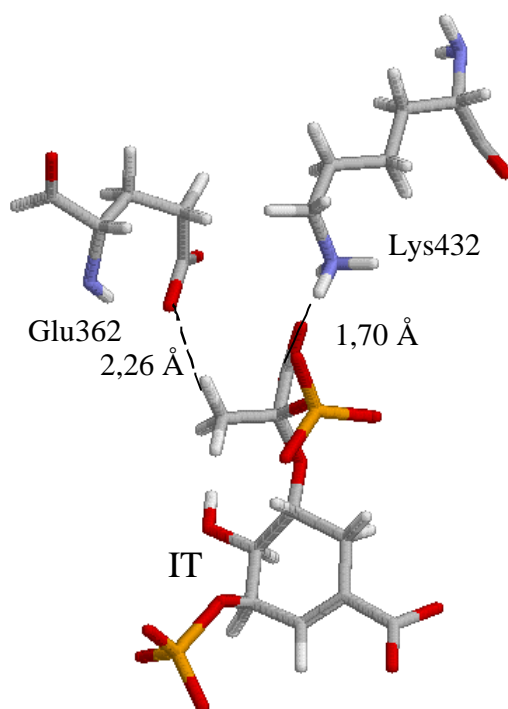


Figura 5.16 Posição do intermediário tetraédrico (IT), dos resíduos Glu362 e Lys432 no modelo da EPSPS de *O. sativa*. Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.

Nessa terceira proposta de mecanismo, ocorre catálise ácida para a etapa de eliminação com Lys432 doando um próton para um dos oxigênios do grupo fosfato do fragmento do PEP formando o melhor grupo de saída hidrogenofosfato, enquanto Glu362 atua como a base que abstrai um próton do grupo metila formando a dupla ligação entre C2' e C3' e provocando a

saída do fosfato protonado e formando o produto EPSP. A Figura 5.17 mostra um esquema desse mecanismo.

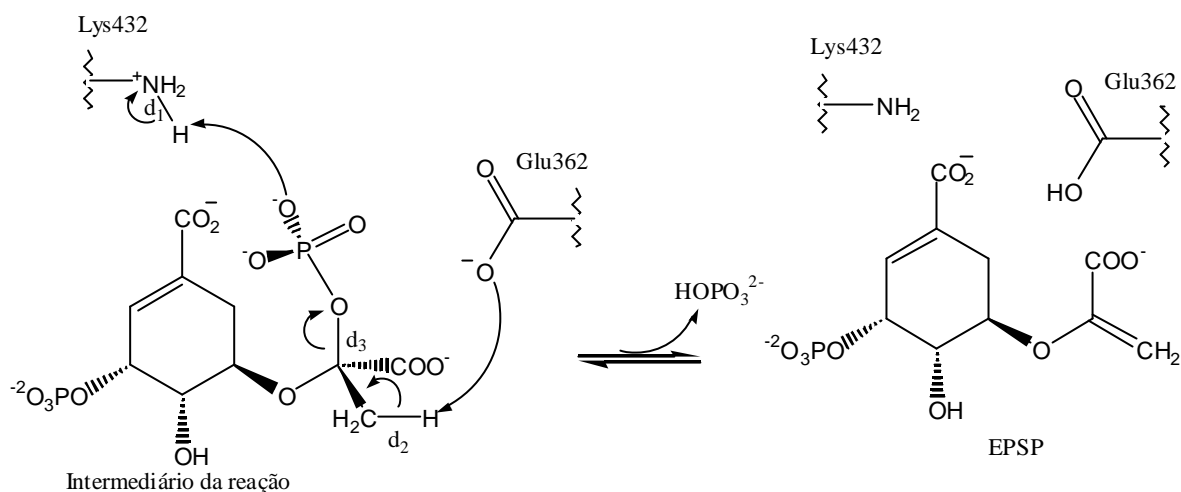


Figura 5.17 Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica de Glu362.

Como agora há 3 coordenadas de reação, a simulação computacional da catálise ácida com a participação de Lys432 e Glu362 foi realizada em duas partes. Na primeira parte, a distância d_1 foi variada de 1,03 Å até 2,33 Å com incrementos de 0,3 Å. O aumento de d_1 aproxima um átomo de hidrogênio de Lys432 de um átomo de oxigênio do grupo fosfato. A variação de d_1 resultou em sete estruturas que foram otimizadas e seus calores de formação calculados, conforme representado no gráfico da Figura 5.18.

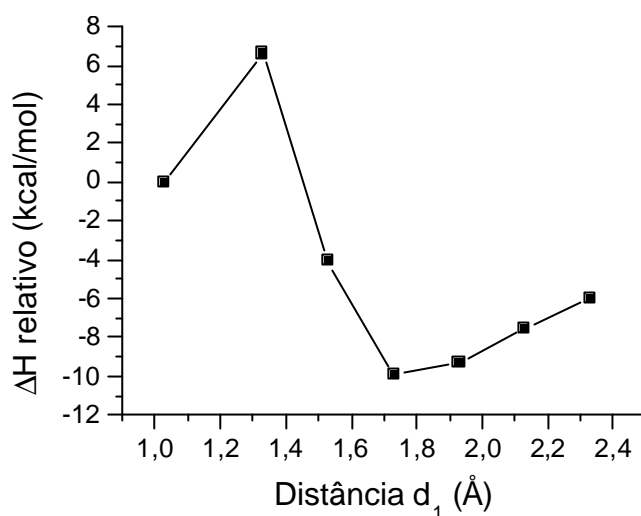


Figura 5.18 Calor de formação relativo calculado em função da distância d_1 .

Pode ser observado que há um aumento do calor de formação com o aumento da distância, sendo o maior valor deste quando d_1 está próximo de 1,30 Å. Após este máximo o calor de formação diminui de forma significativa até a distância d_1 próxima a 1,70 Å, aumentando novamente a seguir. Este resultado sugere um intermediário próximo desse ponto depois de ultrapassar uma barreira de aproximadamente 7 kcal/mol.

Na segunda parte, a distância d_1 foi mantida livre, a distância d_2 foi variada de 1,10 Å até 2,30 Å, com incrementos de 0,30 Å, e a distância d_3 foi variada de 1,40 Å até 3,20 Å, com incrementos de 0,20 Å. O aumento da distância d_2 aproxima um átomo de hidrogênio, que está ligado a metila do IT, do resíduo Glu362 e o aumento da distância d_3 provoca a saída do grupo hidrogenofosfato. A permutação dessas distâncias resultou em 50 estruturas otimizadas cujos calores de formação foram calculados.

Ao se observar as 50 estruturas, pode-se constatar que houve a formação do EPSP com a liberação do ânion hidrogenofosfato. Com os respectivos calores de formação, calculados

para cada estrutura, obtivemos 50 pontos que foram utilizados para construir a superfície de entalpia relativa em função de d_2 e d_3 (Figura 5.19).

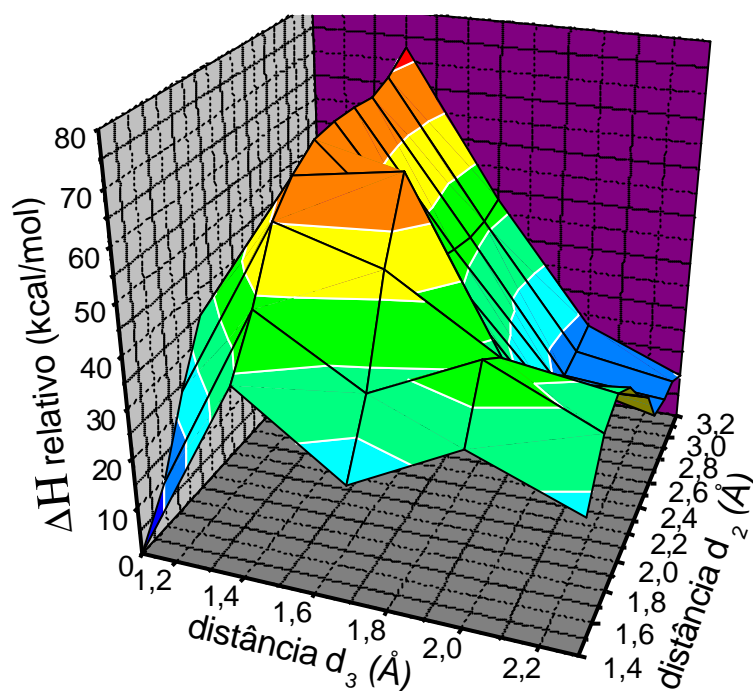


Figura 5.19 Superfície de entalpia relativa, referente ao mecanismo com Glu362 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.

Observando a Figura 5.19 constata-se que a simulação da reação ocorre através de um processo não concertado. O caminho de menor custo energético, nesta reação, ocorre primeiro com a abstração do próton pelo Glu362, formando um carbânion no carbono C3 do fragmento do PEP. Após a formação do carbânion ocorre a liberação do grupo do hidrogenofosfato com a formação do produto EPSP. As barreiras de entalpia envolvidas nessas duas etapas podem ser observadas com o gráfico da superfície de contornos de entalpia em função de d_2 e d_3 mostrado na Figura 5. 20.

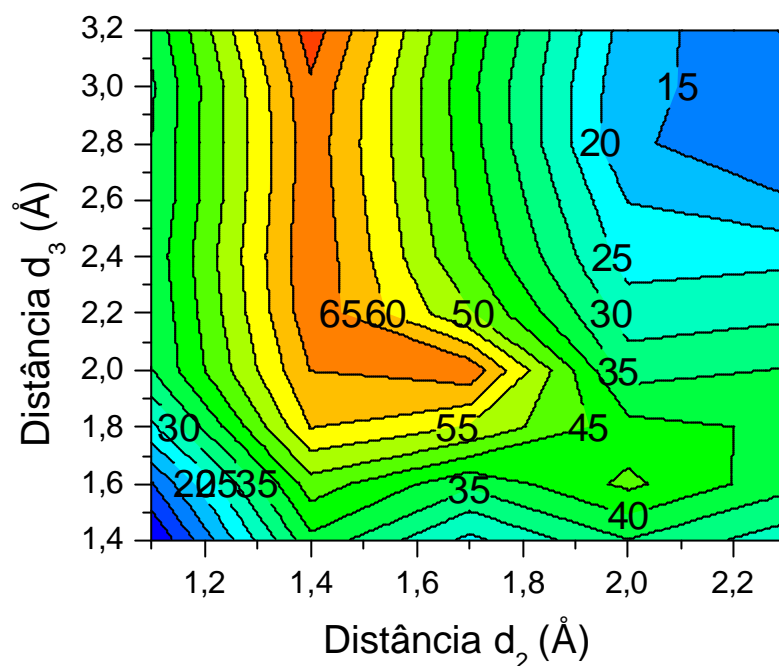


Figura 5.20. Superfície com os contornos de entalpia, referente ao mecanismo com Glu362 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.

A análise da Figura 5.20 mostra que para ocorrer à etapa de formação do carbânion é necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de aproximadamente 35 kcal/mol. Após a formação do carbânion ocorre a saída do hidrogenofosfato com uma barreira de entalpia de aproximadamente 5 kcal/mol, formando o produto EPSP em um processo exotérmico, diferente do mecanismo sem catálise ácida.

Com o objetivo de obter informações sobre as razões da estabilidade do carbânion foram avaliadas as cargas em átomos da estrutura, mostradas na Figura 5.21.

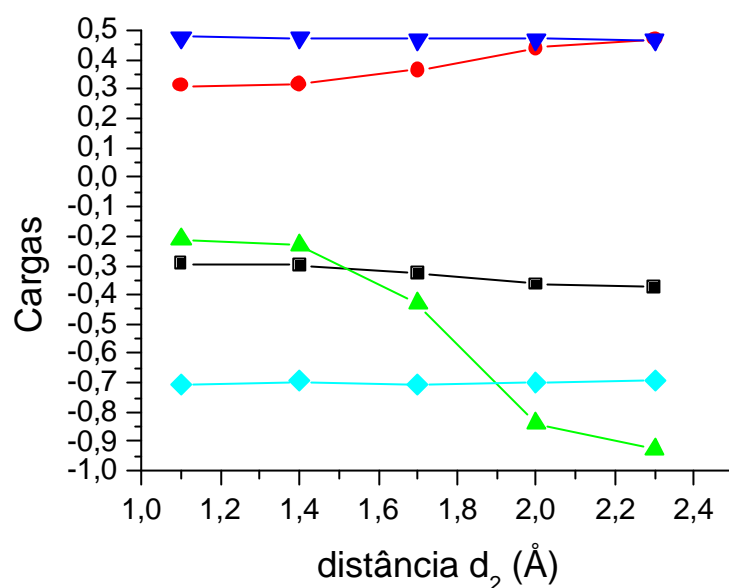


Figura 5.21. Evoluções das cargas dos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde); do átomo de oxigênio que liga o grupo fosfato a C2' (ciano) e do oxigênio ligado a C2' e a C5 (preto) em função da distância d_2 (distância d_3 fixa em 1,38 Å).

As cargas do átomo de carbono C1' e do átomo de oxigênio que liga o grupo fosfato ao átomo de carbono C2' não sofrem alteração significativa com a formação do carbânion. A carga de C3' aumenta de forma significativa, como esperado, enquanto que a carga de C2' mostra valores sempre positivos, com pequeno aumento quando C3' se torna mais negativo. Como observado para o mecanismo com Asp334 atuando como base direta, essa carga parcial positiva pode ser resultado da ligação de C2' aos dois átomos de oxigênio. Esses resultados sugerem que, dos átomos vizinhos, apenas C2' pode ter alguma participação na estabilização do carbânion formado.

A análise da participação de Lys432 atuando como ácido e de Glu362 como base, na etapa de eliminação do mecanismo de reação entre S3P e PEP catalisado pela EPSPS, conduz à formação do produto EPSP. Os resultados sugerem que esse mecanismo de reação poderia

ocorrer em três etapas (Figura 5.22). Na primeira etapa, um átomo de oxigênio do fosfato abstrai um próton de Lys432, formando um IT protonado (IT-H). Na segunda etapa, o Glu362 abstrai um próton da metila do fragmento do PEP formando o carbânion no carbono C3' do fragmento do PEP. Após a formação do carbânion ocorre a liberação do fosfato protonado e formação do produto EPSP.

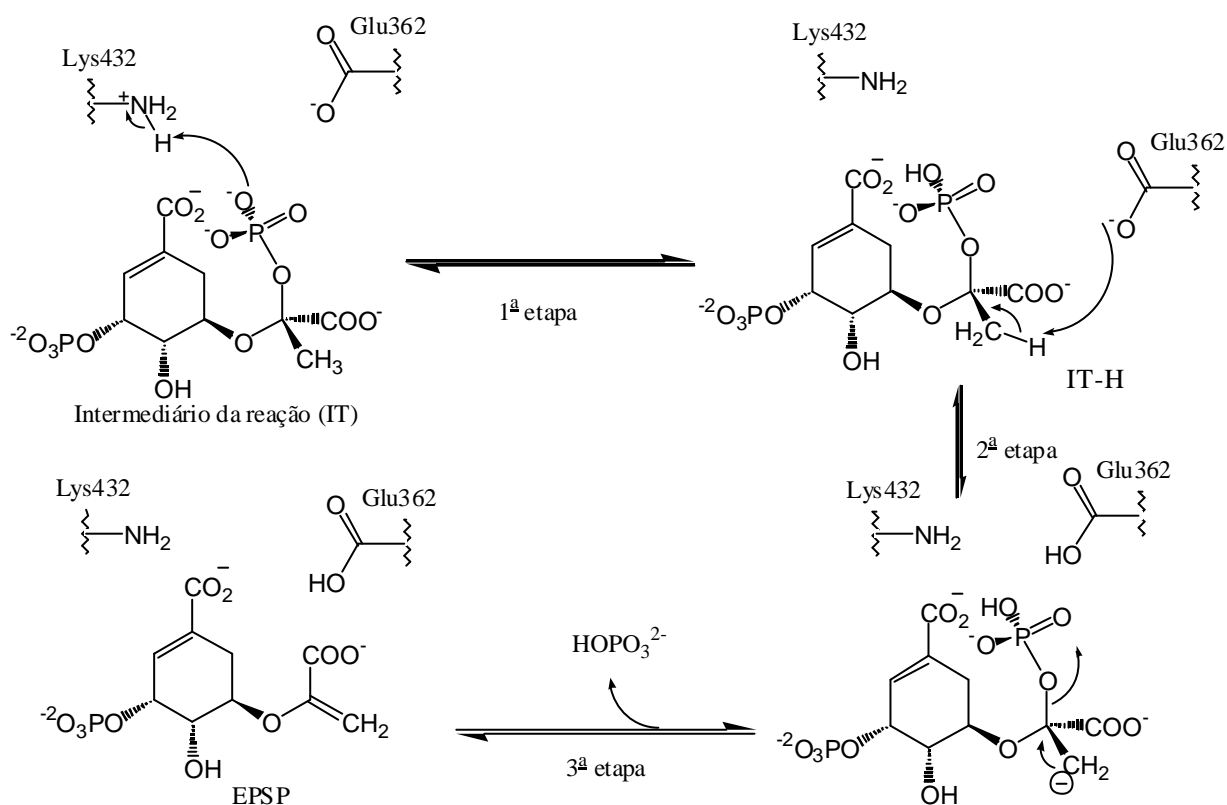


Figura 5.22. Esquema proposto com 3 etapas para o mecanismo de eliminação, com as participações de Lys432 atuando como catalisador ácido e Glu362 atuando como catalisador básico.

5.5.4. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E ASP334 ATUANDO COMO BASE DIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

Nessa proposta de catálise ácida para a etapa de eliminação, baseada nas distâncias entre os resíduos Asp334, Lys432 e o IT (Figura 5.23), o resíduo Lys432 atua como ácido doando um próton para o átomo de oxigênio do grupo fosfato e o resíduo Asp334 atua como a base que abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metila provocando a saída do hidrogenofosfato e formando o produto EPSP.

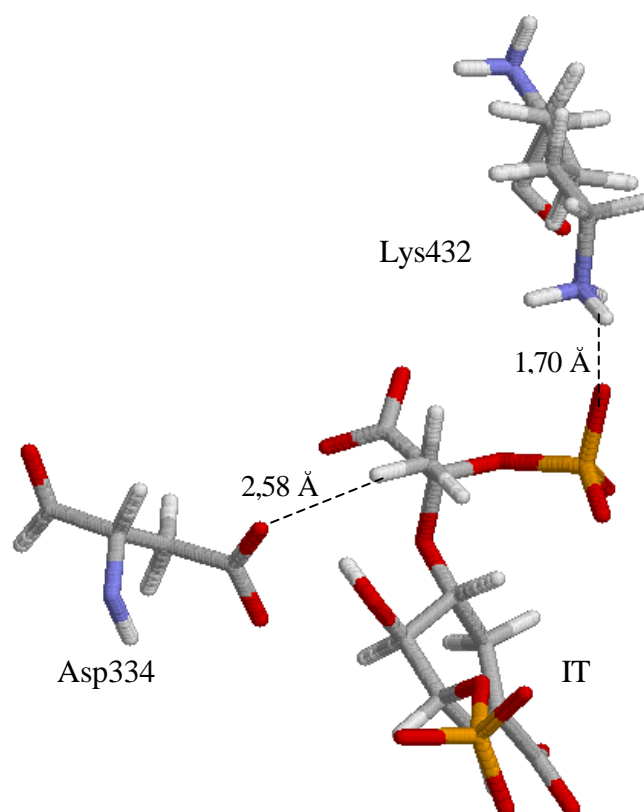


Figura 5.23. Posição do intermediário tetraédrico (IT), de Asp334 e de Lys432 no modelo da EPSPS de *O. sativa*. Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.

A Figura 5.24 mostra um esquema desse mecanismo proposto.

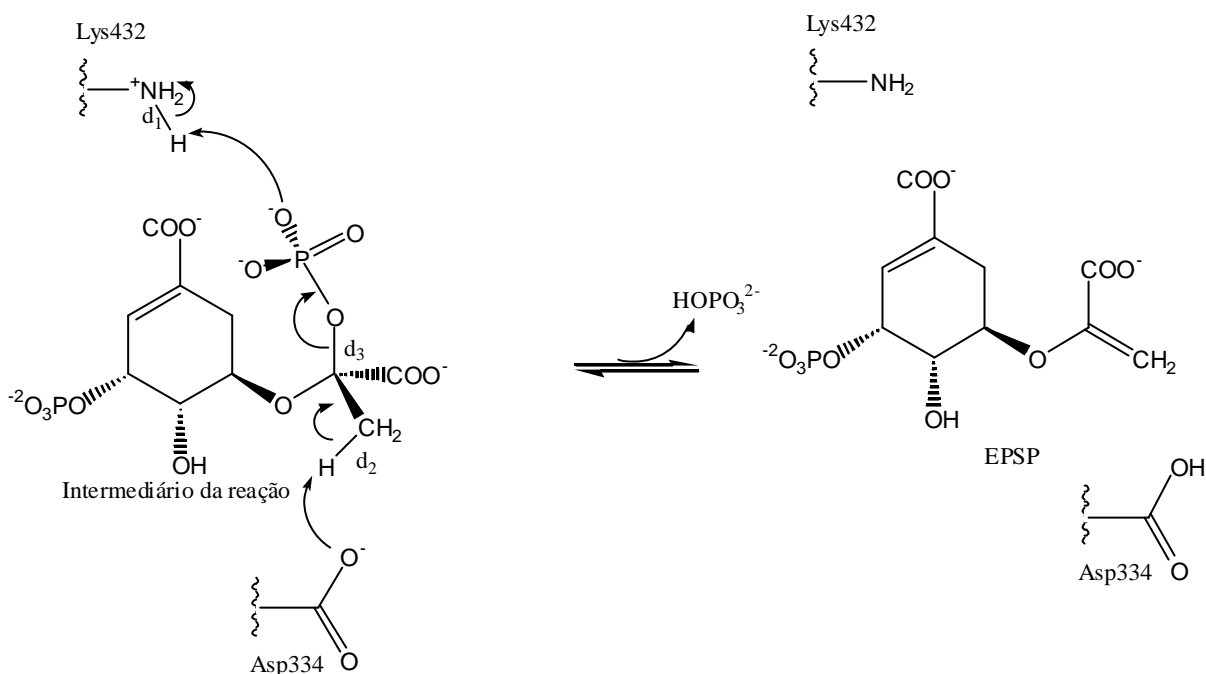


Figura 5.24. Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica de Asp334.

A simulação computacional da catálise com a participação dos resíduos Lys432 e Asp334 em nosso modelo foi realizada em duas partes. Na primeira parte, a distância d_1 foi variada de 1,03 Å até 2,33 Å com incrementos de 0,3 Å, como descrito no mecanismo anterior, que tem em comum essa etapa do mecanismo (Figuras 5.17 e 5.18).

Na segunda parte, a distância d_1 foi mantida livre a partir desse mínimo local, a distância d_2 foi variada de 1,10 Å até 2,30 Å, com incrementos de 0,30 Å e a distância d_3 foi variada de 1,40 Å até 3,20 Å, com incrementos constantes de 0,20 Å. O aumento da distância d_2 aproxima um próton da metila do resíduo Asp334 e o aumento de d_3 provoca a saída do grupo fosfato. A permutação dessas distâncias resultou em 50 estruturas cujos calores de formação foram calculados após otimização.

Com os respectivos valores de formação, calculados para cada estrutura, obtivemos 50 pontos que foram utilizados para construir a superfície de entalpia relativa, de nosso modelo, em função de d_2 e d_3 , mostrada na Figura 5.25.

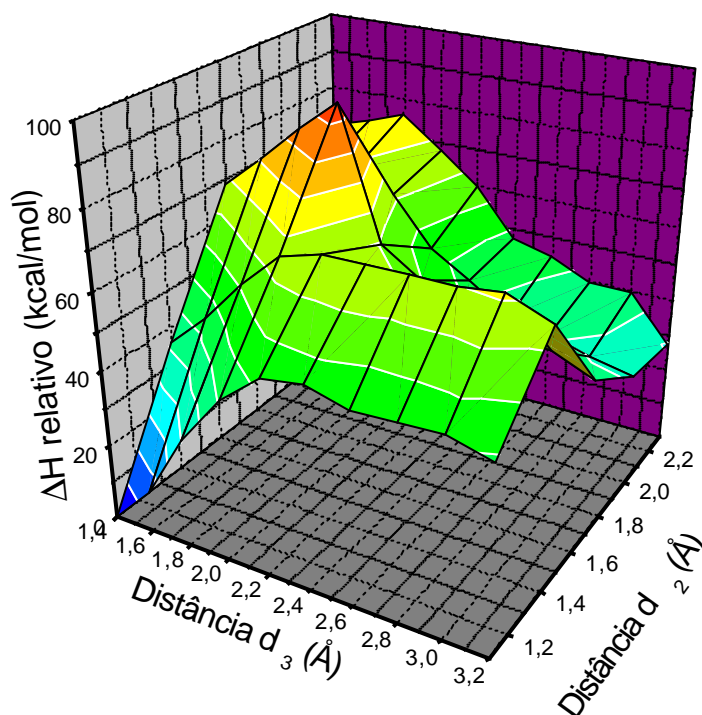


Figura 5.25. Superfície de entalpia relativa, com Asp334 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342.

Observando a Figura 5.25 constata-se que essa parte da reação pode ocorrer através de um processo concertado, com a saída do hidrogenofosfato simultaneamente acontecendo com a abstração do átomo de hidrogênio pelo resíduo Asp334. Alternativamente, o perfil da superfície indica que pode ocorrer o processo de forma não concertada, em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a saída do grupo fosfato protonado levando à formação de um carbocátion no carbono C3'. Após a formação do carbocátion, o resíduo Asp334 abstrai um átomo de hidrogênio da metila formando o produto EPSP.

Com o objetivo de avaliar as barreiras de energia envolvidas nessas etapas, foi construído outro gráfico com os contornos da superfície de entalpia em função de d_2 e d_3 mostrado na Figura 5.26.

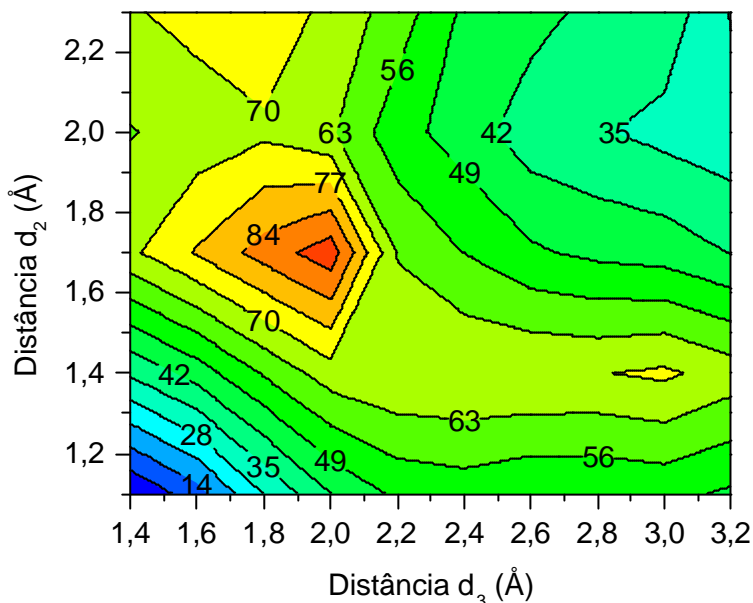


Figura 5.26. Superfície com os contornos de entalpia, com Asp334 atuando como catalisador básico, em função das distâncias d_2 e d_3 , após protonação do grupo de saída fosfato pelo resíduo Lys342

A análise da Figura 5.26 mostra que para ocorrer a formação do carbocátion é necessário ultrapassar uma barreira de aproximadamente 50 kcal/mol. Após a formação do carbocátion ocorre a abstração do próton da metila pelo Asp334, sendo necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de aproximadamente 13 kcal/mol. O processo concertado (diagonal do gráfico) envolveria uma barreira de entalpia de aproximadamente 63 kcal/mol.

Com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade do carbocátion foram avaliadas as evoluções das cargas nos átomos C1', C2' e C3'. Foram avaliadas também as cargas do átomo de oxigênio ligado a C2' e a C5 (Figura 5.27).

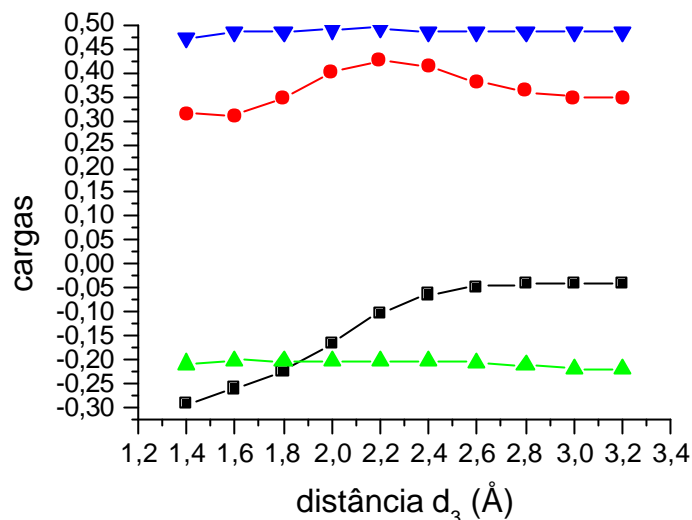


Figura 5.27. Evolução das cargas nos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde) e do oxigênio ligado a C2' e a C5 (preto) em função da distância d_3 . A distância d_2 está fixa em 1,10 Å

As curvas mostram que as cargas dos carbonos C1' e C3' não sofrem alterações significativas com a formação do carbocátion. Pode ser observado que, com o afastamento do fosfato, a carga parcial positiva de C2' tem um aumento seguido de uma redução, estabilizando-se, enquanto a densidade eletrônica do oxigênio diminui consideravelmente. Esses resultados mostram que o átomo de oxigênio é o principal responsável pela estabilização do carbocátion.

A análise da participação da Lys432 atuando como catalisador ácido seguido da participação do Asp334 atuando como catalisador básico, na etapa de eliminação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*, liberando fosfato protonado conduz à formação do produto EPSP. Os resultados dessa simulação computacional sugerem que esse mecanismo pode, após a etapa de protonação do grupo fosfato, seguir um mecanismo concertado ou um mecanismo com duas etapas adicionais. A Figura 5.28 mostra um esquema com essas três etapas, construídas a partir da análise desses resultados.

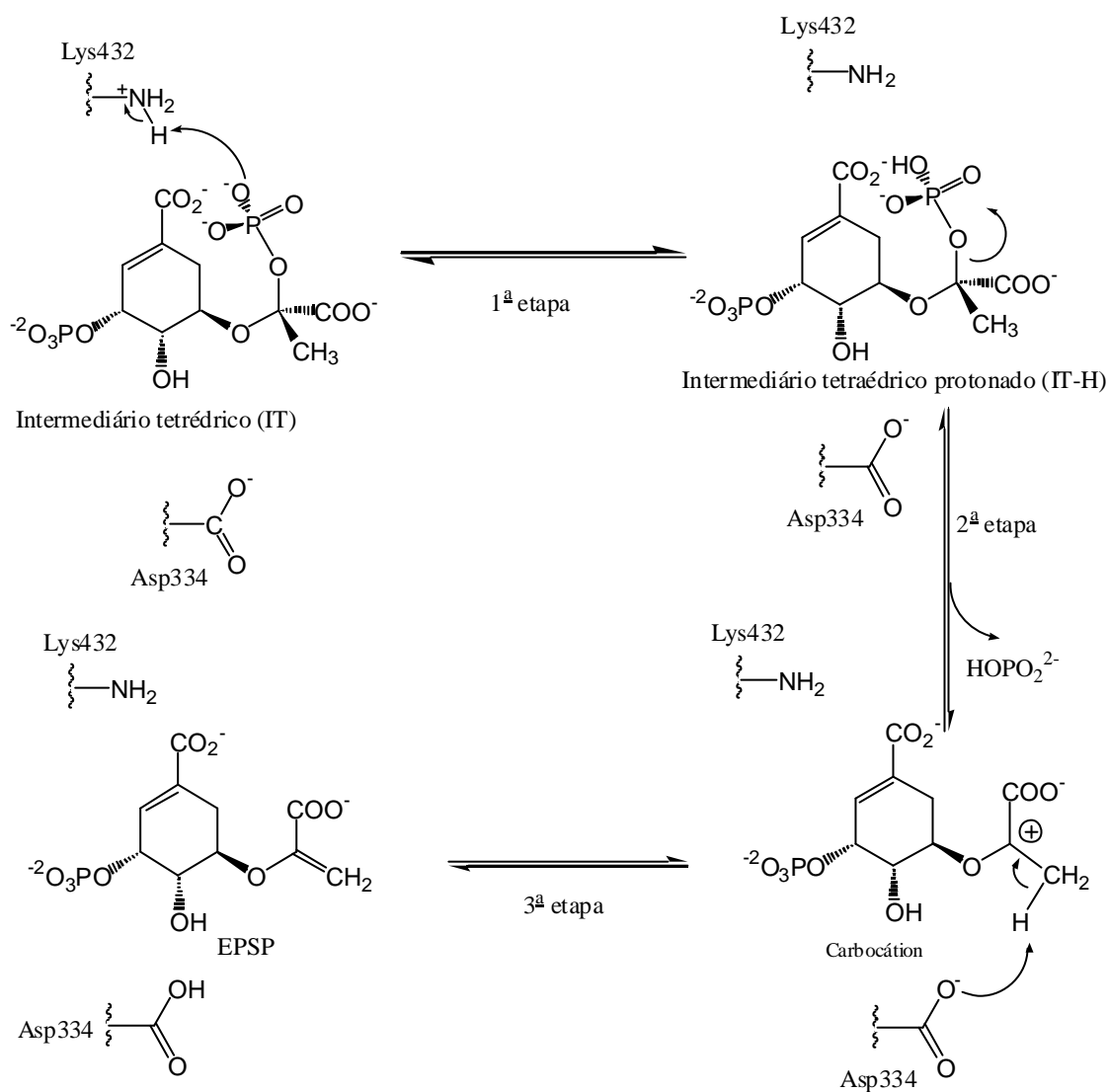


Figura 5.28. Esquema com as três etapas propostas para a reação de eliminação, sugeridas após avaliação dos resultados, com as participações de Lys432 atuando como catalisador ácido e de Asp334 atuando como catalisador básico.

5.5.5. ASP334 ATUANDO COMO CATALISADOR BÁSICO INDIRETO NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

No modelo construído da EPSPS de *O. sativa*, um dos átomos de oxigênio do Asp334 está a uma distância de 1,87 Å do átomo de hidrogênio do grupo OH ligado ao carbono C4 do IT (Figura 5.29).

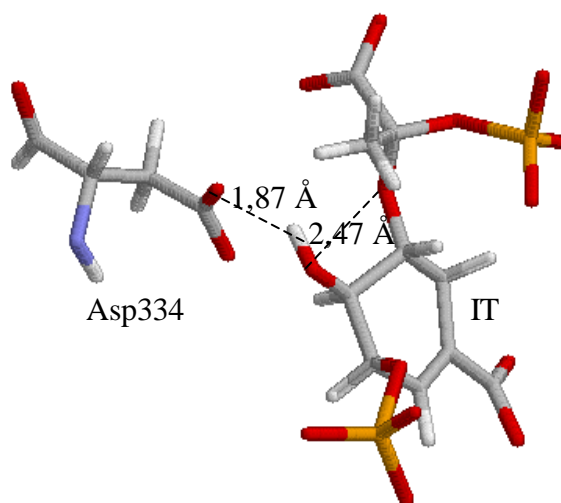


Figura 5.29. Intermediário tetraédrico (IT) e resíduo Asp334 no modelo da EPSPS de *O. sativa*. Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.

Devido a essa proximidade, o resíduo Asp334 também poderia abstrair o hidrogênio da hidroxila do carbono C4. O átomo de oxigênio desprotonado abstrairia um átomo de hidrogênio da metila, formando a dupla ligação e provocando a saída do grupo fosfato. Este mecanismo de reação para a etapa de eliminação foi proposto por Eschenburg e colaboradores (ESCHENBURG *et al.*, 2003) para a reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSP sintase da *E. coli*. Um esquema desse mecanismo de reação é mostrado na Figura 5.30.

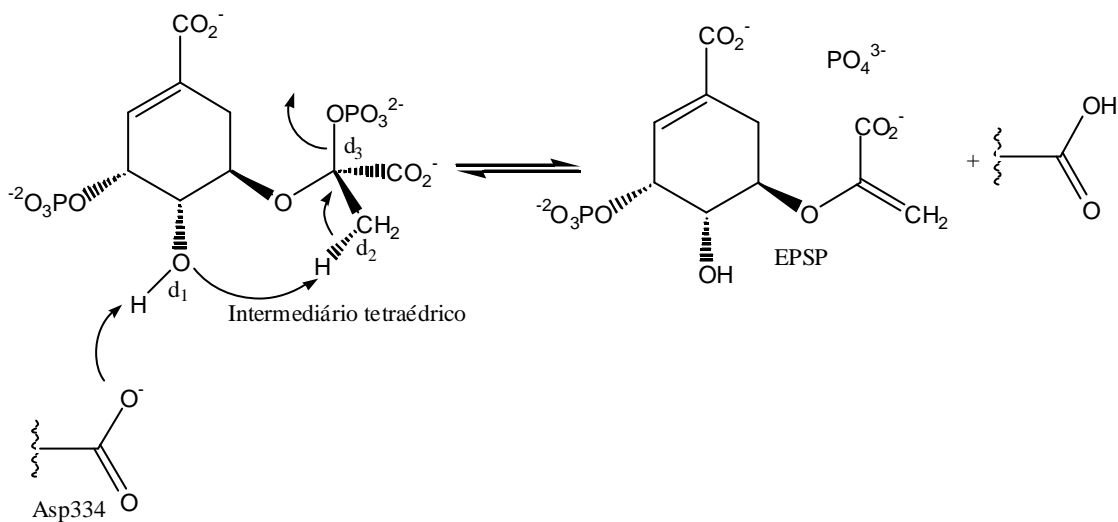


Figura 5.30. Proposta de reação, onde o resíduo Asp334 desprotona o grupo OH ligado a C4. O átomo de oxigênio desprotonado abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metila provocando a saída do grupo fosfato e formação do produto EPSP (ESCHENBURG *et al.*, 2003).

A simulação computacional da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP, catalisada pela EPSPS de *O. sativa* com participação do Asp334 através de um processo indireto, foi realizada em duas partes. Na primeira parte, a distância d_1 foi variada de 0,96 Å até 2,76 Å com incrementos de 0,3 Å. O aumento de d_1 aproxima o átomo de hidrogênio do grupo OH, ligado ao C4 de um dos átomos de oxigênio do Asp334. A variação de d_1 resultou em sete estruturas que foram otimizadas e seus calores de formação calculados (Figura 5.31).

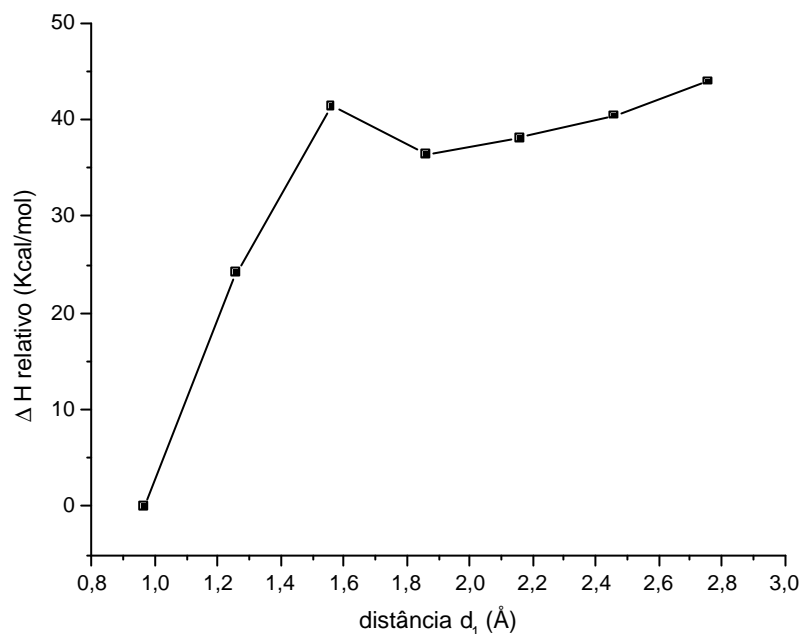


Figura 5.31. Valores de calor de formação relativo em função da distância d_1 .

Pode ser observado na Figura 5.31, que com o aumento da distância d_1 há um aumento do calor de formação. Próximo de 1,60 Å o calor de formação atinge um ponto de máximo diminuindo em seguida. Essa diminuição ocorre até a distância próxima de 1,90 Å, quando o calor de formação atinge um ponto de mínimo aumentando em seguida. Esse resultado sugere um intermediário próximo da distância de 1,90 Å.

Ao se observar o gráfico da Figura 5.31 pode-se constatar que para ocorrer a primeira parte dessa reação é necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de aproximadamente 42 kcal/mol.

Com o átomo de oxigênio ligado ao C4 desprotonado, foi iniciada a segunda parte da reação com a distância d_1 mantida livre em 1,79 Å. A distância d_2 foi variada de 1,04 Å até 2,29 Å, sendo o primeiro incremento de 0,35 Å e os outros de 0,30 Å. A distância d_3 foi variada de 1,38 Å até 3,18 Å, com incrementos constantes de 0,20 Å. O aumento da distância

d_2 aproxima um átomo de hidrogênio da metila do átomo de oxigênio desprotonado, ligado ao carbono C4, e o aumento da distância d_3 provoca a saída do grupo fosfato. A permutação dessas distâncias resultou em 50 estruturas otimizadas cujos calores de formação foram calculados.

Ao se observar as 50 estruturas, pode-se constatar que houve a formação da EPSP com a liberação de fosfato. Com os respectivos calores de formação, calculados para cada estrutura, obtivemos 50 pontos que foram utilizados para construir a superfície de entalpia relativa, de nosso modelo, em função de d_2 e d_3 e que são mostrada na Figura 5.32.

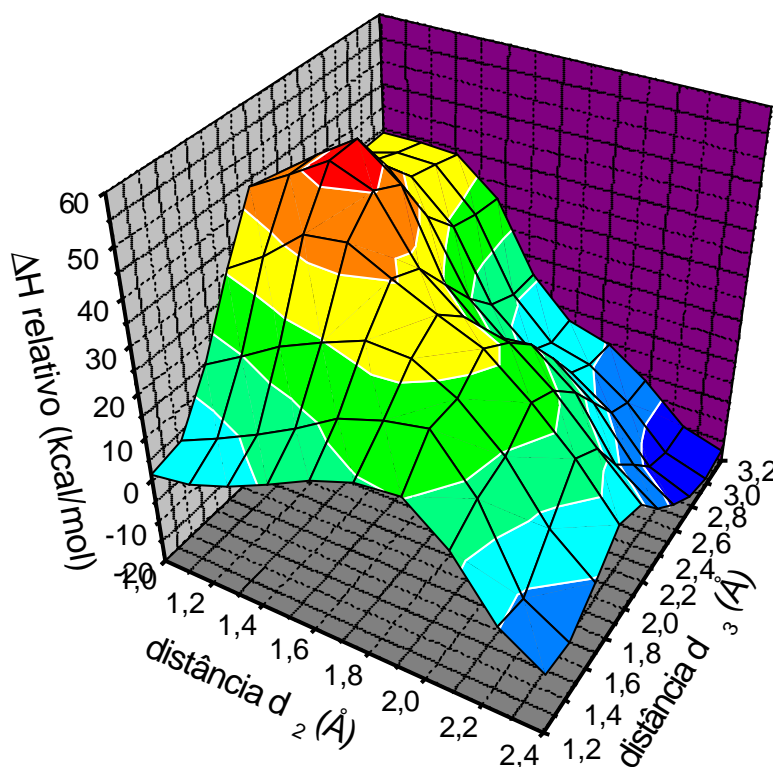


Figura 5.32. Superfície de entalpia do mecanismo com o Asp334 atuando como uma base indireta, construída em função das distâncias d_2 e d_3 .

Observando a Figura 5.32 constata-se que essa reação ocorre através de um processo não concertado. No caminho de menor entalpia ocorre inicialmente a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metila, conseqüentemente levando à formação de um carbânion. Após

a formação do carbânion ocorre a saída do fosfato levando à formação do produto EPSP através de um processo exotérmico.

Com o objetivo de avaliar as barreiras de energia envolvidas nessa parte da reação, foi construída o gráfico com os contornos de entalpia em função de d_2 e d_3 (Figura 5.33).

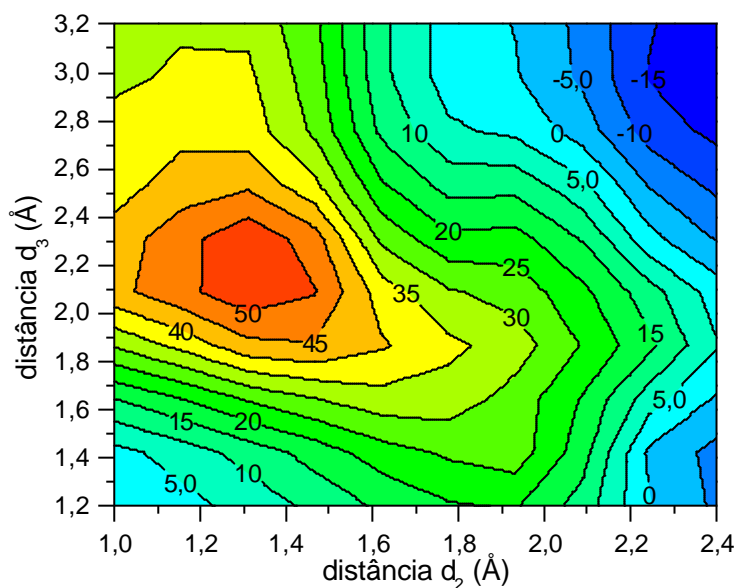


Figura 5.33. Superfície com os contornos de entalpia referente ao mecanismo com o Asp334 atuando como base indireta, construída em função das distâncias d_2 e d_3 .

A Figura 5.33 mostra que para ocorrer a formação do carbânion, nesta parte da reação, é necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de aproximadamente 20 kcal/mol em um processo exotérmico. Após a formação do carbânion ocorre a saída do fosfato inorgânico formando a EPSP, sendo necessário ultrapassar uma barreira de entalpia de 10 kcal/mol, também através de um processo exotérmico.

Para obter informações sobre as razões da estabilidade do carbânion, foi avaliada a evolução da carga do oxigênio ligado ao carbono C4 e dos carbonos C3' e C2'. A Figura 5.34

mostra três curvas construídas com os valores das cargas, desses átomos, em função da distância d_2 , mantendo fixa a distância d_3 em 1,42 Å.

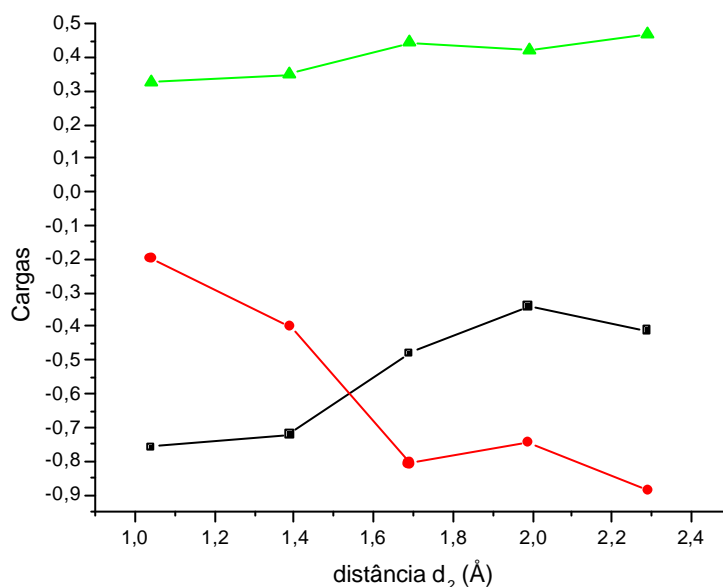


Figura 5.34. Evolução da carga em função da distância d_2 , para o átomo de oxigênio ligado ao carbono C4 (curva em preto), de C3' (curva em vermelho) e de C2' (curva em verde). A distância d_3 está fixa em 1,42 Å.

Observando a Figura 5.34 pode ser constatado, como esperado pela migração do próton, que a carga negativa do átomo de oxigênio diminui à medida que a carga negativa do átomo de carbono da metila aumenta; novamente, observa-se que a carga do carbono C2' é positiva e alta desde o início, aumentando ligeiramente até o final. Essa carga positiva adjacente deve ser um dos fatores que facilitam a formação do carbânion no mecanismo.

Foi avaliada a evolução das cargas dos átomos de carbono C2' e C3' em função da distância d_3 , mantendo a distância d_2 fixa em 2,29 Å. Dessa forma, as cargas são avaliadas desde o instante da formação do carbânion até a formação do produto EPSP (Figura 5.35).

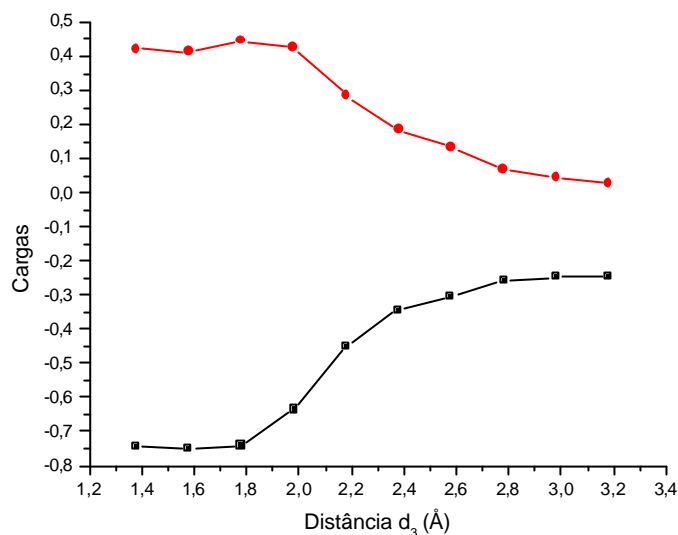


Figura 5.35. Evolução da carga do átomo C3', em preto, e do átomo C2', em vermelho, em função da distância d_3 e com a distância d_2 fixada em 2,29 Å.

Pode ser observado na Figura 5.35 que, à medida que o fosfato se afasta, ao invés da carga parcial positiva de C2' aumentar, ela se reduz, mostrando o fluxo de carga de C3' para ele, construindo a ligação π . Pode ser observada também uma simetria bem acentuada entre as duas curvas. Esta simetria indica uma troca de densidade eletrônica predominantemente entre estes dois átomos.

A análise dos resultados da participação do Asp334 atuando como catalisador básico, através de um processo indireto, sugere que esse mecanismo de reação poderia ocorrer em três etapas como mostra a Figura 5.36.

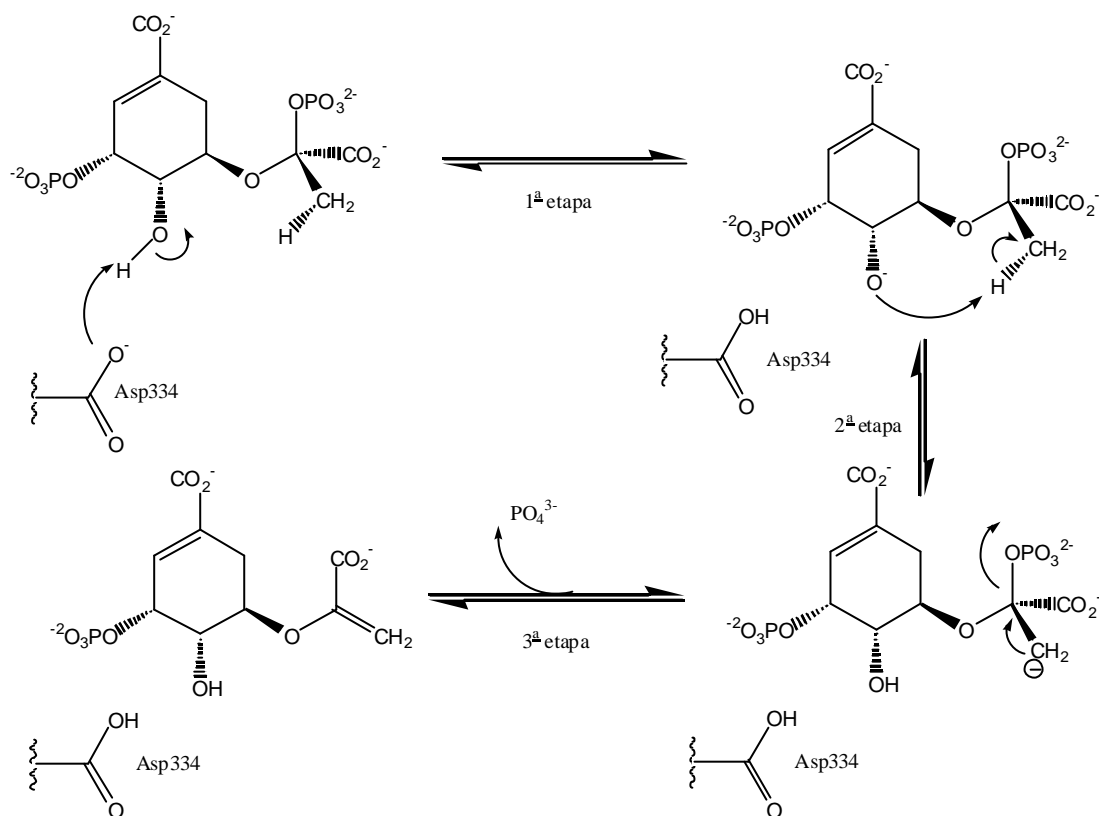


Figura 5.36. Esquema proposto com 3 etapas para o mecanismo de eliminação, com a participação indireta do resíduo Asp334, inicialmente abstraindo o hidrogênio ligado a hidroxila do carbono C4.

Essa simulação computacional da etapa de eliminação, do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*, conduz à formação do produto EPSP. A análise desses resultados permitem concluir que esta é uma possível rota da etapa de eliminação do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS.

5.5.6. LYS432 ATUANDO COMO ÁCIDO E DO ASP334 ATUANDO COMO BASE INDIRETA NA ETAPA DE ELIMINAÇÃO

Como dito antes, no modelo construído da EPSPS de *O. sativa*, um dos átomos de hidrogênio da Lys432 está a uma distância de 1,70 Å de um dos átomos de oxigênio do grupo fosfato do fragmento do PEP do IT. Neste modelo, também pode ser observado que um dos átomos de oxigênio do Asp334 está a uma distância de 1,87 Å do hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono C4 (Figura 5.37).

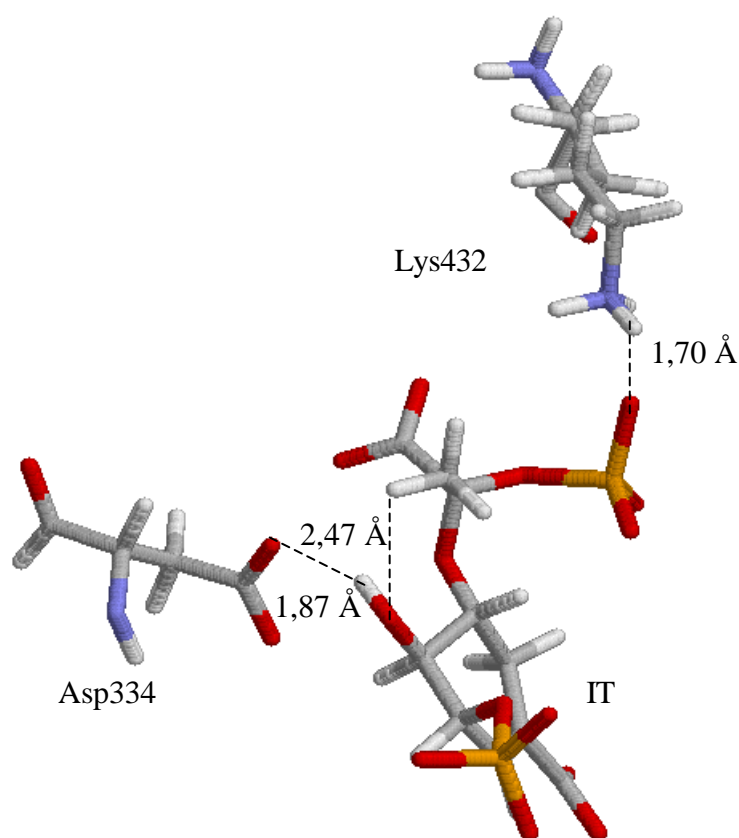


Figura 5.37. Representação do IT e dos resíduos Asp334 e Lys432 no modelo da EPSPS de *O. sativa*. Os demais resíduos e moléculas de água foram omitidos para maior clareza. As cores branca, vermelha, azul, cinza e amarela mostram, respectivamente, os átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono e fósforo.

Nessa proposta, Lys432 doa um próton para um dos oxigênios do grupo fosfato do fragmento do PEP e o resíduo Asp334 atua como o catalisador básico que abstrai um átomo de hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono C4. O átomo de oxigênio desprotonado ligado ao carbono C4 abstrai um átomo de hidrogênio da metila do IT, provocando com isso a saída do grupo fosfato protonado e formação do produto EPSP. A Figura 5.38 mostra um esquema dessa proposta de reação para a etapa de eliminação.

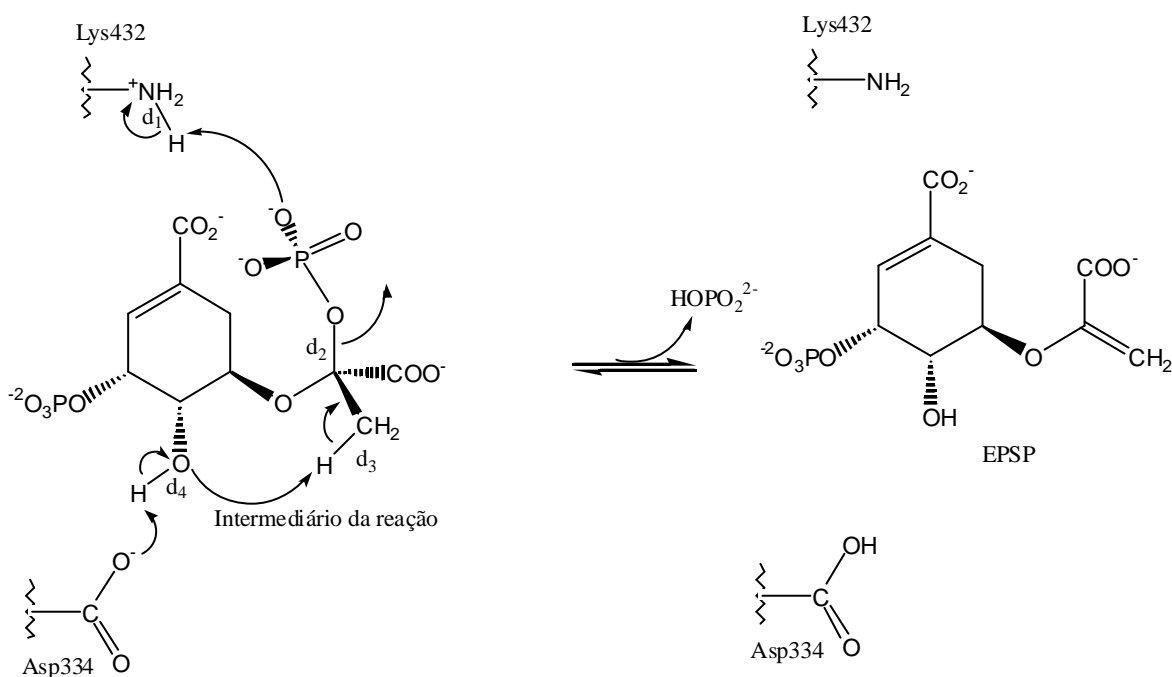


Figura 5.38. Descrição do mecanismo estudado, com catálise ácida de Lys432 e catálise básica indireta de Asp334.

A simulação computacional do mecanismo com a participação de Lys432, atuando como catalisador ácido, e de Asp334, atuando como catalisador básico através de um processo indireto, foi realizada em duas partes. Na primeira parte, as distâncias d₁ e d₂ foram simultaneamente aumentadas em incrementos constantes. O aumento de d₁ aproxima o átomo de hidrogênio da Lys432 de um dos átomos de oxigênio do grupo fosfato do fragmento do PEP, enquanto o aumento da distância d₂ provoca a saída do grupo fosfato. Na

segunda parte da simulação dessa reação, as distâncias d_3 e d_4 foram simultaneamente aumentadas em incrementos constantes. O aumento de d_3 aproxima o átomo de hidrogênio metílico do átomo de oxigênio da hidroxila ligada ao átomo de carbono C4, enquanto o aumento de d_4 aproxima o átomo de hidrogênio dessa hidroxila do átomo de oxigênio do carboxilato de Asp334.

A distância d_1 foi variada de 1,03 Å a 2,43 Å com incrementos constantes de 0,30 Å, enquanto a distância d_2 foi variada de 1,40 Å até 3,00 Å com incrementos constantes de 0,20 Å. A permutação dessas distâncias resultou em 54 estruturas otimizadas cujos calores de formação foram calculados. Com os respectivos calores de formação, calculados para cada estrutura, foram obtidos 54 pontos utilizados para construir a superfície de entalpia relativa, do modelo, em função de d_1 e d_2 (Figura 5.39).

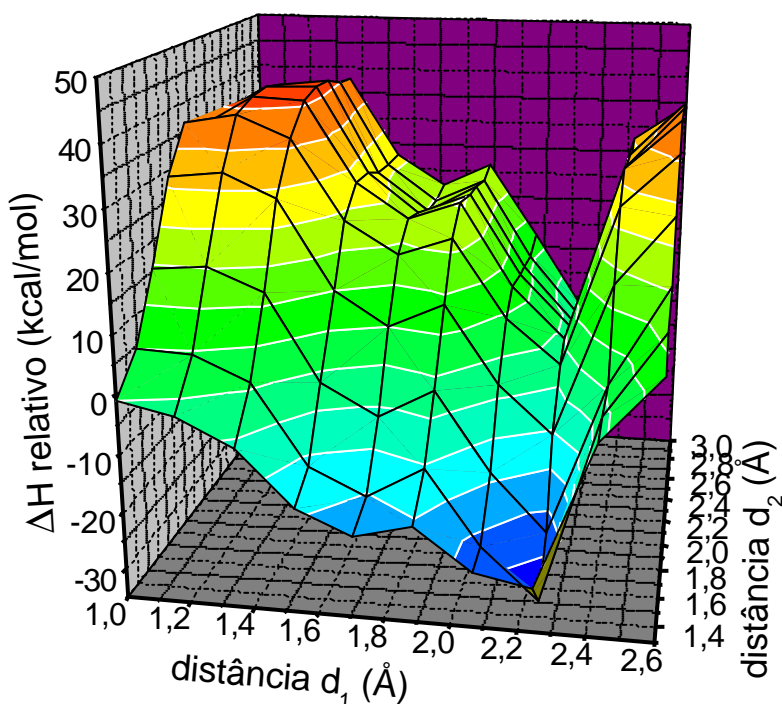


Figura 5.39. Primeira parte da superfície de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, construída em função das distâncias d_1 e d_2 .

Observando a Figura 5.39 constata-se que há um caminho não concertado, no qual ocorre primeiro a abstração do átomo de hidrogênio da Lys432 pelo átomo de oxigênio do fosfato, formando um IT protonado (IT-H). Após a formação do IT-H ocorre a saída do grupo do hidrogenofosfato, formando um carbocátion. Entretanto, pode ser observado também que há um mecanismo aproximadamente concertado alternativo, conectando o IT e o carbocátion.

Com o objetivo de avaliar as barreiras de entalpia envolvidas nessa parte da reação, foi construído um gráfico com os contornos da superfície de entalpia em função das distâncias d_1 e d_2 , mostrado na Figura 5.40.

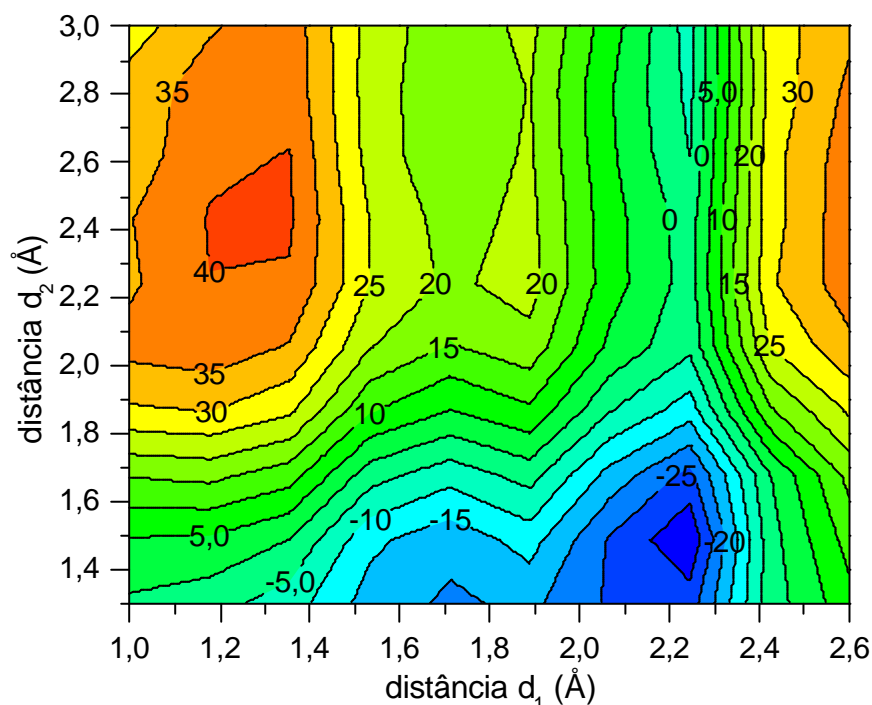


Figura 5.40. Primeira parte da superfície com os contornos de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_1 e d_2 .

Observando essa figura, pode ser constatado que o mecanismo aproximadamente concertado, que leva ao carbocátion com liberação do hidrogenofosfato, ocorre a um custo entálpico praticamente nulo.

Com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade do carbocátion foram avaliadas as cargas de alguns átomos da estrutura, representadas na Figura 5.41.

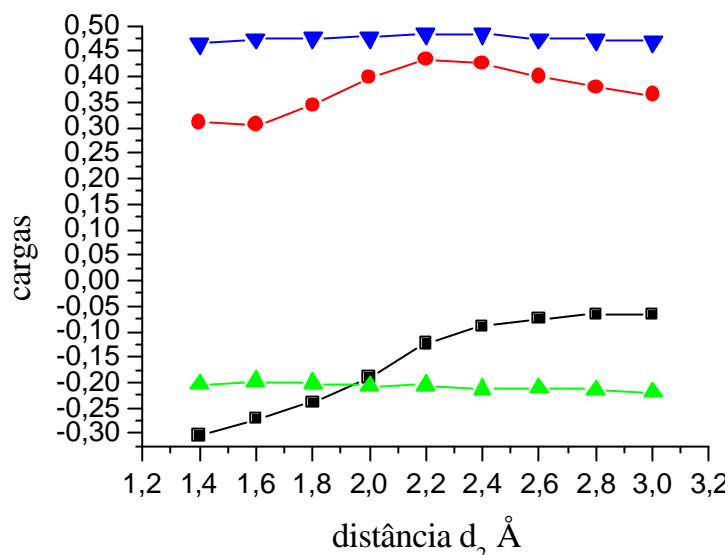


Figura 5.41. Evolução das cargas dos átomos C1' (azul), C2' (vermelho), C3' (verde) do oxigênio ligado a C2' e C5 (preto) em função da distância d_2 e com a distância d_1 fixa em 2,23 Å.

Pode ser constatado que as cargas de C1' e C3' não sofrem variações consideráveis. A carga parcial negativa do átomo de oxigênio, ligado a C2' e C5, sofre uma diminuição considerável enquanto a carga parcial positiva de C2' tem um aumento, diminuindo em seguida. Esses resultados mostram que com a quebra da ligação com o fosfato há inicialmente uma diminuição da densidade eletrônica de C2' que, a seguir, é estabilizada pela carga negativa cedida pelo oxigênio. A análise desses resultados permite concluir que o carbocátion é estabilizado pelo átomo de oxigênio ligado ao carbono C2' e C5.

A segunda parte da simulação computacional foi realizada variando-se as distâncias d_3 e d_4 , mostradas na Figura 5.35. A distância d_3 foi variada de 1,10 Å a 2,30 Å com incrementos constantes de 0,20 Å enquanto a distância d_4 foi variada de 0,96 Å até 1,56 Å com incrementos constantes de 0,20 Å. A permutação dessas distâncias resultou em 28 estruturas cujos calores de formação foram calculados. Com os calores de formação calculados para

cada estrutura foram obtidos 54 pontos, utilizados para construir a superfície de entalpia relativa, do modelo, em função de d_3 e d_4 (Figura 5.42).

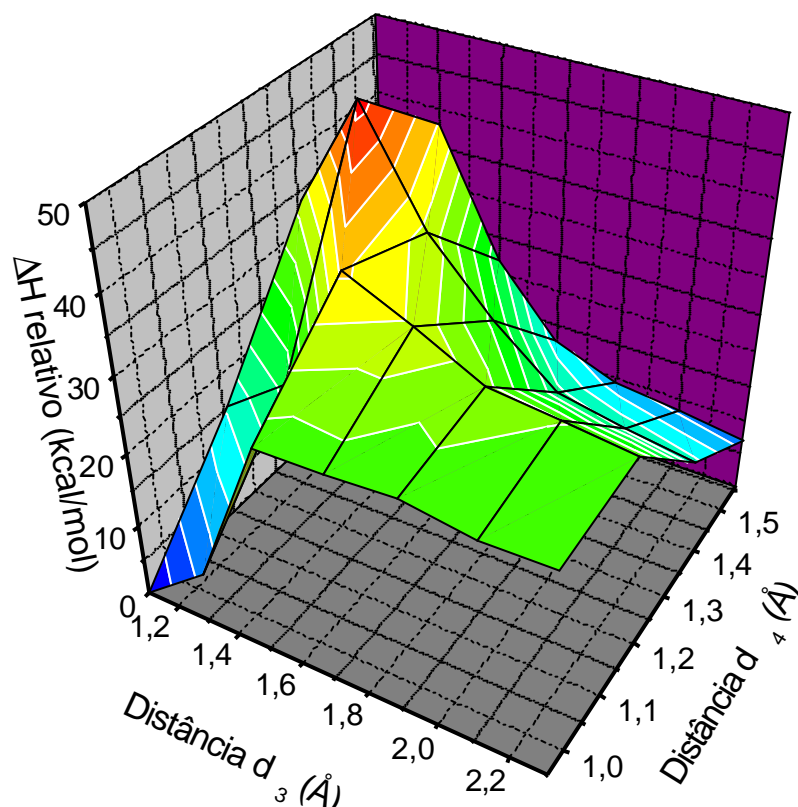


Figura 5.42. Segunda parte da superfície de entalpia do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_3 e d_4 .

Observando a Figura 5.42, constata-se que a reação ocorre através de um processo não concertado. O caminho de menor custo energético, nessa reação, ocorre primeiro com a abstração do átomo de hidrogênio da metila pelo átomo de oxigênio da hidroxila ligada ao carbono C4 do fragmento do S3P. Com a abstração de um átomo de hidrogênio da metila pela hidroxila ligada ao carbono C4 do fragmento do S3P, ocorre a formação de uma dupla ligação entre os átomos de carbono C2' e C3'. Em seguida, o resíduo Asp334 abstrai um dos átomos de hidrogênio da hidroxila protonada formando o produto EPSP.

Para avaliar as barreiras de entalpia envolvidas nessa parte da reação, foi construído um gráfico com os contornos da superfície de entalpia em função das distâncias d_3 e d_4 , mostrado na Figura 5.43.

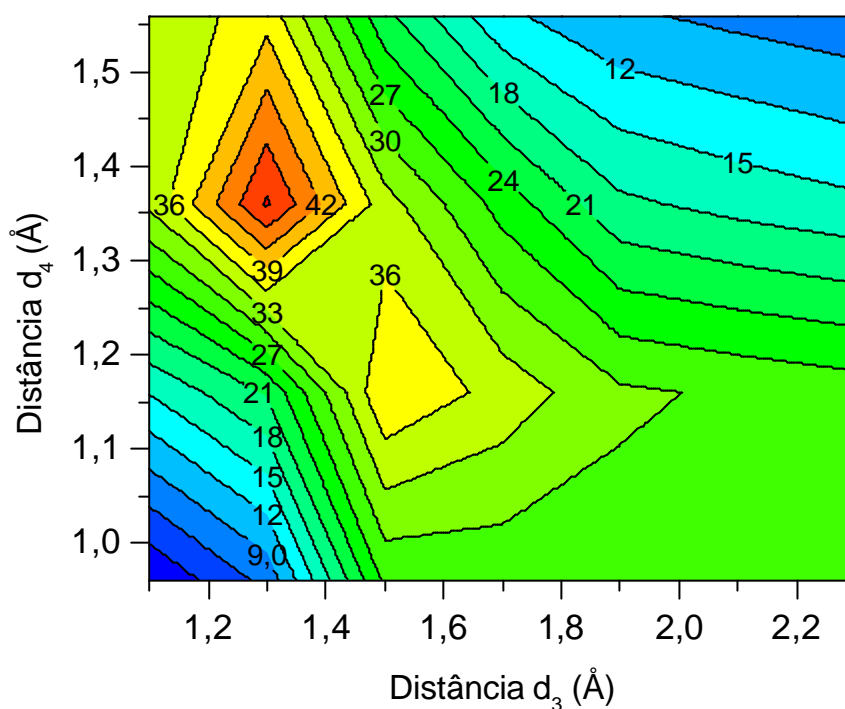


Figura 5.43. Contornos de entalpia da segunda parte do mecanismo, com Lys432 atuando como catalisador ácido e Asp334 atuando como catalisador básico indireto, em função das distâncias d_3 e d_4 .

Observa-se que, apesar do caminho não ser concertado, não há a formação clara de um intermediário; a transferência do átomo de hidrogênio da metila para a hidroxila é acompanhada de um aumento de entalpia de aproximadamente 30 kcal/mol; a abstração do átomo de hidrogênio da hidroxila protonada pelo carboxilato de Asp334 ocorre sem nenhuma barreira aparente.

As análises dos resultados das duas partes da simulação computacional da catálise ácida, com a participação da Lys432 atuando como ácido e do Asp334 atuando como catalisador básico, através de um processo indireto, indicam que essa é uma possível rota do

mecanismo de reação entre o S3P e PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*. Esses resultados também sugerem que esse mecanismo poderia ocorrer em 4 etapas, mostradas na Figura 5.44.

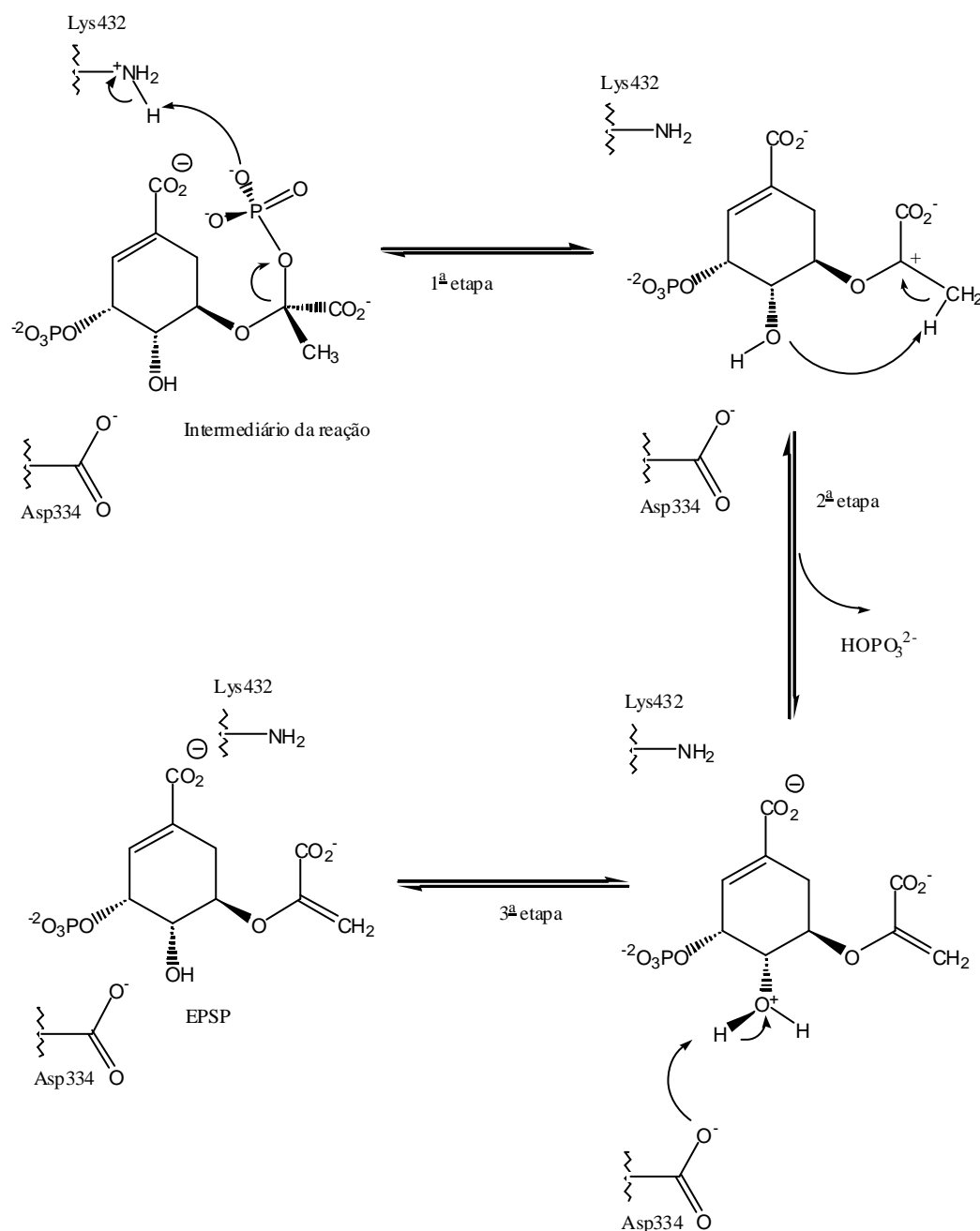


Figura 5.44. Esquema com as quatro etapas propostas, para a reação de eliminação, construídas após a avaliação dos resultados, com Lys432 atuando como catalisador ácido e do Asp334 atuando como catalisador básico indireto.

5.5.7. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DOS MECANISMOS DE REAÇÃO

Nessa parte do trabalho são comparados os resultados das simulações computacionais da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisado pela EPSPS de *O. sativa*. Para facilitar a comparação os mecanismos simulados nas seções 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3, 5.5.4, 5.5.5 e 5.5.6 foram chamados, respectivamente, de mecanismos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. A Tabela 5.3 mostra os mecanismos simulados e as respectivas barreiras de entalpia a serem ultrapassadas em cada etapa.

Tabela 5.4 Mecanismos simulados, as etapas e as respectivas barreiras de entalpia.

Mecanismo	Barreira de entalpia (kcal/mol)		
	1 ^a etapa	2 ^a etapa	3 ^a etapa
1 Glu362 como base	36	30	-
2 Asp334 como base	35	15	-
3 Lys432 como ácido e Glu362 como base	7	40	zero
4 Lys432 como ácido e Asp334 como base	7	56	14
5 Asp334 como base (indireta)	40	14	zero
6 Lys432 como ácido e Asp334 como base (indireta)	zero concertado	30	zero

Os aminoácidos Glu362 e Asp334 são os resíduos básicos mais próximos e em melhor posição para atuarem como base direta, abstraindo um próton da metila do intermediário tetraédrico provocando a saída do grupo fosfato e levando a formação da EPSP. Glu362 está a uma distância de 2,26 Å de um dos átomos de hidrogênio da metila, enquanto o Asp334 está a 2,58 Å. Usando como critério inicial a distância a ser percorrida pelo próton, o resíduo

Glu362 inicialmente seria o melhor candidato a atuar como a base direta na etapa de eliminação. Ao comparar os resultados dos mecanismos 1 e 2, foi constatado que os dois casos ocorrem em duas etapas, sendo que no primeiro forma-se como intermediário um carbocátion (pela saída do fosfato) e, no segundo, um carbânion (pela desprotonação de C3'), com barreiras similares. Foi constatado que a barreira de entalpia a ser ultrapassada na segunda etapa é menor para o mecanismo 2 (saída do fosfato) do que para o mecanismo 1 (desprotonação de C3').

Pela teoria clássica do estado de transição de Eyring e colaboradores (GLASSTONE *et al.*, 1941), a entalpia de ativação, ou seja, a variação de entalpia envolvida na formação do estado de transição a partir dos reagentes, corresponde à energia de ativação E_a da equação de Arrhenius,

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (74)$$

Assumindo um fator pré-exponencial semelhante em todos os mecanismos avaliados, já que todos partem do mesmo ponto inicial, as barreiras de entalpia obtidas refletem em boa parte as constantes de velocidade de cada proposta mecanística. Naturalmente, pelas limitações dos modelos usados, os valores só podem ser considerados qualitativamente, mas são um indicativo de que a eliminação com catálise básica de Asp334 ocorreria mais rapidamente com catálise básica de Glu362.

Ao comparar os mecanismos 3 e 4, pode ser observado que ambos ocorrem em três etapas. Na primeira etapa a barreira de energia potencial a ser ultrapassada é a mesma para os dois mecanismos. Na segunda etapa a barreira de energia potencial a ser ultrapassada é de 40 kcal/mol para o mecanismo 3, enquanto para o mecanismo 4 é de 56 kcal/mol. Na terceira etapa a barreira a ser ultrapassada é de zero para o mecanismo 3 e de 14 kcal/mol no mecanismo 4. Portanto, nas duas últimas etapas as barreiras a serem ultrapassadas no mecanismo 3 são menores quando comparadas com o mecanismo 4. Pelas mesmas

considerações acima, esse resultado sugere que, após a protonação do grupo de saída fosfato, a eliminação com catálise básica de Glu362 ocorreria mais rapidamente do que com catálise básica de Asp334, inverso ao observado na ausência de catálise ácida.

Ao comparar os mecanismos 5 e 6 pode ser constatado que ambos ocorrem em 3 etapas. Na primeira etapa a barreira de entalpia a ser ultrapassada no mecanismo 5 é de 40 kcal/mol, enquanto no mecanismo 6 essa barreira praticamente nula. Na segunda etapa do mecanismo 5, a barreira a ser ultrapassada é de 14 kcal/mol e do mecanismo 6 é de 30 kcal/mol; na terceira etapa, as barreiras em ambos os mecanismos são nulas. O mecanismo 6 é previsto como o mais rápido, porque depende de ultrapassar apenas uma barreira de potencial de 30 kcal/mol, enquanto o mecanismo 5 depende de duas barreiras, sendo uma delas maior do que 30 kcal.

Ao comparar os mecanismos 2, 3 e 6, pode ser constatado que o mecanismo 6 se completa depois de ultrapassar apenas uma barreira de 30 kcal/mol, enquanto que nos mecanismos 2 e 3 devem ser ultrapassadas mais barreiras, sendo que em ambos os casos uma delas maior do que 30 kcal/mol. Portanto, conclui-se que dentre os mecanismos 1 a 6, o mais rápido seria o mecanismo 6. Esse mecanismo concorda com os resultados de Eschenburg e colaboradores, que mostraram que a substituição de Asp313 na EPSPS de *E. coli*, que corresponde a Asp334 na EPSPS de *O. sativa*, impede a conversão do IT nos produtos da reação. Concorda também com a proposta destes mesmos autores com relação à catálise básica indireta do resíduo de aspartato, mas, por outro lado, mostra a necessidade do auxílio da catálise ácida de Lys432, que protona o grupo de saída. Sem esse auxílio, a catálise básica indireta do aspartato não é o mecanismo mais rápido. Além disso, deve ser destacado que, diferente do proposto por esses autores, não consideramos Lys26 (que corresponde a Lys22 na EPSPS de *E. coli*) capaz de protonar o átomo C3' do IT, porque sua cadeia lateral está localizada do lado oposto a esse átomo.

5.6. INTERAÇÃO DO DIBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA E DO DIISOBUTILFOSFORIL-P-CARBOXIFENILIDRAZONA COM A EPSPS DE *O. SATIVA*

Nessa parte do trabalho são apresentados os resultados da modelagem da interação dos compostos dibutilfosforil-*p*-carboxifenilidrazona (composto 1) e diisobutilfosforil-*p*-carboxifenilidrazona (composto 2), otimizados no interior do sítio ativo da enzima EPSPS de *O. ativa*.

Ao se observar essa estrutura otimizada contendo o composto 1, pôde ser constatado que o composto está encaixado na região do sítio ativo formando um complexo estável com os aminoácidos próximos. Isto pode ser observado pela sobreposição dos sítios otimizados contendo o IT e o composto 1 (Figura 5.45).

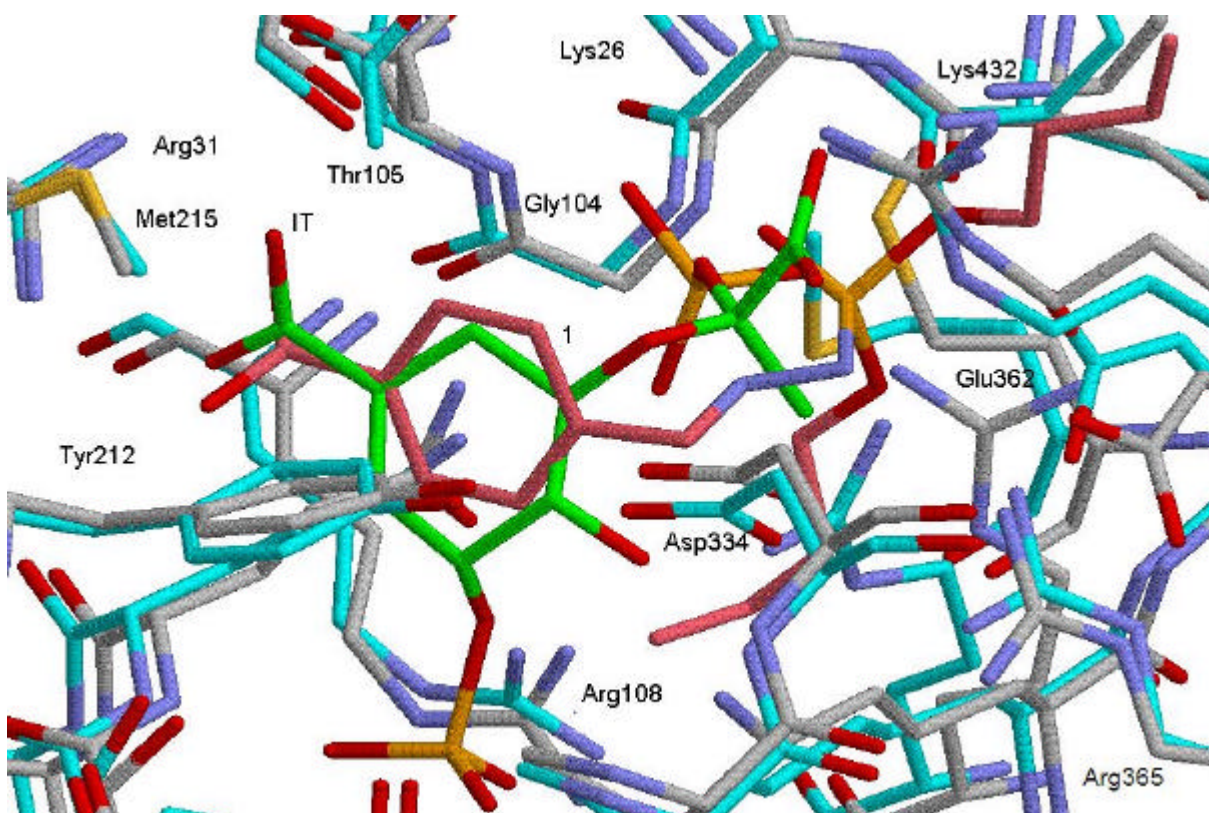


Figura 5.45. Sobreposição dos complexos formados entre os aminoácidos do sítio ativo da EPSPS de *O. sativa* e o IT e o composto 1, após otimização (método PM3). Átomos de H foram omitidos para maior clareza. Átomos de C: cinza (aminoácidos no complexo EPSPS/1), ciano (aminoácidos no complexo EPSPS/IT), rosa (1), verde (IT); átomos de O: vermelho; átomos de N: azul; átomos de P: laranja; átomos de S: amarelo.

As posições de energia mínima do IT e do composto **1** no sítio são notavelmente semelhantes, com excessão da região onde se encontram os grupos *n*-butil, que não têm equivalente na estrutura do IT. A observação de detalhes da interação do composto **1** com os aminoácidos do sítio ativo mostrou que a enzima faz importantes ligações hidrogênio com três aminoácidos positivamente carregados, Arg31, Lys26 e Lys432 e com um negativamente carregado, Glu362 (Figura 5.46). Essas ligações de hidrogênio mostram que o composto sintetizado forma um complexo estável com os aminoácidos do sítio ativo da EPSPS de *O. sativa*. Há outras interações presentes, como uma interação do tipo “empilhamento T” entre os anéis aromáticos de **1** e de Tyr212. Mesmo a ausência em **1** de um grupo equivalente ao grupo fosfato ligado no átomo C3 do IT não parece ser crítica, visto que esse grupo faz ligações hidrogênio com grupos não carregados da proteína, que devem ser mais fracas e menos importantes para a estabilidade do complexo. Por outro lado, apesar do sítio ativo da EPSPS sendo essencialmente hidrofílico, os grupos *n*-butil assumiram uma conformação que permitiu um encaixe aparentemente estável em duas cavidades longas no sítio ativo.

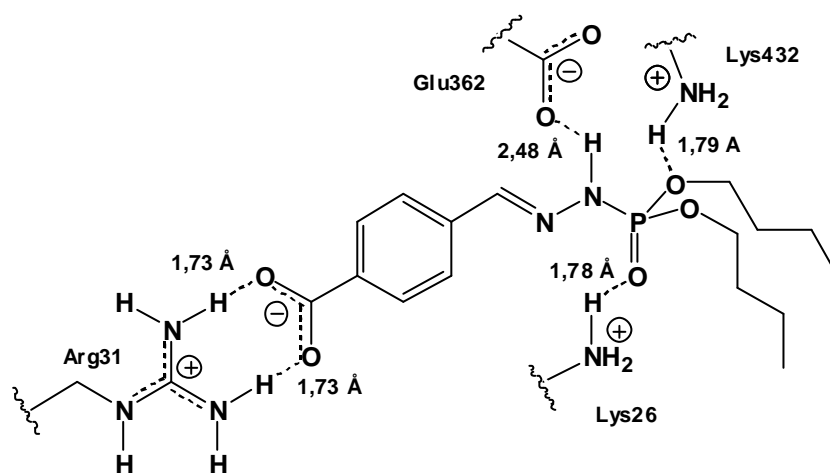


Figura 5.46. Descrição das ligações hidrogênio formadas com aminoácidos do sítio ativo, após otimização do composto **1** no interior da EPSPS de *O. sativa*.

Como a estrutura de **1** ocupa tanto o sítio do S3P quanto do PEP, propomos que sua inserção no sítio deve dificultar a aproximação de ambos substratos. Isso impediria a biossíntese do EPSP, o que poderia explicar os resultados de inibição da germinação.

Após otimização da geometria do complexo formado pelo composto **2**, por outro lado, não foi conseguida uma geometria estável com o composto completamente inserido na cavidade. A instabilidade do complexo entre a EPSPS de *O. sativa* e o composto **2** sugere que provavelmente este não exibe características para inibir a enzima. Uma das possíveis razões para isso é que os grupos isobutil de **2**, por serem mais volumosos, não conseguem se encaixar nas cavidades do sítio onde os grupos *n*-butil de **1** se encaixaram. Essa interação desfavorável por impedimento estérico acabaria impedindo o estabelecimento das outras interações com o sítio ativo.

6. CONCLUSÕES

A determinação dos estados de protonação dos resíduos básicos de lisina e histidina em proteínas por meio da modelagem com o método PM3 concordam com os dados obtidos por difração de nêutrons. Esses resultados permitem concluir que o método PM3 é adequado para avaliar os estados de protonação desses resíduos de aminoácidos em ambiente enzimático.

Usando o método PM3 foram estudados os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos His385, Lys22, Lys340 e Lys411, do sítio ativo da mutante Asp313Ala da EPSPS de *E. coli* no momento de formação do IT. Os resultados permitem concluir que, no momento de formação do IT, o resíduo His385 está neutro e os resíduos Lys22, Lys340 e Lys411 estão protonadas. Propomos, no entanto, que Lys340 (e seu correspondente na EPSPS de *O. sativa*, Lys361), por ser o único resíduo do lado correto para atuar como ácido e protonar o átomo C3 do PEP na etapa de adição, estaria desprotonado (neutro) na estrutura nativa da enzima. O estado protonado observado deve-se possivelmente a eventos ocorridos após a formação do IT, que podem ter tido tempo para ocorrer porque a enzima mutante não foi capaz de levar a reação ao estado final, formando EPSP e fosfato.

Para estudar a etapa de eliminação do mecanismo de reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *O. sativa* foi construído um modelo homólogo da enzima usando a seqüência primária da EPSPS de *O. sativa* e as estruturas cristalográficas da EPSPS de *E. coli* depositadas no *Protein Data Bank* com os códigos 1X8R (PRIESTMAN *et al.*, 2005) e 1G6S (SCHÖBRUNN *et al.*, 2001). A avaliação do modelo permite concluir que a metodologia de preparação foi bastante adequada, permitindo a obtenção de um modelo 3D para a seqüência primária com qualidade. Apenas 8 dos 442 resíduos (menos de 2%) apresentaram conformações fora das áreas permitidas do gráfico de Ramachandran e nenhum deles fazia

parte do sítio ativo enzimático. Trata-se da primeira estrutura tridimensional disponível para a EPSPS de uma espécie vegetal, que deve ser útil para o estudo de futuros herbicidas.

Foi estudada a etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *O. sativa*, através de simulações computacionais usando o método PM3, com seis mecanismos diferentes: catálise básica por Glu362, catálise básica por Asp334, catálise básica por Glu362 junto com catálise ácida por Lys432, catálise básica por Asp334 junto com catálise ácida por Lys432, catálise básica indireta por Asp334 e catálise básica indireta por Asp334 junto com catálise ácida por Lys432. Os mecanismos foram avaliados incluindo todos os resíduos e moléculas de água do sítio ativo da enzima, e na presença do efeito do solvente.

Os resultados permitem concluir que, dentre os mecanismos estudados, a proposta de catálise básica indireta por Asp334 junto com catálise ácida por Lys432 é a mais provável. Isso está de acordo com os resultados de Eschenburg e colaboradores, que foram capazes de isolar o IT no sítio ativo da EPSPS de *E. coli* somente após a mutação de Asp313 (que corresponde a Asp334 em *O. sativa*) para uma alanina. Entretanto, nosso estudo traz uma visão mais completa do mecanismo, pois mostra a necessidade da protonação prévia do grupo fosfato pelo resíduo Lys432 para que Asp334 atue posteriormente como catalisador básico em um mecanismo indireto, onde o grupo OH ligado a C4 é a base que de fato desprotona o átomo C3' do IT. Como o próton que é retirado por essa hidroxila e o grupo fosfato são antiperiplanares, a estereoquímica da eliminação é anti e, portanto, a estereoquímica da adição deve ser sin.

Os estudos com o modelo da EPSPS de *O. sativa* com compostos sintetizados por nosso grupo que apresentaram perfis diferentes de atividade como inibidores da germinação de sementes permitem concluir que o composto mais ativo, dibutilfosforil-*p*-carboxifenilidrazona, é capaz de interagir de forma eficiente com o sítio ativo da enzima, ocupando simultaneamente os sítios do S3P e do PEP.

7. PERSPECTIVAS

O mecanismo de reação entre o S3P e o PEP, catalisado pela EPSPS, tem sido proposto através de trabalhos onde foram utilizadas técnicas de marcação isotópica, estudo da cinética de reações, metagênese, análise de partição e raios-X para obtenção de estruturas cristalográficas dessa enzima. A metodologia utilizada nesse trabalho mostrou-se inovadora e adequada para escolher dentre as propostas estudadas a mais provável, para a etapa de eliminação desse mecanismo.

O estudo da etapa de eliminação do mecanismo da reação entre o S3P e o PEP, catalisado pela EPSPS, não fica esgotado nesse trabalho. Outras possibilidades de estudo para essa etapa são: a Lys26 atuando como catalisador ácido; a auto-catálise. Ambos serão os próximos objetos de estudo, utilizando a mesma metodologia.

Pretende-se também, utilizando métodos de modelagem computacional, avaliar as propostas existentes e outras possibilidades para o mecanismo da etapa de adição da reação entre o PEP e o S3P catalizado pela EPSPS, e avaliar a interação de compostos sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa com o sítio ativo da enzima EPSPS proveniente de *O. sativa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v-215, p-403-410, 1990.

AN, M.; MAITRA, U.; NEIDLEIN, U.; AND BARTLETT, P. A. 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase: Chemical Synthesis of the Tetrahedral Intermediate and Assignment of the Stereochemical Course of the Enzymatic Reaction. **J. Am. Chem. Soc.**, v-125, p-12759-12767, 2003.

ANDERSON, K. S.; SIKORSKI, J. A.; JOHNSONS, K. A. A Tetrahedral Intermediate in the EPSP Synthase Reaction Observed by Rapid Quench Kinetics. **Biochemistry**, v-27, p-7395-7406, 1988.

ANTON, D. L.; HEDSTROM, L.; FISH, S. M.; ABELES, R. H. Mechanism of Enolpyruvyl Shikimate-3-phosphate Synthase Exchange of Phosphoenolpyruvate with Solvent Protons. **Biochemistry**, v-22, p-5903-5908, 1983.

ASANO, Y.; LEE, J. J.; SHIEH, T. L.; SPREAFICO, F.; KOWAL, C.; FLOSS, H. G. Steric course of the reactions catalyzed by 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, chorismate mutase, and anthranilate synthase. **J. Am. Chem. Soc.**, v-107, p-4314-4320, 1985.

BALLHAUSEN, C.J. E GRAY, H. B. **Molecular Orbital Theory**. W. A. Benjamin, Inc, 1965.

BARLOW, P. N.; APPLEYARD, R. J.; WILSON, B. J. O.; EVANS, J. N. S. Direct observation of the enzyme-intermediate complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase by ¹³C NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v-28, p-7985-7991, 1989.

BENACH, J.; LEE, I.; EDSTROM, W.; KUZIN, A. P.; CHIANG, Y.; ACTON, T. B.; MONTELIONE, G. T.; HUNT, J. F. The 2.3-Å Crystal Structure of the Shikimate 5-Dehydrogenase Orthologue YdiB from *Escherichia coli* Suggests a Novel Catalytic Environment for an NAD-dependent Dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v-278, p-19176-19182, 2003.

BENDER, S.L., MEHDI, S.; KNOWLES, J.R. Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. **Biochemistry**, v-28, p-7555-7560, 1989.

BENTLEY, R. The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** v-25, p-307-384, 1990.

BONDINELL, W. E.; VNEK, J.; KNOWLES, P. F.; SPRECHER, M.; SPRINSON, D. B. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase. **J. Biol. Chem.** v-246, p-6191-6196, 1971.

BORN, M., OPPENHEIMER, R. Quantum theory of the molecules. **Ann Physik**, v. 84, p.457, 1927.

BORNEMANN, S.; LOWE, D.J.; THORNELEY, R.N. The transient kinetics of Escherichia coli chorismate synthase: substrate consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. **Biochemistry**, v-35, p-9907-9916, 1996.

BORNEMANN, S.; THEOCLITOU, M.E.; BRUNE, M.; WEBB, M.R.; THORNELEY, R.N.; ABELL, C. A secondary β deuterium kinetic isotope effect in the chorismate synthase reaction. **Bioorg. Chem**, v-28, p-191-204, 2000.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos Metálicos com o Herbicida Glifosato: **Revisão. Química Nova**, v-28, 6, p-1038-1045, 2005.

DAHM, C.; MÜLLER, R.; SCHULTE, G.; SCHMIDT, K.; LEISTNER, E. The role of isochorismate hydroxymutase genes entC and menF in enterobactin and enaquinone biosynthesis in Escherichia coli. **Biochim. Biophys Acta**, v-1425, p-377-386, 1998.

DAVIS, B. D.; WEISS, U. Aromatic biosynthesis. VIII. The roles of 5-dehydroquinic acid and quinic acid. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v-220(1-2), p-1-15, 1953.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v-107(13), p-3902, 1985.

ESCHENBURG, S.; KABSCH, W.; HEALYS, M. L.; SCHÖNBRUNN, E. J. A New View of the Mechanisms of UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) and 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase (AroA) Derived from X-ray Structures of Their Tetrahedral Reaction Intermediate States. **Biol. Chem**, v-278, p-49215-49222, 2003.

FLOSS, H.G., ONDERKA, D.K.; CARROLL, M. Stereochemistry of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase reaction and the chorismate synthetase reaction. **J. Biol. Chem**, p-247, v-736-744, 1972.

GEORGE, D. V. Principles of Quantum Chemistry. Pergamon Press Inc, 1992.

GLASS, R. L. Metal complex formation by glyphosate. **J. Agric. Food Chem**, v-32, p-1249-1253, 1984.

GOURLEY, D.G., SHRIVE, A.K., POLIKARPOV, I., KRELL, T., COGGINS, J.R., HAWKINS, A.R., ISAACS, N.W.; SAWYER, L. The two types of 3-dehydroquinase have distinct structures but catalyze the same overall reaction. **Nature Struct. Biol**, v-6, p-521-525, 1999.

GRIMSHAW, C. E.; SOGO, S. G.; COPLEY, S. D.; KNOWLES, J. R. Synthesis of stereoselectively labeled [9-2H,3H]chorismate and the stereochemical course of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase. **Journal of the American Chemical Society**, v-106(9), p-2699-2700, 1984.

GRIMSHAW, C. E.; SOGO, S. G.; KNOWLES, J. R. The fate of the hydrogens of phosphoenolpyruvate in the reaction catalyzed by 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Isotope effects and isotope exchange. **The Journal of biological chemistry**, v-257(2), p-596-598, 1982.

GUEX, N. AND PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**, v-18, p-2714-2723, 1997.

JAKEMAN, D.L., MITCHELL, D.J., SHUTTLEWORTH, W.A.; EVANS, J.N. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Biochemistry**, v-37, p-12012-12019, 1998.

JUREMA, M. W.; SHIELDS, G. C. Ability of the PM3 quantum-mechanical method to model intermolecular hydrogen bonding between neutral molecules. **J. Comp. Chem**, v-14 p-89-104, 1993.

KATZ, A. K.; LI, X.; CARRELL, HANSON, B. L.; LANGAN, P.; COATES, L.; SCHOENBORN, B. P.; GLUSKER, J. P.; BUNICK, G. J. Locating active-site hydrogen atoms in D-xylose isomerase: time-of-flight neutron diffraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v-103(22), p-8342-8347, 2006.

KIM, D. H.; TUCKER-KELLOGG, G. W.; LEES, W. J.; WALSH, C. Analysis of Fluoromethyl Group Chirality Establishes a Common Stereochemical Course for the Enolpyruvyl Transfers Catalyzed by EPSP Synthase and UDP-GlcNAc Enolpyruvyl Transferase. **Biochemistry**, v-35, p-5435-5440, 1996.

KISHORE, G. M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annu. Rev. Biochem**, v-57, p-627-663, 1988.

KLAMT, A.; SCHÜÜMANN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry**, (1972-1999) (1993), (5), p-799-805, 1993.

KOSSIAKOFF. A. A. Use of the neutron diffraction--H/D exchange technique to determine the conformational dynamics of trypsin. **Basic life sciences**, v-27, p-281-304, 1984.

LEE, J. J.; ASANO, Y.; SHIEH, T. L.; SPREAFICO, F.; LEE, K.; FLOSS, H. G. Steric course of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase and anthranilate synthetase reactions. **J. Am. Chem. Soc**, v-106, p-3367-3368, 1984.

LEES, W. J.; WALSH, C. T. Analysis of the Enol Ether Transfer Catalyzed by UDP-GlcNAc Enolpyruvyl Transferase Using (E)- and (Z)-Isomers of Phosphoenolbutyrate: Stereochemical, Partitioning, and Isotope Effect Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v-117(28), p-7329-7337, 1995.

LEVIN, J. G.; SPRINSON, D. B. The Enzymatic Formation And Isolation Of 3-Enolpyruvylshikimate 5-Phosphate. **The Journal of biological chemistry**, v-239, p-1142-50, 1964.

LEWIS, J.; JOHNSON, K. A.; KAREN S. ANDERSON. K.S. The Catalytic Mechanism of EPSP Synthase Revisited. **Biochemistry**, v-38, p-7372-7379,1999.

LIVELY, T. N.; JUREMA, M. W.; SHIELDS, G. C. Hydrogen bonding of nucleotide base pairs: application of the PM3 method. **Int. J. Quant. Chem. Quant. Biol. Symp**, v-21, p-95-107, 1994.

LOWE, J. P. Quantum Chemistry. Academic Press, 1993.

MIZYED, S.; WRIGHT, J. E. I.; BYCZYNSKI, B. P., BERTI, J. Identification of the Catalytic Residues of AroA (Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase) Using Partitioning Analysis. **Biochemistry**, p-42, p-6986-6995, 2003.

MACHIUS, M.; WYNN, R. M.; CHUANG, J. L.; LI, J.; KLUGER, R.; YU, D.; TOMCHICK, D. R.; BRAUTIGAM, C. A.; CHUANG, CHUANG D. T. A Versatile Conformational Switch Regulates Reactivity in Human Branched-Chain α -Ketoacid Dehydrogenase. **Structure**, v-14, p-287-298, 2006.

MORELL, H.; SPRINSON, D.B. Shikimate kinase isoenzymes in *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem** v-243, p-676-677, 1968.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. Editora Livraria da Física, 2007.

NOGUEIRA, A. J. M.; OLIVEIRA, T. L.; SOUZA, M. A. A.; FERREIRA, M. A.; SOUZA, S. R.; LIMA, M. E. F.; COSTA J. B. N. Estudo da atividade inibitória da germinação de sementes de novas dialquilfosforilarilidrazonas. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Resumo, QB-018, 2008

OSBORNE, A.; THORNELEY, R.N.; ABELL, C. A.; BORNEMANN, S. Studies with substrate and cofactor analogues provide evidence for a radical mechanism in the chorismate synthase reaction. **J. Biol. Chem** v-275, p-35825-35830, 2000.

PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail **Bio/Technology** v-13(7), p-658-660, 1995.

POPLE, J. A., BEVERIDGE, D. L. Approximate Molecular Orbital Theory. MC Graw-Hill, 1970.

PRIESTMAN, M. A.; HEALY, M. L.; BECKER, A.; ALBERG, D. G.; BARTLETT, P. A.; LUSINGTON, G. H.; SCHÖNBRUNN, E. Interaction of Phosphonate Analogues of the Tetrahedral Reaction Intermediate with 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase in Atomic Detail. **Biochemistry**, v-44, p-3241-3248, 2005.

RAMACHANDRAN, G. N., SASISKEHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv. Protein Chem** v-23, p-283-256, 1968.

REAM, J. E.; YUEN, H. K.; FRAZIER, R. B.; SIKORSKI, J. A. EPSP synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. **Biochemistry**, v-31, p-5528-5534, 1992.

ROBERTS, F., ROBERTS, C. W., JOHNSON, J. J., KYLE, D. E., KRELL, T., COGGINS, J. R., COOMBS, G. H., MILHOUS, W. K., TZIPORI, S., FERGUSON, D. J., CHAKRABARTI, D., MCLEOD, R. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. **Nature**, v-393, p-801–805, 1998.

SAYLE, R. Glaxo Wellcome Research and Development, Stevenage, 1993

SCHÖNBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J. N. S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v-98(4), p-1376-1380, 2001.

SCHROEDER, S.; DAGGETT, V.; KOLLMAN, P. A comparison of the AM1 and PM3 semiempirical models for evaluating model compounds relevant to catalysis by serine proteases. **J. Am. Chem. Soc.**, v-113, p- 8922–8925, 1991.

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v-31, p-3381-3385, 2003.

SKARZYNSKI, T.; KIM, D. H.; LEES, W. J.; WALSH, C. T.; DUNCAN, K. Stereochemical Course of Enzymic Enolpyruvyl Transfer and Catalytic Conformation of the Active Site Revealed by the Crystal Structure of the Fluorinated Analog of the Reaction Tetrahedral Intermediate Bound to the Active Site of the C115A Mutant of MurA. **Biochemistry**, v-37, p-2572–2577, 1998.

SLATER, J. C. The theory of complex spectra. **Physical Review**, v-34, p-1293-1323, 1929.

SOUZA, A. X.; SANT'ANNA, C. M. R. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Determination of the protonation state of active site residues by the semiempirical method. **Bioorganic Chemistry**, v-36, p-113–120, 2008.

SPRINSON, D. B. Advances in carbohydrate chemistry, Vol. 1b, Academic Press, Inc., New York, p. 235, 1960.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods I-Method. **J. Comp. Chem**, v-10, p-209-220, 1989.

STEWART, J. J. P. Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations. **International Journal of Quantum Chemistry**, v-58, p-113, 1996.

STEWART, J. J. P. MOPAC2002, Fujitsu, Tokyo, Japan, 1999.

STEWART, J. J. P. MOPAC 2007 Version 7.2000, , Stewart Computational Chemistry, 2007.

STUDELSKA, D. R.; MCDOWELL, L. M.; ESPE, M. P.; KLUG, C. A.; SCHAEFER, J. Slowed Enzymatic Turnover Allows Characterization of Intermediates by Solid-State NMR.; *Biochemistry*, v-50(36), p-15555-15560, 1997.

TANNOUDJI, C. C.; DIU, B.; LALOË, F. Quantum Mechanics. **John Wiley & Sons**. USA. 1997.

TOTH, K.; AMYES, T. L.; WOOD, B. M.; CHAN, K.; GERLT, J. A. AND RICHARD, J. P. Product Deuterium Isotope Effect for Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase: Evidence for the Existence of a Short-Lived Carbanion Intermediate. **J. AM. CHEM. SOC**, v-129, p-12946-12947, 2007.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A.; HÜNENBERGER, P. H.; KRÜGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I.G. Biomolecular Simulations: **The GROMOS96 Manual and User Guide**. VdF Hochschulverlag ETHZ, Zürich, 1996.

VAN TEGELEN, L.J.; MORENO, P.R.; CROES, A.F.; VERPOORTE, R.; WULLEMS, G.J. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Physiol**, v-119, p-705-712, 1999.

WALTERS, P; STAHI, M.. Babel 1.6; Tucson, AZ. University of Arizona, 1996.

WIDLANSKI, T.; BENDER, L. L.; KNOWLES, J. R. Dehydroquinase Synthase: The Use of Substrate Analogues To Probe the Late Steps of the Catalyzed Reaction. **Biochemistry**, v-28, p-7572-1582, 1989.

ZEMELL, R. I.; ANWAR, R. A. Mechanism of Pyruvate-Uridine Diphospho-IV-acetylglucosamine Transferase. **The Journal Of Biological Chemistry**, v-250, p-4959-4964, 1975.

ZHENG, Y. J.; MERZ JR, K. M. Study of hydrogen bonding interactions relevant to biomolecular structure and function. **Journal of Computational Chemistry**, v-13, p-1151-1169, 1992.

APÊNDICE A

Tabela A.1. Mostra as distâncias d_1 e d_2 usadas na simulação computacional com participação do glu362 atuando como base direta. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e calores de formação relativos calculados. Dados usados para construir a figura 5.6 e 5.7.

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,09	1,38	-4167,188	4,603
est 2	1,09	1,58	-4157,584	4,834
est 3	1,09	1,78	-4138,879	4,629
est 4	1,09	1,98	-4123,922	4,317
est 5	1,09	2,18	-4125,152	4,810
est 6	1,09	2,38	-4122,562	4,059
est 7	1,09	2,58	-4129,861	4,616
est 8	1,09	2,78	-4129,538	4,459
est 9	1,09	2,98	-4127,613	3,885
est 10	1,09	3,18	-4124,764	3,821
est 11	1,39	1,38	-4144,785	4,652
est 12	1,39	1,58	-4134,136	4,369
est 13	1,39	1,78	-4116,111	4,406
est 14	1,39	1,98	-4109,402	2,984
est 15	1,39	2,18	-4107,037	4,119
est 16	1,39	2,38	-4105,213	4,917
est 17	1,39	2,58	-4105,469	4,471
est 18	1,39	2,78	-4104,370	3,838
est 19	1,39	2,98	-4103,727	4,192
est 20	1,39	3,18	-4101,731	4,950
est 21	1,69	1,38	-4135,746	3,296
est 22	1,69	1,58	-4124,272	2,808
est 23	1,69	1,78	-4104,967	4,683
est 24	1,69	1,98	-4090,129	3,241
est 25	1,69	2,18	-4095,224	4,731

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 26	1,69	2,38	-4114,325	4,693
est 27	1,69	2,58	-4117,841	3,722
est 28	1,69	2,78	-4119,834	4,013
est 29	1,69	2,98	-4120,704	4,324
est 30	1,69	3,18	-4128,768	4,629
est 31	1,99	1,38	-4097,244	3,502
est 32	1,99	1,58	-4089,709	4,268
est 33	1,99	1,78	-4098,905	4,348
est 34	1,99	1,98	-4100,590	4,892
est 35	1,99	2,18	-4106,393	4,361
est 36	1,99	2,38	-4111,398	3,626
est 37	1,99	2,58	-4116,792	4,618
est 38	1,99	2,78	-4122,906	4,342
est 39	1,99	2,98	-4123,001	4,197
est 40	1,99	3,18	-4121,317	4,897
est 41	2,29	1,38	-4110,204	2,355
est 42	2,29	1,58	-4108,605	3,190
est 43	2,29	1,78	-4104,869	3,397
est 44	2,29	1,98	-4108,952	3,930
est 45	2,29	2,18	-4116,482	4,774
est 46	2,29	2,38	-4122,897	4,679
est 47	2,29	2,58	-4130,480	4,454
est 48	2,29	2,78	-4133,660	3,661
est 49	2,29	2,98	-4133,367	4,882
est 50	2,29	3,18	-4135,868	3,159

Tabela A. 2. Mostra as distâncias d_1 e d_2 usada na simulação computacional da reação com participação do Asp334. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos. Dados usados para construir a figura 5.12 e 5.13.

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,09	1,38	-4173,445	0,000
est 2	1,09	1,58	-4161,549	11,896
est 3	1,09	1,78	-4144,018	29,427
est 4	1,09	1,98	-4140,232	33,212
est 5	1,09	2,18	-4130,729	42,715
est 6	1,09	2,38	-4130,103	43,342
est 7	1,09	2,58	-4131,712	41,733
est 8	1,09	2,78	-4133,849	39,596
est 9	1,09	2,98	-4134,599	38,846
est 10	1,09	3,18	-4134,236	39,209
est 11	1,39	1,38	-4137,995	35,449
est 12	1,39	1,58	-4127,795	45,650
est 13	1,39	1,78	-4109,130	64,315
est 14	1,39	1,98	-4092,409	81,036
est 15	1,39	2,18	-4098,955	74,490
est 16	1,39	2,38	-4097,868	75,577
est 17	1,39	2,58	-4100,695	72,750
est 18	1,39	2,78	-4100,504	72,940
est 19	1,39	2,98	-4099,392	74,053
est 20	1,39	3,18	-4098,045	75,400
est 21	1,69	1,38	-4139,164	34,280
est 22	1,69	1,58	-4127,923	45,522
est 23	1,69	1,78	-4117,814	55,631
est 24	1,69	1,98	-4103,469	69,976
est 25	1,69	2,18	-4095,668	77,777

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 26	1,69	2,38	-4128,299	45,145
est 27	1,69	2,58	-4132,001	41,444
est 28	1,69	2,78	-4133,479	39,965
est 29	1,69	2,98	-4133,852	39,593
est 30	1,69	3,18	-4137,470	35,975
est 31	1,99	1,38	-4138,070	35,375
est 32	1,99	1,58	-4130,255	43,190
est 33	1,99	1,78	-4119,275	54,170
est 34	1,99	1,98	-4116,914	56,531
est 35	1,99	2,18	-4121,493	51,952
est 36	1,99	2,38	-4133,824	39,621
est 37	1,99	2,58	-4139,584	33,861
est 38	1,99	2,78	-4143,777	29,667
est 39	1,99	2,98	-4145,344	28,101
est 40	1,99	3,18	-4145,906	27,539
est 41	2,29	1,38	-4139,495	33,949
est 42	2,29	1,58	-4131,228	42,217
est 43	2,29	1,78	-4118,875	54,569
est 44	2,29	1,98	-4116,994	56,450
est 45	2,29	2,18	-4120,412	53,033
est 46	2,29	2,38	-4135,455	37,990
est 47	2,29	2,58	-4141,038	32,407
est 48	2,29	2,78	-4144,370	29,075
est 49	2,29	2,98	-4145,568	27,877
est 50	2,29	3,18	-4145,984	27,461

Tabela A.3. Na segunda coluna mostra os valores assumidos pela distância d_1 , na terceira e quarta colunas mostram, respectivamente o calor de formação e o calor de formação relativo calculado para cada estrutura. Dados usados para construir a figura 5.18.

Estruturas	d_1 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
Est1	1,03	-4155,202	9,95
Est2	1,33	-4148,561	16,59
Est3	1,53	-4159,256	5,89
Est4	1,73	-4165,149	0,00
Est5	1,93	-4164,500	0,65
Est6	2,13	-4162,757	2,39
Est7	2,33	-4161,198	3,95

Tabela A.4. Mostra as distâncias d_2 e d_3 usadas na simulação computacional da reação com participação da Lys432 como ácido e do Glu362 como base. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos calculados. Dados usados para construir a figura 5.19 e 5.20.

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,10	1,40	-4197,710	0,000
est 2	1,10	1,60	-4188,168	9,542
est 3	1,10	1,80	-4173,847	23,863
est 4	1,10	2,00	-4162,752	34,958
est 5	1,10	2,20	-4162,116	35,594
est 6	1,10	2,40	-4160,923	36,787
est 7	1,10	2,60	-4162,469	35,240
est 8	1,10	2,80	-4162,613	35,097
est 9	1,10	3,00	-4163,428	34,282
est 10	1,10	3,20	-4161,182	36,528
est 11	1,40	1,40	-4159,184	38,525
est 12	1,40	1,60	-4149,846	47,864
est 13	1,40	1,80	-4137,445	60,265
est 14	1,40	2,00	-4132,627	65,082
est 15	1,40	2,20	-4129,255	68,455
est 16	1,40	2,40	-4128,557	69,153
est 17	1,40	2,60	-4129,100	68,610
est 18	1,40	2,80	-4129,612	68,098
est 19	1,40	3,00	-4128,445	69,265
est 20	1,40	3,20	-4125,007	72,702
est 21	1,70	1,40	-4174,140	23,570
est 22	1,70	1,60	-4161,517	36,193
est 23	1,70	1,80	-4143,164	54,545
est 24	1,70	2,00	-4129,305	68,405
est 25	1,70	2,20	-4147,130	50,579

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 26	1,70	2,40	-4152,723	44,987
est 27	1,70	2,60	-4154,545	43,165
est 28	1,70	2,80	-4155,657	42,053
est 29	1,70	3,00	-4156,274	41,435
est 30	1,70	3,20	-4154,841	42,869
est 31	2,00	1,40	-4162,902	34,807
est 32	2,00	1,60	-4151,460	46,249
est 33	2,00	1,80	-4155,899	41,811
est 34	2,00	2,00	-4164,970	32,739
est 35	2,00	2,20	-4170,233	27,477
est 36	2,00	2,40	-4174,888	22,822
est 37	2,00	2,60	-4177,853	19,857
est 38	2,00	2,80	-4182,441	15,269
est 39	2,00	3,00	-4181,843	15,867
est 40	2,00	3,20	-4180,146	17,564
est 41	2,30	1,40	-4170,687	27,023
est 42	2,30	1,60	-4161,090	36,620
est 43	2,30	1,80	-4158,603	39,106
est 44	2,30	2,00	-4162,363	35,347
est 45	2,30	2,20	-4168,780	28,930
est 46	2,30	2,40	-4173,803	23,907
est 47	2,30	2,60	-4182,586	15,124
est 48	2,30	2,80	-4184,020	13,690
est 49	2,30	3,00	-4184,715	12,994
est 50	2,30	3,20	-4188,172	9,538

Tabela A.5. Mostra as distâncias d_2 e d_3 usadas na simulação computacional da reação com participação da Lys432 atuando como ácido e do Asp334 como base. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos calculados. Dados usados para construir a figura 5.26 e 5.26.

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,10	1,40	-4199,689	0,000
est 2	1,10	1,60	-4188,703	10,985
est 3	1,10	1,80	-4171,407	28,282
est 4	1,10	2,00	-4157,606	42,082
est 5	1,10	2,20	-4149,163	50,526
est 6	1,10	2,40	-4147,423	52,266
est 7	1,10	2,60	-4149,986	49,702
est 8	1,10	2,80	-4149,775	49,913
est 9	1,10	3,00	-4148,783	50,905
est 10	1,10	3,20	-4151,843	47,846
est 11	1,40	1,40	-4163,564	36,125
est 12	1,40	1,60	-4154,523	45,166
est 13	1,40	1,80	-4142,959	56,730
est 14	1,40	2,00	-4133,001	66,688
est 15	1,40	2,20	-4130,331	69,357
est 16	1,40	2,40	-4129,938	69,751
est 17	1,40	2,60	-4129,926	69,762
est 18	1,40	2,80	-4130,094	69,594
est 19	1,40	3,00	-4128,359	71,329
est 20	1,40	3,20	-4133,097	66,592
est 21	1,70	1,40	-4131,165	68,523
est 22	1,70	1,60	-4121,980	77,708
est 23	1,70	1,80	-4112,734	86,955
est 24	1,70	2,00	-4104,526	95,163
est 25	1,70	2,20	-4137,266	62,422

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 26	1,70	2,40	-4143,833	55,855
est 27	1,70	2,60	-4149,608	50,081
est 28	1,70	2,80	-4152,392	47,296
est 29	1,70	3,00	-4153,686	46,002
est 30	1,70	3,20	-4157,965	41,723
est 31	2,00	1,40	-4137,124	62,565
est 32	2,00	1,60	-4133,817	65,872
est 33	2,00	1,80	-4131,116	68,573
est 34	2,00	2,00	-4135,747	63,942
est 35	2,00	2,20	-4147,997	51,692
est 36	2,00	2,40	-4154,068	45,621
est 37	2,00	2,60	-4161,602	38,086
est 38	2,00	2,80	-4164,011	35,677
est 39	2,00	3,00	-4166,892	32,796
est 40	2,00	3,20	-4169,256	30,433
est 41	2,30	1,40	-4130,404	69,285
est 42	2,30	1,60	-4127,212	72,477
est 43	2,30	1,80	-4123,626	76,062
est 44	2,30	2,00	-4132,059	67,630
est 45	2,30	2,20	-4139,780	59,909
est 46	2,30	2,40	-4152,173	47,516
est 47	2,30	2,60	-4155,127	44,562
est 48	2,30	2,80	-4159,800	39,889
est 49	2,30	3,00	-4160,312	39,376
est 50	2,30	3,20	-4172,159	27,529

Tabela A. 6. Mostra os valores da distância d_1 com o Asp334 atuando como base indireta. Na terceira e quarta colunas mostram, respectivamente o calor de formação e o calor de formação relativo calculado para cada estrutura. Dados usados para construir a figura 5.31.

Estruturas	Distância d_1 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
Est1	0,96	-4175,620	0,000
Est2	1,26	-4151,343	24,276
Est3	1,56	-4134,197	41,423
Est4	1,86	-4139,140	36,480
Est5	2,16	-4137,533	38,087
Est6	2,46	-4135,169	40,451
Est7	2,76	-4131,652	43,968

Tabela A.7. Mostra as distâncias d_2 e d_3 usadas na simulação computacional da reação com participação do Asp334 atuando como base através de um processo indireto. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos. Dados usados para construir a figura 5.32 e 5.33.

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,04	1,38	-4120,287	17,914
est 2	1,04	1,58	-4110,408	27,793
est 3	1,04	1,78	-4095,726	42,476
est 4	1,04	1,98	-4079,421	58,781
est 5	1,04	2,18	-4070,225	67,976
est 6	1,04	2,38	-4080,670	47,646
est 7	1,04	2,58	-4082,777	55,424
est 8	1,04	2,78	-4082,531	55,670
est 9	1,04	2,98	-4087,164	51,037
est 10	1,04	3,18	-4085,337	52,865
est 11	1,39	1,38	-4109,146	29,055
est 12	1,39	1,58	-4098,979	39,222
est 13	1,39	1,78	-4080,505	57,696
est 14	1,39	1,98	-4064,974	73,227
est 15	1,39	2,18	-4064,762	73,440
est 16	1,39	2,38	-4064,614	73,587
est 17	1,39	2,58	-4082,985	55,216
est 18	1,39	2,78	-4085,416	52,785
est 19	1,39	2,98	-4086,112	52,089
est 20	1,39	3,18	-4085,996	52,205
est 21	1,69	1,38	-4097,999	40,202
est 22	1,69	1,58	-4090,128	48,073
est 23	1,69	1,78	-4079,459	58,742
est 24	1,69	1,98	-4083,745	54,456
est 25	1,69	2,18	-4091,649	46,552

est	d_2 (Å)	d_3 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 26	1,69	2,38	-4102,953	35,248
est 27	1,69	2,58	-4107,102	31,099
est 28	1,69	2,78	-4114,086	24,115
est 29	1,69	2,98	-4115,487	22,714
est 30	1,69	3,18	-4115,921	22,281
est 31	1,99	1,38	-4089,396	48,805
est 32	1,99	1,58	-4100,099	38,102
est 33	1,99	1,78	-4086,779	51,422
est 34	1,99	1,98	-4092,036	46,165
est 35	1,99	2,18	-4095,280	42,921
est 36	1,99	2,38	-4100,221	37,981
est 37	1,99	2,58	-4109,170	29,031
est 38	1,99	2,78	-4119,220	18,981
est 39	1,99	2,98	-4120,923	17,279
est 40	1,99	3,18	-4121,241	16,960
est 41	2,29	1,38	-4128,316	9,885
est 42	2,29	1,58	-4120,962	17,239
est 43	2,29	1,78	-4108,228	29,974
est 44	2,29	1,98	-4104,229	33,972
est 45	2,29	2,18	-4116,794	21,407
est 46	2,29	2,38	-4125,742	12,460
est 47	2,29	2,58	-4129,443	8,759
est 48	2,29	2,78	-4136,376	1,825
est 49	2,29	2,98	-4138,201	0,000
est 50	2,29	3,18	-4137,533	0,668

Tabela A. 8. Mostra as distâncias d_1 e d_2 usadas na simulação computacional da reação com participação da Lys432 atuando como catalisador ácido e do Asp334 atuando como base através de um processo indireto. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos. Dados usados para construir a figura 5.39 e 5.40.

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	1,03	1,40	-4169,607	0,000
est 2	1,03	1,60	-4161,154	8,452
est 3	1,03	1,80	-4144,683	24,924
est 4	1,03	2,00	-4130,407	39,200
est 5	1,03	2,20	-4135,985	33,622
est 6	1,03	2,40	-4133,710	35,897
est 7	1,03	2,60	-4137,635	31,972
est 8	1,03	2,80	-4136,353	33,253
est 9	1,03	3,00	-4142,658	26,948
est 10	1,33	1,40	-4171,438	-1,831
est 11	1,33	1,60	-4160,910	8,697
est 12	1,33	1,80	-4144,285	25,321
est 13	1,33	2,00	-4134,504	35,102
est 14	1,33	2,20	-4127,966	41,641
est 15	1,33	2,40	-4126,317	43,290
est 16	1,33	2,60	-4126,663	42,944
est 17	1,33	2,80	-4128,904	40,703
est 18	1,33	3,00	-4129,132	40,475
est 19	1,63	1,40	-4194,350	-24,743
est 20	1,63	1,60	-4186,662	-17,056
est 21	1,63	1,80	-4171,235	-1,628
est 22	1,63	2,00	-4158,904	10,703
est 23	1,63	2,20	-4151,726	17,880
est 24	1,63	2,40	-4152,826	16,781
est 25	1,63	2,60	-4156,332	13,275
est 26	1,63	2,80	-4155,610	13,997
est 27	1,63	3,00	-4155,099	14,508

est	d_1 (Å)	d_2 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 28	1,93	1,40	-4183,317	-13,710
est 29	1,93	1,60	-4175,265	-5,658
est 30	1,93	1,80	-4162,579	7,028
est 31	1,93	2,00	-4151,677	17,929
est 32	1,93	2,20	-4145,818	23,788
est 33	1,93	2,40	-4147,167	22,439
est 34	1,93	2,60	-4147,527	22,079
est 35	1,93	2,80	-4148,736	20,870
est 36	1,93	3,00	-4146,792	22,815
est 37	2,23	1,40	-4212,961	-43,354
est 38	2,23	1,60	-4207,778	-38,171
est 39	2,23	1,80	-4192,294	-22,687
est 40	2,23	2,00	-4180,003	-10,396
est 41	2,23	2,20	-4177,532	-7,925
est 42	2,23	2,40	-4176,225	-6,618
est 43	2,23	2,60	-4178,546	-8,939
est 44	2,23	2,80	-4178,909	-9,302
est 45	2,23	3,00	-4180,210	-10,603
est 46	2,43	1,40	-4161,731	7,876
est 47	2,43	1,60	-4172,445	-2,838
est 48	2,43	1,80	-4156,205	13,401
est 49	2,43	2,00	-4142,606	27,001
est 50	2,43	2,20	-4136,102	33,505
est 51	2,43	2,40	-4138,613	30,994
est 52	2,43	2,60	-4138,363	31,244
est 53	2,43	2,80	-4140,862	28,744
est 54	2,43	3,00	-4139,975	29,632

Tabela A. 9. Mostra as distâncias d_3 e d_4 usadas na simulação computacional da reação com participação da Lys432 atuando como catalisador ácido e do Asp334 atuando como base através de um processo indireto. Na quarta e quinta colunas são mostrados, respectivamente, os calores de formação e os calores de formação relativos. Dados usados para construir a figura 5.42 e 5.43.

est	d_3 (Å)	d_4 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 1	0,96	1,10	-4183,622	0,000
est 2	0,96	1,30	-4176,747	6,875
est 3	0,96	1,50	-4156,053	27,569
est 4	0,96	1,70	-4155,735	27,886
est 5	0,96	1,90	-4155,043	28,579
est 6	0,96	2,10	-4156,473	27,148
est 7	0,96	2,30	-4156,240	27,382
est 8	1,16	1,10	-4168,499	15,123
est 9	1,16	1,30	-4162,254	21,367
est 10	1,16	1,50	-4144,807	38,815
est 11	1,16	1,70	-4148,737	34,884
est 12	1,16	1,90	-4153,083	30,539
est 13	1,16	2,10	-4154,129	29,492
est 14	1,16	2,30	-4155,130	28,492
est 15	1,36	1,10	-4150,059	33,562
est 16	1,36	1,30	-4135,228	48,394
est 17	1,36	1,50	-4149,304	34,318
est 18	1,36	1,70	-4157,879	25,743
est 19	1,36	1,90	-4164,982	18,640
est 20	1,36	2,10	-4166,672	16,950
est 21	1,36	2,30	-4168,004	15,618

est	d_3 (Å)	d_4 (Å)	ΔH (kcal/mol)	ΔH relativo (kcal/mol)
est 22	1,56	1,10	-4150,364	33,258
est 23	1,56	1,30	-4145,707	37,915
est 24	1,56	1,50	-4161,881	21,741
est 25	1,56	1,70	-4170,971	12,650
est 26	1,56	1,90	-4174,141	9,481
est 27	1,56	2,10	-4175,425	8,196
est 28	1,56	2,30	-4176,574	7,048
est 29	1,76	1,10	-4148,604	35,018
est 30	1,76	1,30	-4147,585	36,037
est 31	1,76	1,50	-4164,715	18,907
est 32	1,76	1,70	-4174,434	9,188
est 33	1,76	1,90	-4140,510	43,112
est 34	1,76	2,10	-4146,142	37,480
est 35	1,76	2,30	-4147,980	35,641
est 36	1,96	1,10	-4141,710	41,912
est 37	1,96	1,30	-4147,212	36,410
est 38	1,96	1,50	-4165,766	17,856
est 39	1,96	1,70	-4174,977	8,645
est 40	1,96	1,90	-4153,182	30,440
est 41	1,96	2,10	-4156,081	27,541
est 42	1,96	2,30	-4158,007	25,615