



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
DOUTORADO EM FÍSICA

EVELINE MATIAS BEZERRA

**BIOQUÍMICA QUÂNTICA DO ANTI-HIPERTENSIVO LOSARTAN-SACE E DO
ANTI-INFLAMATÓRIO MINOTC-PLA2**

FORTALEZA

2022

EVELINE MATIAS BEZERRA

BIOQUÍMICA QUÂNTICA DO ANTI-HIPERTENSIVO LOSARTAN-SACE E DO
ANTI-INFLAMATÓRIO MINOTC-PLA2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

Coorientador: Prof. Dr. Eudenilson Lins de Albuquerque.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469b Bezerra, Eveline Matias.

Bioquímica quântica do anti-hipertensivo losartan-sACE e do anti-inflamatório minoTc-PLA2 / Eveline Matias Bezerra. – 2022.

126 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Física, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

Coorientação: Prof. Dr. Eudênilson Lins de Albuquerque.

1. Losartan. 2. Docking. 3. sACE. 4. MFCC. 5. minoTc. I. Título.

CDD 530

EVELINE MATIAS BEZERRA

BIOQUÍMICA QUÂNTICA DO ANTI-HIPERTENSIVO LOSARTAN-SACE E DO
ANTI-INFLAMATÓRIO MINOTC-PLA2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada

Aprovada em: 18/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eudenilson Lins de Albuquerque (Coorientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Cláudia do Ô Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Eudenilson Lins de Albuquerque, Profa. Dra. Cláudia do Ô Pessoa, Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire, Prof. Dr. Pedro de Lima Neto e Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

À Profa. Cláudia do Ô Pessoa, pelas importantes orientações durante a minha vida acadêmica.

Aos Profs. Eudenilson L. Albuquerque e Umberto Laino Fulco e ao seu grupo de pesquisa na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, por toda a infraestrutura oferecida.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Física da UFC, por toda a formação acadêmica e aos servidores do Departamento de Física, em especial à Rejane.

Aos novos e antigos colegas do Departamento de Física da UFC pela convivência sempre amigável, em especial à Francisco Orlando dos Santos Costa, companheiro de disciplinas do doutorado em Física.

Ao meu grande e eterno amigo da graduação na UECE, Francisco Roberto O. da Silva, que mesmo distante sempre esteve do meu lado.

À Regina, pela amizade, pela convivência harmoniosa, as risadas no laboratório.

Ao Roner, meu companheiro não apenas de pesquisa, mas de vida, por quase sempre concordar comigo.

À todos os docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPgCEM) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), que me fizeram crescer como pessoa e como pesquisadora.

À Universidade Federal do Ceará pelos servidores sempre a nossa disposição, pelos laboratórios e toda estrutura de pesquisa na área de modelagem molecular.

À toda e qualquer pessoa que por ventura tenha contribuído de alguma forma com este trabalho.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

E, finalmente, agradeço à minha família.

"The discovery of the structure of DNA and its relationship to DNA function had a tremendous impact on all subsequent biochemical investigations, (...)" (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020, p. 383.)

RESUMO

É de conhecimento que a ação de um fármaco está diretamente relacionado à sua constituição química. No entanto, essa afirmação foi observada pela primeira vez apenas em 1868. O desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura é importante área de pesquisa onde uma compreensão detalhada das interações ligante-proteína é a chave para o sucesso. Desta forma, há um grande interesse em métodos computacionais para prever e descrever as interações ligante-proteína. A conformação tridimensional do ligante (fármaco) é importante para a interação dele com o sítio de ligação da proteína. Portanto, a distribuição espacial da estrutura da molécula define como o sítio de ligação será preenchido para ter o potencial de fazer as interações intermoleculares com os aminoácidos do sítio. Assim, é necessário uma determinada configuração espacial do ligante no receptor para que as interações intermoleculares sejam estabelecidas. Na presente tese foi realizado estudo *in silico* de dois importantes sistemas: LST-sACE e minoTc-PLA2. O primeiro estudo, envolve a enzima conversora de angiotensina (ACE), e foi estudada a interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) com a sACE através de bioquímica quântica. O losartan (LST) é um potente e seletivo antagonista do receptor da angiotensina II (Ang II) tipo 1 (AT1) amplamente utilizado no tratamento da hipertensão. A formação da Ang II é catalisada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA) através da clivagem proteolítica da angiotensina I (Ang I), que está envolvida no controle da pressão arterial. Diante disso, investigamos como o losartan pode interagir com a enzima sACE para bloquear sua atividade e sinalização intracelular. Após realizar ensaios de docking molecular seguido por cálculos de bioquímica quântica usando dados cristalográficos do losartan e sACE, concluímos que seus resultados de interação revelam um novo mecanismo de ação com implicações importantes para a compreensão de seus efeitos sobre a hipertensão. Em seguida, foi avaliado como as constantes dielétricas homogêneas e não-homogêneas podem influenciar as energias de interação da tetraciclina lipofílica minociclina com a enzima fosfolipase A2 (PLA2).

Palavras-chave: losartan; docking; sACE; mfcc; hipertensão; inflamação; PLA2; minociclina; constante dielétrica; energia de interação.

ABSTRACT

It is known that the action of a drug is directly related to its chemical constitution. However, this claim was first noted only in 1868. Structure-based drug development is an important area of research where a detailed understanding of ligand-protein interactions is key to success. Thus, there is great interest in computational methods to predict and describe ligand-protein interactions. The three-dimensional conformation of the ligand (drug) is important for its interaction with the binding site of the protein. Therefore, the spatial distribution of the molecule's structure defines how the binding site will be filled to have the potential to make intermolecular interactions with the amino acids of the site. Thus, a specific spatial configuration of the ligand in the receptor is necessary for the intermolecular interactions to be established. In the present thesis, a *in silico* study of two important systems was carried out: LST-sACE and minoTc-PLA2. The first study involves the angiotensin-converting enzyme (ACE) and was to study the interaction of the antihypertensive drugs lisinopril (LPR) and losartan (LST) with sACE through quantum biochemistry. Losartan (LST) is a potent and selective antagonist of the angiotensin II (Ang II) type 1 (AT1) receptor widely used in the treatment of hypertension. The formation of Ang II is catalyzed by the angiotensin I converting enzyme (ACE) through the proteolytic cleavage of angiotensin I (Ang I), which is involved in the control of blood pressure. Therefore, we investigated how losartan can interact with the sACE enzyme to block its activity and intracellular signaling. After performing molecular docking assays followed by quantum biochemistry calculations using crystallographic data from losartan and sACE, we conclude that their interaction results reveal a new mechanism of action with important implications for understanding their effects on hypertension. Then, it was evaluated how the homogeneous and non-homogeneous dielectric constants can influence the interaction energies of the lipophilic tetracycline minocycline with the enzyme phospholipase A2 (PLA2).

Keywords: losartan; docking; sACE; mfcc; hypertension; inflammation; PLA2; minocycline; dielectric constant; interaction energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Representação esquemática dos métodos de modelagem molecular.	23
Figura 2	–	Representação esquemática dos métodos de modelagem molecular.	23
Figura 3	–	Estrutura do coração. (a) Circulação pulmonar e câmaras do coração. (b) circulação sistêmica.	32
Figura 4	–	Valores de referência da pressão arterial sistólica (eixo x , horizontal) e diastólico (eixo y , vertical).	33
Figura 5	–	Via farmacodinâmica dos fármacos que agem no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Os principais envolvidos nesta via são: AGT, angiotensinogênio; REN, renina; ACE, enzima conversora de angiotensina; AGTR1, receptor de angiotensina II tipo 1.	34
Figura 6	–	O domínio N da sACE dividido em duas metades, ou seja, os subdomínios I e II, mostrados em rosa e azul, respectivamente. O domínio catalítico da sACE (mostrado em amarelo) contém o sítio de ligação do zinco HEMGH. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	36
Figura 7	–	Visão geral do monômero da sACE co-cristalizada com o inibidor lisinopril (LPR), LPR-sACE, obtido por difração de raios-X, PDB 2C6N (CORRADI <i>et al.</i> , 2006). Os íons zinco mostrado em cinza, cloreto em laranja e o lisinopril (carbono verde), ilustrando os elementos da estrutura secundária da proteína. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	37
Figura 8	–	Representação das estruturas do (a) lisinopril (LPR, $C_{21}H_{31}N_3O_5$, DrugBank DB00722) e (b) losartan (LST, $C_{22}H_{24}ClN_6O$) com rótulos de átomos. . . .	39
Figura 9	–	Representação de bola e bastão do (a) lisinopril (LPR, $C_{21}H_{31}N_3O_5$) e do (b) losartan (LST, $C_{22}H_{24}ClN_6O$) com rótulos dos átomos. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro), enquanto os átomos de não carbono são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi desenhada usando PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org). . .	40

Figura 10 – Estratégia de <i>docking</i> molecular. Estrutura alvo conhecida, programa de <i>docking</i> , uso de banco de dados e <i>design</i> de um novo inibidor.	40
Figura 11 – Estratégia de <i>docking</i> molecular: LPR e LST na sACE.	41
Figura 12 – Equação geral da DFT.	43
Figura 13 – Esquema utilizado para o cálculo da energia de interação através de uma adaptação do método MFCC, mostrando os respectivos <i>caps</i> , resíduos de aminoácidos A_{i-1} , A_i e A_{i+1} , usados na metodologia.	44
Figura 14 – (a) Representação de bola e bastão do lisinopril (LPR) e do losartan (LST) com a blindagem de aminoácidos S_1 . (b) Superposição na mesma orientação com o sítio de ligação ao zinco da sACE, blindagem S_1 . Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos de acordo com o tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Todos os resíduos estão devidamente rotulados. A figura foi desenhada usando PyMOL(Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	46
Figura 15 – Representação de bola e bastão do lisinopril (LPR) e do losartan (LST) com a blindagem de aminoácidos S_2 -LPR e S_2 -LST. Superposição na mesma orientação com o sítio de ligação ao zinco da sACE, (a) blindagem formada por resíduos de aminoácidos dentro de 3 Å com 14 aminoácidos para S_2 -LPR; e (b) blindagem formada por resíduos de aminoácidos dentro de 3 Å e para S_2 -LST. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos de acordo com o tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Todos os resíduos estão devidamente rotulados. A figura foi desenhada usando PyMOL(Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	47

Figura 16 – Sobreposição estrutural da ligação do LPR (PDB 2C6N) e a melhor pose do LST após <i>docking</i> flexível no sítio de ligação da sACE. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos de não carbono são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon de zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, http://www.cgl.ucsf.edu/chimera) (PETTERSEN <i>et al.</i> , 2004).	50
Figura 17 – Energia total de interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR, verde) e losartan (LST, azul) com a sACE relativo às distâncias r de interação de $r_1 = 4 \text{ \AA}$, $r_2 = 8 \text{ \AA}$, $r_3 = 16 \text{ \AA}$, $r_4 = 20 \text{ \AA}$, $r_5 = 24 \text{ \AA}$ e $r_6 = 42 \text{ \AA}$	51
Figura 18 – Energia total de interação do complexo LPR-sACE (quadrados sólidos verdes) e complexo LST-sACE (círculos sólidos azuis claros) em função do raio do sítio de ligação usando o método MFCC - os principais aminoácidos envolvidos na interação de ligação são indicados para LPR-sACE (retângulos verdes, superior) e LST-sACE (retângulos azuis, inferior) agrupados pela distância ao ligante indicado pelas linhas verticais laranja tracejadas. A cor vermelha (azul) é pra destacar os aminoácidos carregados negativamente (positivamente).	54
Figura 19 – (a) Painel gráfico do sítio de ligação, energia de interação e domínio de resíduos (BIRD) com os principais resíduos de aminoácidos da sACE e suas contribuições da energia de interação para o LPR (barras verdes) e o LST (barras azuis). Os átomos mais próximos do LPR e do LST são indicados ao lado de cada barra. A cor vermelha (azul) significa resíduos de aminoácidos carregados negativamente (positivamente). A representação planar das moléculas (b) LPR e (c) LST são subdivididas em três partes i (amarelo), ii (verde) e iii (azul) para LPR e iv (roxo), v (rosa) e vi (laranja) para LST, com átomos marcados para facilitar a análise de sua interação com a proteína alvo sACE.)	55

Figura 20 – As projeções da energia de interação, $E_i(L-A_i)$, com os ligantes (LPR e LST) e a sACE para cada aminoácido são codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-55 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 10 kcal mol^{-1} (escuro vermelho). LPR-sACE (a) e LST-sACE (b) são exibidos na mesma orientação, com os ligantes mostrados na representação de bola e bastão. Em (c) LST-sACE e (d) LPR-sACE a vista é girada em 60° ao longo do eixo x , em comparação com (a) e (b), respectivamente, mostrando a superfície ao longo da enzima. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 59

Figura 21 – Representação da interação tridimensional entre a pose do ligante cristalográfica de (a) LPR-sACE e a melhor previsão de pose de ligante de *docking* (c) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Também são mostrados o diagrama de interação bidimensional do ligante da pose do ligante, com (b) LPR e (d) LST apresentando diferentes interações com os resíduos da sACE obtidos a partir da cristalografia (LPR) e a melhor previsão de pose de *docking* de LST na sACE. Os resíduos destacados. A figura foi obtida usando o software Discovery Studio Visualizer (ambiente de modelagem de estúdio Discovery, Versão 19.1; <http://www.accelrys.com> (BIOVIA, 2019)). 61

Figura 22 – Pose do ligante cristalográfica de (a) LPR-sACE e a melhor previsão de pose de ligante de <i>docking</i> (c) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Destaque aos aminoácidos dentro do sítio de ligação da sACE para o (b) LPR e (d) LST. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	62
Figura 23 – Sítio de ligação do (a-b) LPR-sACE e (c-d) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Destaque aos aminoácidos dentro do sítio de ligação da sACE para o (b) LPR e (d) LST. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	63
Figura 24 – Caminho da inflamação.	68
Figura 25 – Conformação 2D da minoTc (esquerda) e configuração 3D (direita)	70
Figura 26 – Visão geral do trímero (direita) e monômero (esquerda) da PLA2 co-cristalizada com o a minociclina (minoTc), uma tetraciclina lipofílica, minoTc-PLA2, obtida por difração de raios-X, PDB 2WQ5 (DALM <i>et al.</i> , 2010). No lado esquerdo a minoTc (carbono amarelo), ilustrando os elementos da estrutura secundária da PLA2. No lado direito temos cada monômero da PLA2 foi colorido diferente e a minoTc destacada em cada monômero (carbono verde) A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; http://www.pymol.org).	72
Figura 27 – Visão esquemática mostrando a estratégia MFCC para ligação dissulfeto. . .	74

- Figura 28 – Ilustração da região de interesse onde será calculado o valor médio da constante dielétrica utilizada para obtenção da energia de interação, usando como exemplo o aminácido Asp da PLA2 e a minoTc (PDB 2WQ5). A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>). 76
- Figura 29 – Histograma (eixo esquerdo), frequência acumulada (eixo direito) e gráfico de caixa de todos os valores dielétricos obtidos para o sistema onde os triângulos delimitam o intervalo mínimo-máximo, as barras marcam o intervalo 10-90%, a linha representa a mediana e o quadrado, uma média dos valores definidos. 78
- Figura 30 – As projeções da função dielétrica, $\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$, na PLA2 para cada aminoácido codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala que varia entre 20 (lilás) e 57 (vermelho). (a) a minoTc é destacada na representação bola e bastão, carbono cinza, e os átomos coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio cinza claro). Em (b) e (c) a vista é girada em 45° e 90° ao longo do eixo z, respectivamente, em comparação com (a), mostrando a superfície ao longo da enzima PLA2. A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 79
- Figura 31 – Corte transversal para evidenciar no sítio de ligação da PLA2 as projeções da função dielétrica, $\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$, na PLA2 para cada aminoácido codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala que varia entre 21 (lilás) e 57 (vermelho). (a) a minoTc é destacada na representação bola e bastão, carbono cinza, e os átomos coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio cinza claro). Em (b) e (c) a vista é girada em 45° e 90° ao longo do eixo z, respectivamente, em comparação com (a), mostrando a superfície ao longo da enzima PLA2. A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 80

- Figura 32 – Gráfico em barras da distribuição de energia de interação minoTc-PLA2 por constante dielétrica e por raio. No eixo x temos a constante dielétrica homogênea [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)], já no eixo y temos a distância r do aminoácido relação a minoTc onde é feita a soma das energias de interação. 81
- Figura 33 – Energia total de interação do sistema minoTc-PLA2 em função do raio do sítio de ligação usando a estratégia MFCC para as constantes dielétricas homogêneas D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e não-homogênea DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7) no eixo esquerdo e D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) no eixo direito. Os principais aminoácidos envolvidos na interação são indicados nos retângulos amarelos (constante dielétrica homogênea e não-homogênea) e retângulos azuis (apenas para D01) agrupados pela distância ao ligante (minoTc) indicado pelas linhas verticais sólidas verde (topo figura). As principais metodologias destacadas na base. . . 83
- Figura 34 – Distribuição da da energia de interação $E_i(\text{minoTc-}A_i)$ para cada aminoácido A_i da enzima PLA2 pela distância r (Å) para as constantes dielétricas homogêneas (D01, D04, D10, D30, D40 e D80) e não-homogênea (DF). . . 85
- Figura 35 – Painel BIRD. 87
- Figura 36 – As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-}A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 88

Figura 37 – A vista é girada em 45° ao longo do eixo y em comparação com a Fig. 36. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-A}_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 89

Figura 38 – Corte transversal realizado na Fig. 36 para evidenciar o sítio de ligação da PLA2. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-A}_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 90

Figura 39 – A vista é girada em 45° ao longo do eixo x em comparação com a Fig. 38. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc}-A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004). 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de interações moleculares e força de interação.	24
Tabela 2 – Aminoácidos que fazem parte das blindagens S_1 e S_2 para cada ligante. Em negrito estão destacados os aminoácidos que estão presentes para ambos os ligantes.	46
Tabela 3 – Energia de interação, E_i em kcal mol^{-1} , dos aminoácidos mais importantes da sACE com o ligante (LPR e LST) detalhando os átomos envolvidos na interação, a região e a distância r (em Å) ao ligante.	57
Tabela 4 – Ligações dissulfeto presentes na PLA2 (PDB 2WQ5).	73
Tabela 5 – Relação dos valores da função dielétrica não-homogênea para os aminoácidos A_i com pelo menos um átomo em $r \leq 8.0$ Å. A_i é o aminoácidos de interesse, r (Å) é a distância do aminoácido i em relação a minoTc e $\bar{\epsilon}_{\text{minotc-}A_i}$ é a função dielétrica não-homogênea obtida através da Eq. 7.7.	78
Tabela 6 – Relação dos valores da energia de interação por constante dielétrica [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)] somados nos intervalos de distância $r = 2, 3, 6, 10, 12, 15$ e 24 Å (proteínas inteira).	81
Tabela 7 – Relação dos valores da energia de interação total do complexo minoTc-PLA2 para as constantes dielétricas homogênea [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)].	84
Tabela 8 – Maiores energias de interação E_i dos aminoácidos (A_i) do complexo minoTc-PLA2 para as constantes dielétricas homogêneas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água) e não-homogênea DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$ dado pela Eq. 7.7); r_i é a distância dada em (Å) entre o átomo do aminoácido i da PLA2 e o átomo da minoTc.	86

- Tabela 9 – Energia de interação de todos os aminoácidos da sACE com LPR e LST. LPR = lisinopril; LST = losartan; A_i = aminoácidos; sACE = átomo do aminoácido A_i que interage com o ligante; aLPR = átomo do LPR que interage com o aminoácido; aLST = átomo do LST que interage com o aminoácido; r_{LPR} (r_{LST}) é a distância dada em (Å) entre os átomo da sACE e o átomo do LPR (LST); $E_i(\text{LPR})$ ($E_i(\text{LST})$) é a energia de interação obtida através da estratégia MFCC do aminoácido A_i da sACE com o ligante LPR (LST). 103
- Tabela 10 – Energia de interação de todos os aminoácidos da PLA2 com a minoTc para as constantes dielétricas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$ dado pela Eq. 7.7); r_i é a distância dada em (Å) entre os átomo do aminoácido i PLA2 e o átomo da minoTc; $\bar{\epsilon}$ é o valor da constante dielétrica obtida pela Eq. 7.7. 121

SUMÁRIO

1	SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE SISTEMAS BIOLÓGICOS .	21
1.1	Introdução	21
1.2	Interações entre micro e biomacromoléculas	24
1.2.1	<i>Ligações iônicas ou eletrostáticas</i>	<i>25</i>
1.2.2	<i>Ligações de hidrogênio</i>	<i>25</i>
1.2.3	<i>Interações de van der Waals (vdW)</i>	<i>26</i>
1.2.4	<i>Dipolo-dipolo e íon-dipolo</i>	<i>26</i>
1.2.5	<i>Interações hidrofóbicas</i>	<i>26</i>
1.3	Constante dielétrica, interações eletrostáticas em proteínas	27
1.4	Escopo da tese	29
2	HIPERTENSÃO	31
2.1	O que é hipertensão?	31
2.2	Farmacoterapia da hipertensão	32
2.3	Alvos para o tratamento da hipertensão	35
2.3.1	<i>Enzima Conversora de Angiotensina (ACE)</i>	<i>35</i>
3	FARMACOLOGIA MOLECULAR QUÂNTICA: LPR-SACE E LST-SACE	37
3.1	Dados estruturais	38
3.2	Docking Molecular	39
3.3	Cálculos DFT	42
3.4	Estratégia MFCC	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Losartan interage com a enzima sACE de acordo com estudos <i>in silico</i> .	48
4.2	Docking molecular	49
4.3	Energia de interação (MFCC)	49
4.3.1	<i>Energia total de interação LPR- e LST-sACE</i>	<i>51</i>
4.3.2	<i>Perfil de energia</i>	<i>52</i>
4.3.3	<i>Painel BIRD</i>	<i>53</i>
4.4	Superfície de energia de interação	58
4.4.1	<i>Interações moleculares (modelo de ligação 2D e 3D)</i>	<i>58</i>

5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS: LPR E LST-SACE	64
6	MODELAGEM DE BIOMACROMOLÉCULAS: UM ESTUDO SOBRE A "CONSTANTE" DIELÉTRICA	66
6.1	Constante dielétrica	66
6.2	Fosfolipase A2 (PLA2)	67
6.3	Minociclina (minoTc)	69
7	FARMACOLOGIA MOLECULAR QUÂNTICA: MINOTC-PLA2 . . .	71
7.1	Dados estruturais	71
7.2	Cálculos DFT	71
7.3	Estratégia MFCC: minoTc-PLA2	72
7.4	Constante dielétrica não-homogênea (função dielétrica)	75
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
8.1	Constante dielétrica não-homogênea	77
8.2	Superfície da função dielétrica não-homogênea para o sistema minoTc- A_i ($\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-}A_i}$)	77
8.3	Energia de interação (MFCC) - minoTc-PLA2	79
8.3.1	<i>Energia total de interação minoTc-PLA2</i>	80
8.4	Perfil de Energia minoTc-PLA2	82
8.4.1	<i>Painel BIRD</i>	85
8.5	Superfície de energia de interação	86
9	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS: MINOTC-PLA2	92
10	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A –TABELAS	103

1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

A modelagem molecular é uma ferramenta fundamental para o estudo de diversas propriedades de sistemas moleculares, cristais, etc. Ela reuni um conjunto de técnicas que fazem uso de métodos computacionais e, assim, permitem a visualização e manipulação de estruturas moleculares para determinação de parâmetros geométricos (comprimento, ângulos e diedros, por exemplo) e/ou eletrônicos (momento de dipolo, potencial de ionização, energia dos orbitais de fronteira, entre outro) de moléculas isoladas, proteínas e complexos (ligante-receptor), por exemplo. O *design* e desenvolvimento de fármacos é uma área de pesquisa em constante evolução onde a modelagem molecular e, principalmente, a bioquímica quântica, estão tendo um impacto cada vez maior. Este capítulo traz uma introdução sucinta da modelagem molecular no estudo de micro- e macromoléculas.

1.1 Introdução

O dia 25 de abril é o dia internacional do DNA. Há pouco mais de 75 anos Watson e Crick publicaram na revista Nature um artigo, uma letter, com a proposta de uma estrutura para o ácido desoxirribonucleico (WATSON; CRICK, 1953). Assim, um artigo científico de uma única página, mas que causou uma revolução no século XX e, de acordo com a ISI Web of Science, já foi citado mais de 8 mil vezes. Esse tão importante artigo para a comunidade científica inicia com:

We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.).
This structure has novel features which are of considerable biological interest.

E finaliza:

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Em 1962, dez anos após a publicação do artigo, o americano James Dewey Watson, o inglês Francis Henry Crick e o neozelandês Maurice Wilkins foram laureados com o Prêmio Nobel de Medicina pela sua descoberta da estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) (WATSON; CRICK, 1953; WATSON; CRICK, 1953), cujo aspecto mais fascinante foi a criação do modelo em espiral com dupla hélice do DNA, um triunfo pioneiro da modelagem. Desta forma, o gene passou a ser visto como uma entidade química, criando assim uma nova área da

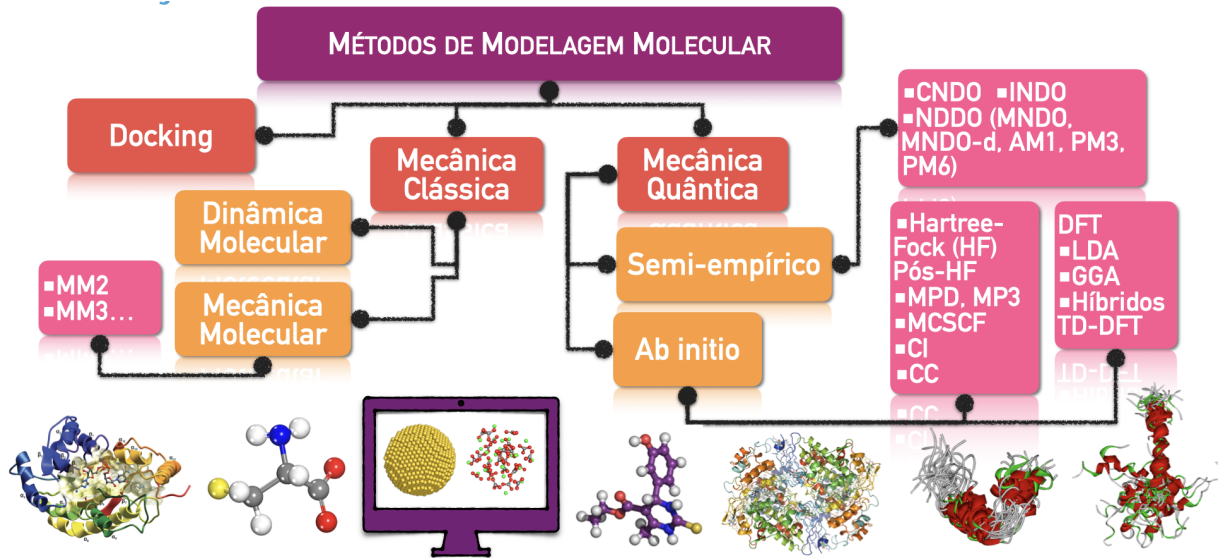
ciência, a biologia molecular. Foram obtidas contribuições importantes no estudo de estruturas de proteínas e enzimas após a elucidação da estrutura do DNA. Em seguida, um grande número de estruturas de proteínas e outras moléculas foram determinadas (SANGER, 1988; HODGKIN, 1965; KENDREW *et al.*, 1958; PERUTZ, 1951; PERUTZ *et al.*, 1960; BLAKE *et al.*, 1965; BERMAN, 2000; COSSIO *et al.*, 2010; COREY; PAULING, 1953). Outros pesquisadores também contribuíram para a descoberta do DNA como, por exemplo, a química britânica Rosalind Franklin, que estudou a estrutura molecular do DNA, seu trabalho foi apresentado em um congresso, em 1951.

A modelagem computacional, ou experimentação *in silico*, representa um dos mais importantes avanços na pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Ferramenta essencial para a investigação e compreensão das propriedades de sistemas nanométricos, no refinamento/construção de novas moléculas com potencial farmacológico e na compreensão das interações moleculares que ocorrem em sistemas biológicos. A modelagem molecular (MM) compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, sendo usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Estes métodos abrangem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, por exemplo, sendo aplicáveis desde a átomos isolados a biomacromoléculas. As técnicas de modelagem molecular podem ser utilizadas em diversas áreas, incluindo a bioquímica computacional, a biologia computacional e a ciência dos materiais.

Os métodos de modelagem molecular derivam, principalmente, de três: docking, mecânica clássica e mecânica quântica (*ab initio*), conforme descrito na Fig. 1. Assim, a modelagem molecular pode ser utilizada para: (i) calcular propriedade de moléculas individuais (geometrias, energia, propriedades eletrônicas, propriedades espectroscópicas); e, também, (ii) calcular propriedades de moléculas associadas como, por exemplo, complexos ligante-proteína (quantificar a energia de interação, determinar relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica, observar o comportamento dinâmico de moléculas e complexos de interesse, entre outros).

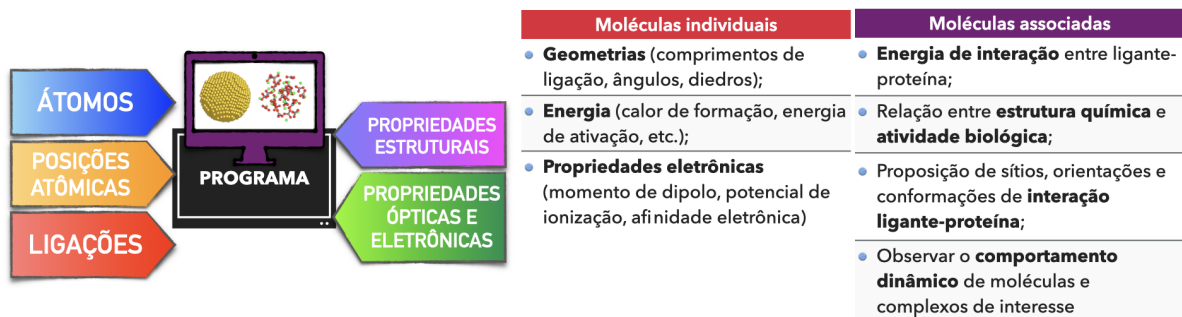
Quando se trata de manipulação computacional de moléculas é necessário uma forma de escrever ou codificar de forma que permita ao computador ler a estrutura molecular tanto para arquivos de entrada quanto para arquivos de saída (com os resultados da simulação). Uma

Figura 1 – Representação esquemática dos métodos de modelagem molecular.



maneira simples de representar a estrutura molecular é utilizando a lista de átomos, posições atômicas e tipos de ligações envolvidas. Assim, esses dados são usados de entrada para o programa de modelagem molecular e que pode ter como resultado as propriedades estruturais, propriedades ópticas e eletrônicas, por exemplo, conforme apresentado na Fig. 2.

Figura 2 – Representação esquemática dos métodos de modelagem molecular.



Apesar do estudo de moléculas isoladas por modelagem molecular poder fornecer informações importantes, entretanto, quando se trata da atividade biológica de fármacos, por exemplo, é importante descrever as interações entre o fármaco e a biomacromolécula responsável pela atividade biológica.

1.2 Interações entre micro e biomacromoléculas

Atualmente, está claro que a ação de um fármaco está diretamente relacionado à sua constituição química. No entanto, essa afirmação foi observada pela primeira vez apenas em 1868 (BROWN; FRASER, 1868). O *design* de novos fármacos baseado na estrutura tem um papel cada vez mais importante na descoberta de medicamentos para tratar diversas doenças. Uma compreensão detalhada das interações ligante-proteína é a chave para o sucesso do desenvolvimento de fármacos baseado em estrutura. Desta forma, há um grande interesse em métodos computacionais para prever e descrever as interações ligante-proteína (BURGER, 1998).

A conformação tridimensional do ligante (fármaco) é importante para a interação dele com o sítio de ligação da proteína. Portanto, a distribuição espacial da estrutura da molécula define como o sítio de ligação será preenchido para ter o potencial de fazer as interações intermoleculares com os aminoácidos do sítio de ligação. Desta forma, podemos concluir que é necessário uma determinada configuração espacial do ligante no receptor pois, do contrário, mesmo que ligante-proteína apresentem interações eletrônicas, as interações intermoleculares poderão não ser formadas (WILSON; GISVOLD, 2011).

Tabela 1 – Tipos de interações moleculares e força de interação.

Tipo de ligação	Força de ligação (kcal mol⁻¹)
Covalente	40 – 140
Iônica (Eletrostática)	5 – 10
Ligação de hidrogênio	1 – 14
Dipolo-dipolo e íon-dipolo	1
Van der Waals	0.5 – 1
Hidrofóbica	1

Fonte: Adaptado de Patrick (2017) (PATRICK, 2017; WILSON; GISVOLD, 2011; BURGER, 1998).

As interações de um fármaco (micro) com seu receptor biológico (biomacromolécula) são determinadas pela forças intermoleculares e ocorrem durante a fase farmacodinâmica (PATRICK, 2017). Essa interação envolve um processo denominado ligação e a área específica onde a ligação ocorre é chamada de sítio de ligação. Alguns fármacos podem se ligar covalentemente ao sítio de ligação. Entretanto, os fármacos disponíveis no mercado, na sua maioria, interagem com o receptor através de ligações não covalentes denominadas interações intermoleculares como, que incluem, ligações iônicas ou eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van

der Waals (vdW), interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas (PATRICK, 2017; BURGER, 1998). Estes exemplos estão reunidos na Tab. 1. Quando essas interações correm entre átomos que fazem parte da mesma molécula são chamadas de interações intramoleculares. A maioria das interações ligante-receptor é resultante das forças intermoleculares atrativas e repulsivas entre eles, ou seja, uma combinação dos tipos listados na Tab. 1 (BURGER, 1998).

Para que seja produzida uma resposta biológica podemos ter uma interação entre um ligante (fármaco, por exemplo) com uma macromolécula (proteína, por exemplo). A seguir faço uma breve descrição das possíveis interações que podem ocorrer entre ligante e receptor, a qual espera-se que ocorra através das mesmas forças de interação que estão envolvidas quando moléculas simples interagem.

1.2.1 Ligações iônicas ou eletrostáticas

As ligações iônicas ou eletrostáticas são estabelecidas entre íons de cargas opostas com força de interação inversamente proporcional à distância entre os dois átomos carregados e à constante dielétrica do solvente – mais forte (fraca) em meio hidrofóbico (polar), que geralmente está presente no sítio de ligação – é diretamente proporcional à carga de cada íon (PATRICK, 2017). A ligação de hidrogênio apresenta força de interação cerca de 10 vezes menor que a ligação covalente, variando de 1 a 14 kcal mol⁻¹ (BURGER, 1998).

1.2.2 Ligações de hidrogênio

A ligação de hidrogênio é o tipo de interação intermolecular e intramolecular que acontece devido a interação eletrostática entre elétrons não ligados de um heteroátomo eletronegativo (N, O, S, F) e átomos de hidrogênio deficientes de elétrons de grupos –OH, SH ou NH. Uma ligação de hidrogênio tem cerca de 1.5 a 2.2 Å para 1.0 a 1.5 Å de uma ligação covalente (PATRICK, 2017). A regra dos cinco de Lipinski (Ro5)¹ sugere a maior probabilidade de uma má absorção ou permeação quando a molécula apresentar mais de 5 doadores e mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio (LIPINSKI *et al.*, 2001), ou seja, as ligações de hidrogênio é importante na interação fármaco-receptor.

¹ A regra foi formulada em 1977 por Christopher A. Lipinski, é uma regra prática que enumera um conjunto de características para selecionar candidatos a fármaco com boa disponibilidade oral. Assim, uma molécula, para ser um bom fármaco, deve apresentar pelo menos 4 parâmetros múltiplos de 5.

1.2.3 Interações de van der Waals (vdW)

A interação de van der Waals (vdW) é um fenômeno de correlação não local, de origem puramente quântica, são forças atrativas criadas pela polarizabilidade das moléculas (WILSON; GISVOLD, 2011) e são da ordem de 0.5 a 1 kcal mol⁻¹, logo, são interações muito fracas, quando comparadas com a energia cinética média de uma molécula que é de aproximadamente 6 kcal mol⁻¹ (PATRICK, 2017). Apesar disso, quando as interações de van der Waals (vdW) são combinadas, elas podem atingir valores de cerca de 10 kcal mol⁻¹, assim, a contribuição geral das interações de vdW pode ser cruciais para a interação entre fármaco-receptor. Ela é inversamente proporcional à distância, diminuindo na proporção da sexta potência ($\frac{1}{r^6}$), onde r é a distância entre as duas moléculas, e ocorrem com a interação entre regiões hidrofóbicas de moléculas diferentes, quando átomos estão próximos o suficiente para que suas nuvens de elétrons induzam flutuações de carga que resultem em uma atração não específica e não direcional (PATRICK, 2017; BURGER, 1998).

1.2.4 Dipolo-dipolo e íon-dipolo

Como no sítio de ligação há a presença de diversos grupos funcionais, temos um momento de dipolo permanente que é resultante da eletronegativa dos átomos e grupos funcionais ali presentes (BURGER, 1998). As forças de interação dipolo-dipolo são inversamente proporcionais à distância e, assim, reduzem com o cubo da distância entre os dois dipolos. As interações dipolo-dipolo são uma forma de interação eletrostática que caem mais rapidamente com a distância do que as interações eletrostáticas, mas menos rapidamente do que as interações de van der Waals (vdW) (PATRICK, 2017).

1.2.5 Interações hidrofóbicas

As interações hidrofóbicas são explicadas como interações atrativas entre regiões apolares da micromolécula (ligante) e da macromolécula (receptor) (WILSON; GISVOLD, 2011).

1.3 Constante dielétrica, interações eletrostáticas em proteínas

A constante dielétrica (ou permissividade relativa), normalmente denotada por $\epsilon_r(\omega)$, é a razão entre a permissividade de uma substância e a permissividade no espaço livre. Consiste na capacidade do material de armazenar cargas elétricas e, assim, traduz de forma macroscópica, os efeitos que ocorrem no interior de átomos e moléculas (MCKEEN, 2012). Desta forma, é definida como

$$\epsilon_r(\omega) = \frac{\epsilon(\omega)}{\epsilon_0} \quad (1.1)$$

onde $\epsilon(\omega)$ é a permissividade dependente da frequência do material e ϵ_0 é a permissividade no vácuo. Apesar de ser chamada de "constante" ela depende da frequência e intensidade do campo elétrico aplicado (se tornando uma grandeza complexa), da temperatura, da pressão e de outras variáveis (MCKEEN, 2012).

No estudo de bioquímica quântica de proteínas é importante avaliar as interações eletrostáticas pois desempenham um importante papel na determinação da estrutura, estabilidade, afinidade de ligação, propriedades químicas e reatividade biológica de proteínas (PERUTZ, 1978; WARSHEL, 1981; SHARP; HONIG, 1990; SIMONSON, 2003; WARSHEL *et al.*, 2006). Apesar do notável avanço neste campo nas últimas décadas, quantificar as energias eletrostáticas em sistemas compostos por proteínas e seus ligantes ainda não é uma tarefa simples. Proteínas são estruturas complexas, e a dificuldade em modelar os efeitos eletrostáticos aumenta com o tamanho e a configuração da estrutura da proteína (WARSHEL *et al.*, 1984; CHEN; ZHANG, 2006; KUKIĆ; NIELSEN, 2010; GORDON *et al.*, 2012; ZHOU; PANG, 2013; LI *et al.*, 2013).

Como proteínas não são sistemas homogêneos, são formadas por aminoácidos com diferentes características, é importante utilizar uma abordagem eletrostática apropriada que leve em consideração que suas propriedades eletrostáticas são fortemente dependentes da sua composição (cofatores, aminoácidos, ligantes, etc.), conformação espacial e, também, do meio em que a proteína está inserida. Para o cálculo de energias eletrostáticas envolvendo proteínas é importante considerar alguns aspectos como, por exemplo, as diferenças entre as propriedades dielétricas dos resíduos de aminoácidos que compõem a proteína, as cavidades e a configuração da interface proteína-solvente (WARSHEL; PAPAZYAN, 1998; SCHUTZ; WARSHEL, 2001).

No estudo da modelagem dos efeitos eletrostáticos em proteínas realizado por Warshel *et al.* (2006) (WARSHEL *et al.*, 2006), concluíram que não existe constante dielétrica universal para proteínas, mas sim que ela é dependente da propriedade de interesse e do modelo

utilizado para descrição. Desta forma, diversos estudos indicam o uso de diversos valores para a constante dielétrica de proteínas. Por exemplo, em trabalhos voltados à estabilidade de proteínas, os valores das constantes dielétricas utilizadas variam de valores baixos como $\epsilon = 1$ ou 2 (GENHEDEN; RYDE, 2012) até valores altos como $\epsilon = 40$ (VICATOS *et al.*, 2009). Em trabalhos dedicados a calcular interações proteína-proteína e proteína-ligante, foram relatados muitos valores diferentes de constantes dielétricas (TALLEY *et al.*, 2008). Da mesma forma, modelos dedicados ao estudo de reações de proteínas consideram alto ou baixo valor de constante dielétrica dependendo se as reações induzem ou não grandes mudanças conformacionais (SCHUTZ; WARSHEL, 2001; WARSHEL *et al.*, 2006).

Usando o método semi-empírico para cálculo da polarizabilidade molecular e da relação de Clausius-Mossoti, os pesquisadores Muhamed Amin e Jochen Küpper (2020) (AMIN; KÜPPER, 2020) obtiveram a constante dielétrica de estruturas de proteínas obtidas do Banco de Dados de Proteínas (PDB, Protein Data Bank) (BERMAN, 2000) através de um método empírico. Assim, obtiveram para as mais de 150000 proteínas estudadas o valor de $\epsilon = 3.23$ mostrando uma forte correlação entre a polarizabilidade molecular e o volume das proteínas e, além disso, mostraram que a mudança de pH não tem efeito significativo na constante dielétrica das proteínas. O valor da constante dielétrica mais comumente utilizado na literatura é $\epsilon = 4$ (LI *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2020).

Métodos para modelar a constante dielétrica de proteínas devem levar em consideração além da dependência da constante dielétrica com a propriedade da proteína e da abordagem eletrostática considerada, que as diferentes regiões do sistema proteico possuem diferentes respostas dielétricas. Em problemas considerando a proteína em meio aquoso, há um consenso de que a maior parte da água deve ser modelada com alta constante dielétrica, geralmente $\epsilon = 80$ (LI *et al.*, 2013), enquanto as moléculas de água localizadas na interface proteína-água devem ser modeladas com uma constante dielétrica muito menor para levar em conta o número significativo de moléculas dessa camada de água interagindo diretamente com os átomos de proteína (CORZANA *et al.*, 2007; PAL *et al.*, 2004; STERPONE *et al.*, 2012). Além disso, as regiões hidrofóbicas e as cavidades pequenas têm constantes dielétricas baixas (MEYER *et al.*, 2011; SIMONSON *et al.*, 1996), enquanto as regiões hidrofílicas e cavidades grandes têm constantes dielétricas altas (VAITHEESWARAN *et al.*, 2004).

Do ponto de vista da bioquímica quântica, é importante explicar os detalhes de uma determinada interação que estão relacionados à ligação da micromolécula (fármaco) a

macromolécula (proteína) (VELLA, 1994; MA *et al.*, 2003). São as forças intermoleculares que determinam as interações do ligante com o receptor biológico, assim, uma melhor compreensão das forças que impulsionam as interações ligante-receptor irá elucidar como os processos de reconhecimento molecular governam os sistemas biológicos (LENSINK; MENDEZ, 2008). Nesta tese, estamos tratando com fármacos estruturalmente específicos, ou seja, o fármaco tem seu mecanismo de ação através da interação seletiva com uma biomacromolécula (alvo) que, geralmente, são proteínas (BURGER, 1998).

Esta introdução serve como base para a compreensão dos demais tópicos desta tese. Na presente tese foi realizado estudo *in silico* de dois importantes sistemas: o primeiro, ligante-sACE, estuda a interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) com a sACE através de bioquímica quântica; o segundo, minoTC-PLA2, está relacionada a cacata inflamatória, o foi estudado como a constante dielétrica pode influenciar nas energias de interação ligante-proteína e, para tal, foi modelada uma constante dielétrica não-homogênea para o sistema em estudo.

1.4 Escopo da tese

Esta TESE está organizada em quatro unidades, sendo a segunda e terceira parte cada uma composta por quatro capítulos. A primeira parte, compreendendo este capítulo, apresenta uma breve introdução do tema simulações computacionais de sistemas biológicos e é importante para compreensão das demais unidades.

Na segunda unidade, foi realizado estudo *in silico* da interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) na enzima sACE. Assim, o capítulo 2 traz uma introdução sobre hipertensão, a farmacoterapia e os alvos moleculares para o tratamento da hipertensão.

No capítulo 3 são apresentadas as estratégias metodológicas utilizadas, bem como os dados estruturais, para a descrição do sítio de ligação dos anti-hipertensivos (LPR e LST) na sACE.

No capítulo 4 são discutidos os resultados obtidos do estudo da interação dos anti-hipertensivos (LSP e LST) na sACE através de docking molecular e estratégia MFCC, utilizando o método DFT para obtenção das energias de interação.

Na parte III foi estudado como os efeitos da constante dielétrica influenciam no valor da energia de interação e, além disso, modelar uma constante dielétrica não-homogênea para a PLA2 a partir dos dados estruturais da enzima.

No capítulo 6 estão apresentados sobre a inflamação, a farmacoterapia e o papel da constante dielétrica na modelagem de biomacromoléculas.

No capítulo 7 são apresentadas as metodologias utilizadas na obtenção da função dielétrica, constante dielétrica não homogênea da PLA2, bem como a utilização da estratégia MFCC para estudo da energia de interação minoTc-PLA2 através da DFT com o uso de modelo contínuo de solvatação para constante dielétrica homogênea e não-homogênea.

No capítulo 8 são discutidos os resultados obtidos para a energia de interação com a utilização da constante dielétrica homogênea e não-homogênea.

Nos capítulos 5 e 9 são apresentadas as conclusões e perspectivas para as parte II e III, respectivamente. Na unidade quatro, capítulo 10 é apresentado uma conclusão geral da tese.

No Apêndice A, foram adicionados os resultados as energias de interação e outras informações, e o Apêndice B contém os artigos publicados/submetidos pela autora até o presente momento relacionados ou não com o tema desta tese.

2 HIPERTENSÃO

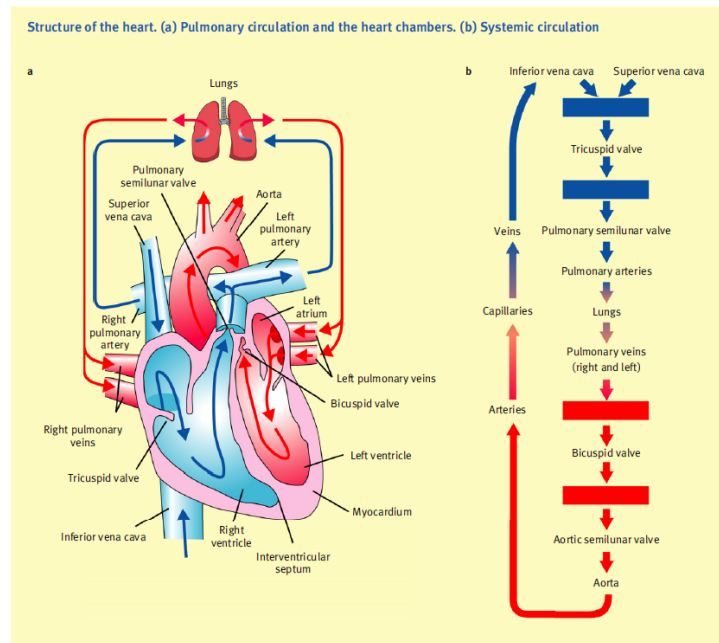
A hipertensão arterial é uma doença multifatorial sendo reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como um importante problema de saúde pública devido, principalmente, à sua morbidade, mortalidade precoce e aos impactos econômicos causados na sociedade de uma forma geral. É uma das causas mais importantes de morte prematura em todo o mundo e o problema está crescendo; em 2025, estima-se que 1,56 bilhão de indivíduos adultos viverão com hipertensão (WHO, 2021). A hipertensão grave ou prolongada pode prejudicar o sistema cardiovascular, encefálico e renal, assim, se torna um fator de risco de grande importância para complicações cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) apresenta alta prevalência acometendo cerca de 35% da população adulta sendo caracterizado como um grave problema de saúde pública (MOREIRA *et al.*,). Este capítulo apresenta uma breve descrição sobre a hipertensão, o seu diagnóstico e os fármacos usados no tratamento. Adicionalmente, são apresentados os possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas anti-hipertensivas.

2.1 O que é hipertensão?

A pressão arterial (PA) é definida como a força exercida pelo sangue circulante sobre as paredes das artérias (principais vasos sanguíneos do corpo) e está relacionada com o ciclo cardíaco que se refere aos eventos relativos ao fluxo e à pressão arterial que ocorrem desde o início de um batimento cardíaco até o próximo (BARROS, 2019). Na Figura 3 é apresentada uma representação do coração com a descrição da circulação pulmonar e sistêmica para melhor compreensão do ciclo cardíaco. Para simplificar, vamos aqui dividir o ciclo cardíaco em dois períodos: sendo o primeiro (i) onde ocorre a diástole que é o relaxamento das câmaras cardíacas do coração, quando o coração recebe o sangue e se distende; em seguida, (ii) ocorre a sístole com a contração das câmaras cardíacas do coração e, assim, causando a ejeção do sangue para os vasos. A hipertensão pode ser sistólica (pressão contra a parede arterial durante a contração cardíaca) ou diastólica (pressão contra a parede arterial em repouso), conforme definido pelo registro da pressão arterial (sistólica/diastólica) (CHAN-DEWAR, 2012).

A pressão arterial (PA) é considerada elevada quando as leituras da pressão arterial sistólica e/ou da pressão arterial diastólica estão ≥ 140 mmHg e ≥ 90 mmHg, respectivamente, chamada hipertensão. Além disso, também pode ocorrer a hipotensão, quando as leituras da

Figura 3 – Estrutura do coração. (a) Circulação pulmonar e câmaras do coração. (b) circulação sistêmica.



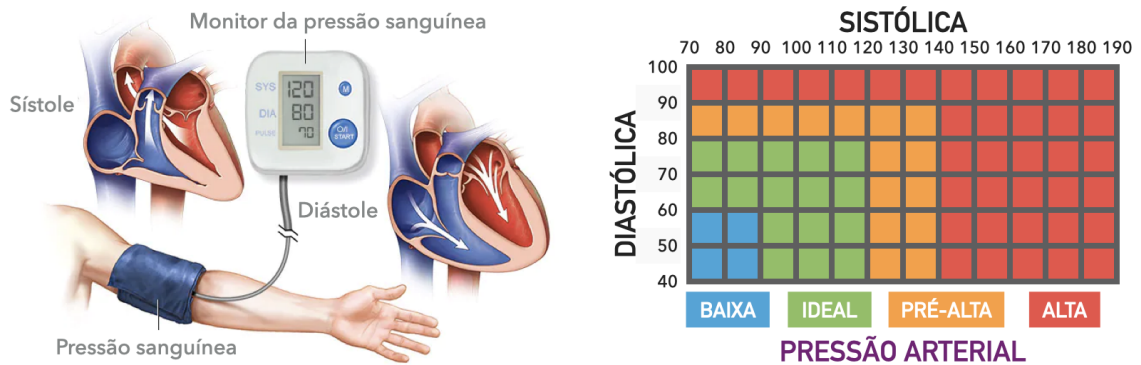
Fonte: Adaptado de (CHAN-DEWAR, 2012).

pressão sistólica e diastólica estão ≤ 90 mmHg e ≤ 60 mmHg, respectivamente, sendo também um estado de saúde que merece cuidados. Os valores de referência para os valores da pressão sistólica e pressão diastólica estão apresentados na Fig. 4, bem como a representação esquemática da sístole e diástole para o monitoramento da pressão arterial. A PA elevada tem sido considerada como o fator de risco mais importante para as doenças cardiovasculares (DCV). Se a PA for elevada por períodos prolongados de tempo, leva a danos na parede arterial, que por sua vez predispõe à aterosclerose com espessamento da parede arterial e estreitamento do diâmetro arterial.

2.2 Farmacoterapia da hipertensão

A hipertensão é uma doença crônica, mas que tem tratamento, podendo fazer uso de vários agentes, incluindo betabloqueadores, diuréticos e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE, angiotensin-converting enzyme), além de mudanças no estilo de vida que incluem intervenções dietéticas (redução de sal, aumento de potássio, evitar álcool e controle multifatorial da dieta, redução de peso, cessação do tabagismo, exercícios físicos e controle do estresse podem auxiliar no tratamento (NOGRADY; WEAVER, 2005; RAJEEV; SONEIL, 2010).

Figura 4 – Valores de referência da pressão arterial sistólica (eixo x, horizontal) e diastólica (eixo y, vertical).

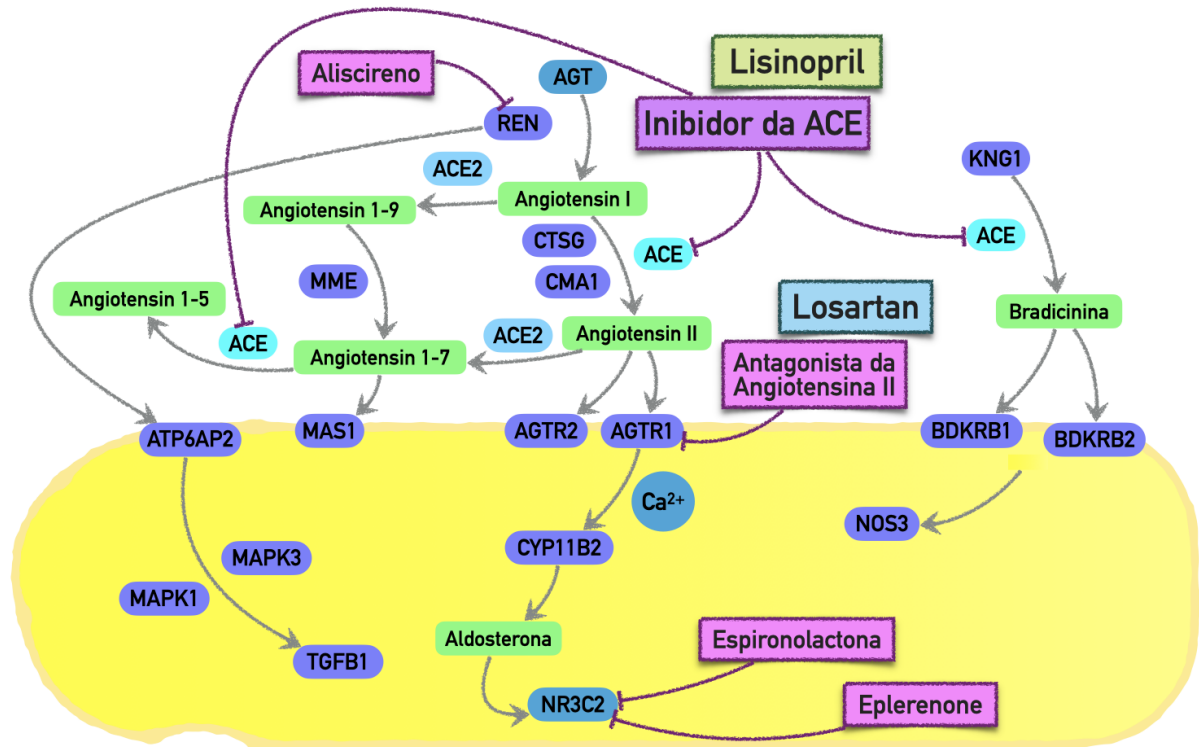


O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system), via representada esquematicamente na Fig. 5, tem papel central no controle da pressão arterial e homeostase do volume de fluido e, por esse motivo, é um importante alvo para muitas classes de fármacos anti-hipertensivos (CULLEN; LOCKYER, 2002).

Nesse sistema, a renina quebra o peptídeo angiotensinogênio, produzindo angiotensina, que circula no organismo. Nos vasos pulmonares, a angiotensina I interage com a enzima conversora de angiotensina (ACE), que produz o hormônio octapeptídeo angiotensina II (Ang II) (WEI *et al.*, 1991). A angiotensina II, por sua vez, pode interagir com o receptor AT1 (receptor da angiotensina II tipo 1) desencadeando vasoconstrição ou AT2 (receptor da angiotensina II tipo 2), levando à vasodilatação. Quando a Ang II se liga ao receptor AT1, ela ativa a fosfolipase C (PLC), que gera diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3) (CULLEN; LOCKYER, 2002). Essas moléculas promovem a ativação das proteínas quinase C e liberação de Ca^{2+} nos depósitos intracelulares (CULLEN; LOCKYER, 2002). A sinalização do cálcio ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) e promove a contração do músculo liso dos vasos sanguíneos e a elevação da pressão arterial.

Os inibidores da ECA bloqueiam a formação de Ang II e inibem a liberação de aldosterona, o que promove vasodilatação. Como exemplo de inibidor da ECA, o lisinopril (LPR) bloqueia a formação de Ang II, resultando na redução de Ang II com diminuição da secreção de aldosterona e, assim, reduzindo a pressão arterial. O losartan, um bloqueador dos receptores de angiotensina (ARB) tem como alvo o AGTR1, bloqueando sua ativação, logo, é um antagonista do receptor da angiotensina II do tipo 1 (AT1) que causa os mesmos efeitos anti-hipertensivos dos inibidores da ECA, resultando também em níveis mais baixos de

Figura 5 – Via farmacodinâmica dos fármacos que agem no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Os principais envolvidos nesta via são: AGT, angiotensinogênio; REN, renina; ACE, enzima conversora de angiotensina; AGTR1, receptor de angiotensina II tipo 1.



Fonte: Adaptado de Michelle Whirl-Carrillo et al. (2021) (WHIRL-CARRILLO *et al.*, 2021), <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165110622>.

aldosterona e diminuição da pressão arterial, mas com a vantagem de não gerar acúmulo de bradicinina (BK), que é a causa de tosse quando ela se acumula nos pulmões (TAKEZAKO *et al.*, 2015). A diminuição da aldosterona causa a diminuição também dos níveis de sódio e água e, em seguida, a redução da excreção de potássio que leva a redução da pressão arterial. Vamos falar mais dos anti-hipertensivos lisinopril e losartan nas próximas seções. O aliscireno ($C_{30}H_{53}N_3O_6$, DrugBank DB09026), um inibidor da renina (REN), bloqueia o sítio catalítico da enzima renina, assim, impedindo a clivagem do angiotensinogênio (que é o único substrato da enzima REN) e, conseqüentemente, impede a produção de angiotensina I. Espironolactona ($C_{24}H_{32}O_4S$, DrugBank DB00421) e eplerenone ($C_{24}H_{30}O_6$, DrugBank DB00700) são antagonistas do receptor de aldosterona, tendo como alvo o receptor mineralocorticoide NR3C2, ao qual a aldosterona se liga (MARON; LEOPOLD, 2008; BASSETT *et al.*, 2004). Na Fig. 5 é apresentado esquematicamente a via farmacodinâmica dos fármacos que atuam no RAAS. O papel do RAAS na fisiopatologia da hipertensão tem sido amplamente explorado para terapia

(ESMAIL; LOEWEN, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2002).

Os anti-hipertensivos podem ser divididos em cinco classes principais que podem ser utilizados sozinhos ou em associação com outros fármacos: (i) diuréticos, como hidroclorotiazida e furosemida, são os mais utilizados no tratamento da hipertensão, divididos em diuréticos tiazídicos e diuréticos de alça, são responsáveis por aumentar o volume urinário; (ii) antagonistas adrenérgicos como, por exemplo, metildopa (agonista α -2 central) e propranolol (β -bloqueador) antagonizam os receptores da noradrenalina, com efeitos múltiplos; (iii) bloqueadores do canal de cálcio, agem reduzindo a excitabilidade e a frequência cardíaca, reduzindo a entrada de cálcio nas células com dilatação das artérias e arteríolas; (iv) vasodilatadores, promovem o relaxamento da musculatura da parede vascular; e (v) inibidores da enzima conversora de angiotensina (iACEs) que inibem a conversão de angiotensina I em angiotensina II, atualmente são considerados a melhor alternativa de medicação para o tratamento da hipertensão, são exemplos, captopril, enalapril e lisinopril.

Bloqueadores da renina (ARBs), têm mecanismo de ação através do bloqueio do sítio enzimático ativo da renina, o que leva a limitação da produção de angiotensina I a partir de angiotensinogênio.

2.3 Alvos para o tratamento da hipertensão

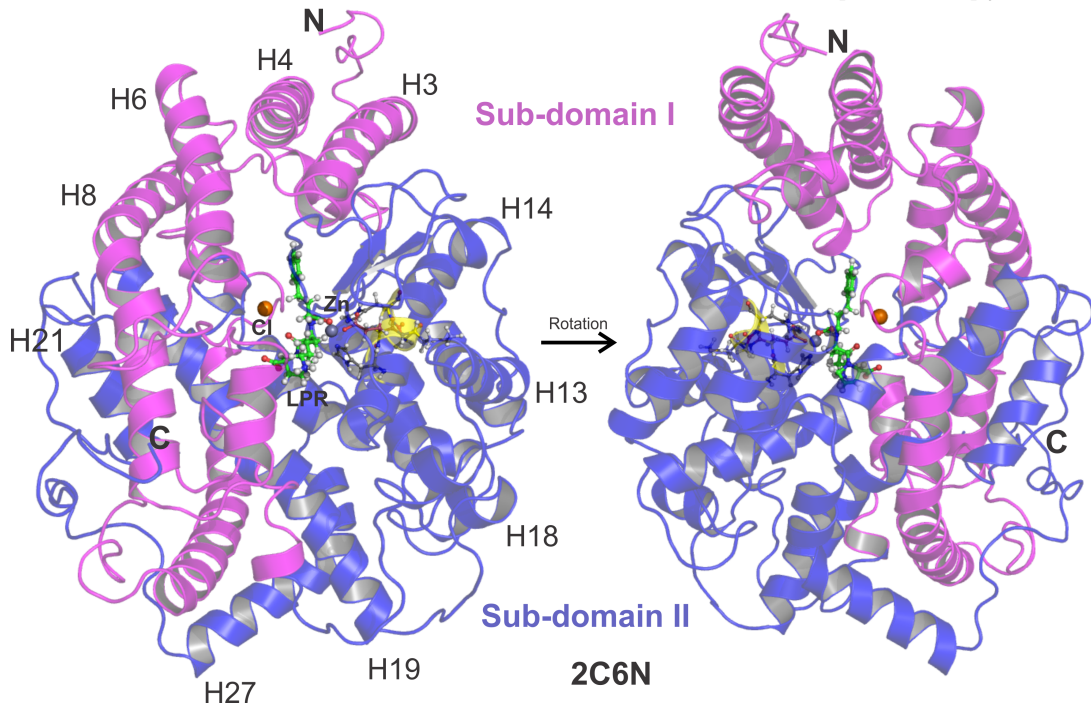
Vamos nos concentrar agora na enzima conversora de angiotensina (ACE) a qual é conhecido na literatura como o alvo molecular do anti-hipertensivo lisinopril. Entretanto, temos outros importantes alvos no controle da pressão arterial que são: o receptor de angiotensina II do tipo 1 (AGTR1), onde o losartan atua, o receptor mineralocorticoide NR3C2 e a renina (REN), mas que não são o foco desse trabalho e, portanto, não serão descritos aqui com mais detalhes.

2.3.1 Enzima Conversora de Angiotensina (ACE)

A enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1 <https://enzyme.expasy.org/EC/3.4.15.1>) ou simplesmente denominada ACE (angiotensin-converting enzyme), é uma glicoproteína pertencente à família das peptidases M2, uma zinco metaloproteinase, que geralmente está ligada à membrana e se torna ativa em pH neutro. A ACE apresenta papel central no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) sendo importante para a regulação da pressão arterial e o volume de fluidos no corpo. Na Fig. 6 temos apresentado o domínio N da sACE com

o subdomínio I, subdomínio II e domínio catalítico (que contém o sítio de ligação do zinco HEMGH) mostrados em rosa, azul e amarelo, respectivamente, obtido a partir do PDB 2C6N (CORRADI *et al.*, 2006).

Figura 6 – O domínio N da sACE dividido em duas metades, ou seja, os subdomínios I e II, mostrados em rosa e azul, respectivamente. O domínio catalítico da sACE (mostrado em amarelo) contém o sítio de ligação do zinco HEMGH. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).

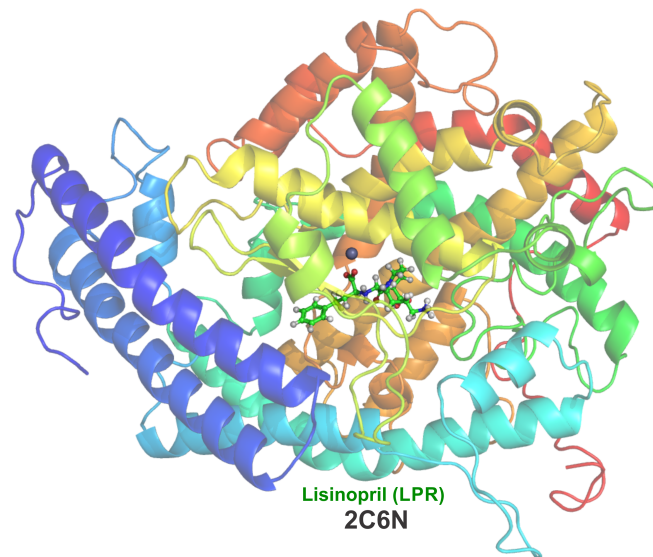


Lisinopril tem seus efeitos farmacológicos similares aos do captopril e enalapril. Como todos os inibidores da ACE, sua ligação ocorre no sítio ativo da enzima. Estudos de modelagem molecular revelaram que o ácido imidazol-5-acético poderia ser explorado para imitar mais de perto o inibidor da angiotensina II. Assim, losartan foi o primeiro fármaco bem sucedido a ser desenvolvido através desse método (WILSON; GISVOLD, 2011). No próximo capítulo vamos utilizar da bioquímica quântica para descrever a ligação dos anti-hipertensivos LSP e LST na sACE.

3 FARMACOLOGIA MOLECULAR QUÂNTICA: LPR-SACE E LST-SACE

O conhecimento da estrutura tridimensional do complexo fármaco-bioreceptor pode permitir a previsão de interações intermoleculares e, então, fornecer subsídios para o planejamento racional de novos inibidores, por exemplo. Na presente tese, foi estudada a interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) com a enzima conversora de angiotensina somática (sACE) humana. Primeiramente, foi feito *docking* molecular do anti-hipertensivo losartan e *redocking* do lisinopril na sACE; (ii) a melhor pose de *docking* foi otimizada dentro do sítio de ligação, mantendo-se apenas os átomos não-hidrogênicos fixos; (iii) a estrutura otimizada do losartan e a estrutura co-cristalizada do lisinopril na sACE (PDB 2C6N) (CORRADI *et al.*, 2006) foi usada como entrada para a obtenção das energias de interação de cada aminoácido da enzima com os anti-hipertensivos em estudo através de uma adaptação do método MFCC. Assim, foi possível obter o perfil de energia de interação do LPR- e do LST-sACE.

Figura 7 – Visão geral do monômero da sACE co-cristalizada com o inibidor lisinopril (LPR), LPR-sACE, obtido por difração de raios-X, PDB 2C6N (CORRADI *et al.*, 2006). Os íons zinco mostrados em cinza, cloreto em laranja e o lisinopril (carbono verde), ilustrando os elementos da estrutura secundária da proteína. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



Estudos recentes demonstraram relação entre as vias bioquímicas no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Guimarães *et al.* (2011) (GUIMARÃES *et al.*, 2011) realizaram estudo através de modelos celulares com células de ovário de hamster chinês (CHO-ACE) e células de melanoma (Tm5) para expressar a enzima ACE e, desta

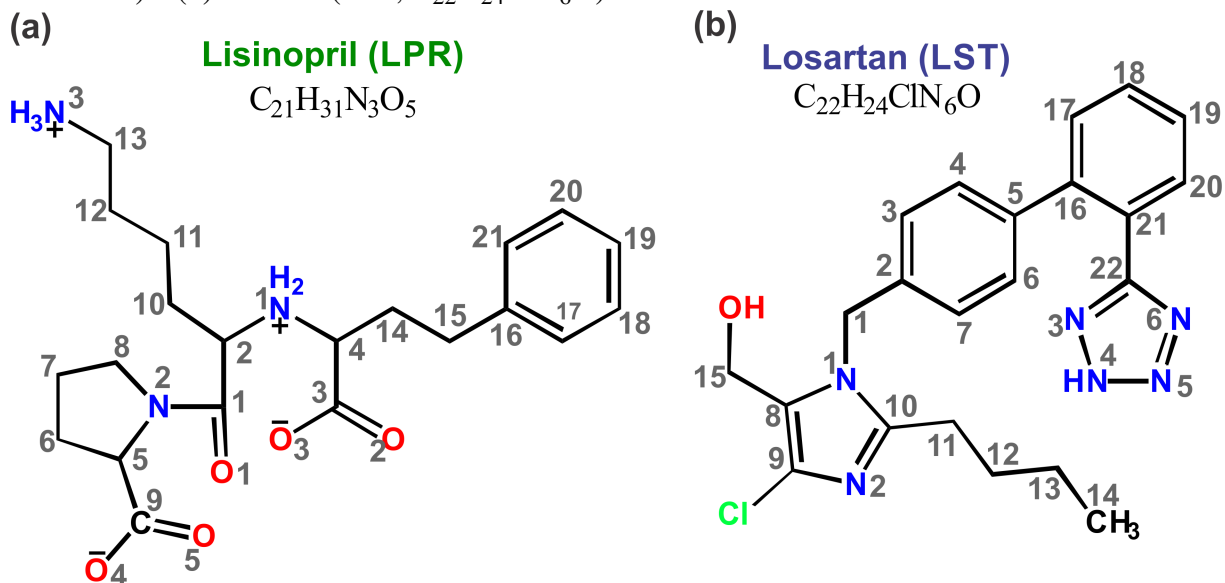
forma, constataram que a Ang II pode se ligar à ACE com alta afinidade. Além disso, também foi demonstrado que a Ang II é capaz de se ligar e ativar a ACE, um importante receptor em células de melanoma, promovendo efeitos de proliferação e migração celular (ALVARENGA *et al.*, 2016). Nesse contexto, o entendimento da interação do losartan (LST) e da ACE (EC 3.4.15.1) é particularmente importante para auxiliar o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes para o tratamento da hipertensão. Para esse fim, aproveitamos ao máximo os dados cristalográficos publicados do domínio N da enzima conversora de angiotensina I somática (sACE) humana complexada com o inibidor lisinopril (PDB ID 2C6N, ver Fig. 7) (CORRADI *et al.*, 2006), para realizar simulações computacionais em abordagens de *docking* e mecânica quântica *ab initio*. Este último é baseado no formalismo da teoria do funcional da densidade (DFT), no âmbito da estratégia de fragmentação molecular com *caps* conjugados (MFCC) (ZHANG *et al.*, 2003), para investigar os detalhes da energia de interação de ligação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) com a sACE. As técnicas de Bioquímica Quântica e o método MFCC têm sido amplamente aplicados para calcular a energia de interação entre proteínas e ligantes e estão contribuindo para explicar e/ou desvendar novos mecanismos de ação de diversos fármacos que já são amplamente utilizados na medicina atualmente (COSTA *et al.*, 2012; BARROSO-NETO *et al.*, 2012; Lima Neto *et al.*, 2015; DANTAS *et al.*, 2015; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; MORAIS *et al.*, 2020). Albuquerque *et al.* no livro intitulado "Quantum Chemistry Simulation of Biological Molecules" (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020) traz importantes contribuições no campo da Química Quântica.

3.1 Dados estruturais

Todas as simulações computacionais neste trabalho fizeram uso da estrutura cristalizada do domínio N da enzima conversora de angiotensina I somática (sACE) humana complexada com o inibidor lisinopril (LPR), determinado por difração de raios-X por Corradi *et al.* (CORRADI *et al.*, 2006) (ver Fig. 7). A estrutura 3D foi baixada do banco de dados PDB (<http://www.rcsb.org>), PDB ID 2C6N, em alta resolução de 3.0 Å e pH 7.4, mas a átomos de hidrogênio não foram resolvidos. Desta forma, os hidrogênios foram adicionados à estrutura e então submetidos à otimização da geometria clássica com o campo de força CVFF (do inglês, Consistent Valence Forcefield) (DAUBER-OSGUTHORPE *et al.*, 1988) com as posições atômicas dos átomos não hidrogênio mantidas fixas.

O estado de protonação dos receptores foi ajustado de acordo com os resultados

Figura 8 – Representação das estruturas do (a) lisinopril (LPR, $C_{21}H_{31}N_3O_5$, DrugBank DB00722) e (b) losartan (LST, $C_{22}H_{24}ClN_6O$) com rótulos de átomos.

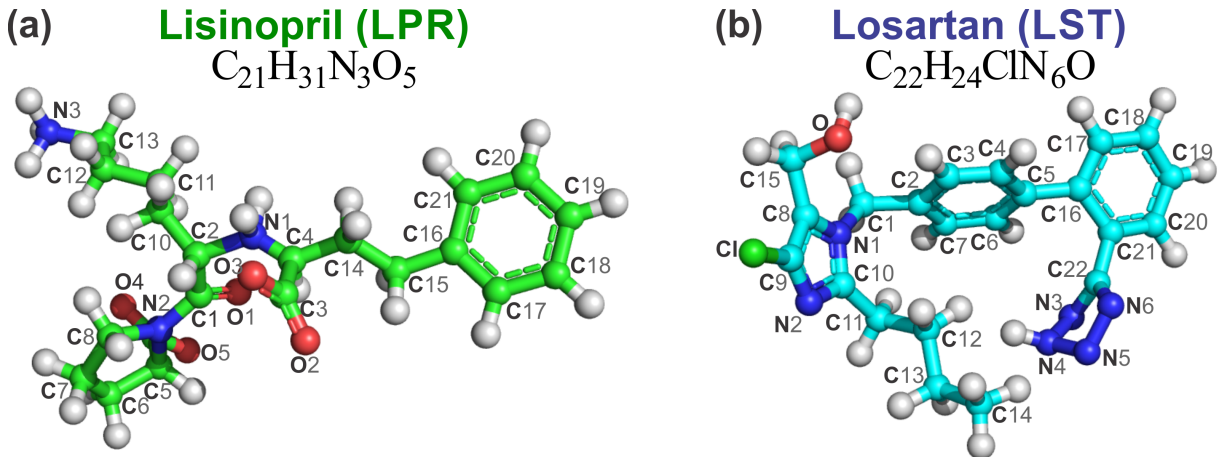


obtidos do código Marvin Sketch versão 5.3.2 (Marvin Beans Suite, ChemAxon) em pH fisiológico. As estruturas correspondentes são mostradas com representação de bola e bastão nas Figs. 8 e 9 para as moléculas do LPR ($C_{21}H_{31}N_3O_5$, DrugBank DB00722, 1-[N2-[S-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-lysyl]-L-proline dihydrate, e do LST ($C_{22}H_{24}ClN_6O$, Drugbank DB00678, (2-butyl-4-chloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-yl-phenyl)benzyl]imidazole-5-methanol). A metodologia aqui utilizada é semelhante ao apresentado em outros trabalhos (COSTA *et al.*, 2012; BARROSO-NETO *et al.*, 2012; Lima Neto *et al.*, 2015; DANTAS *et al.*, 2015).

3.2 Docking Molecular

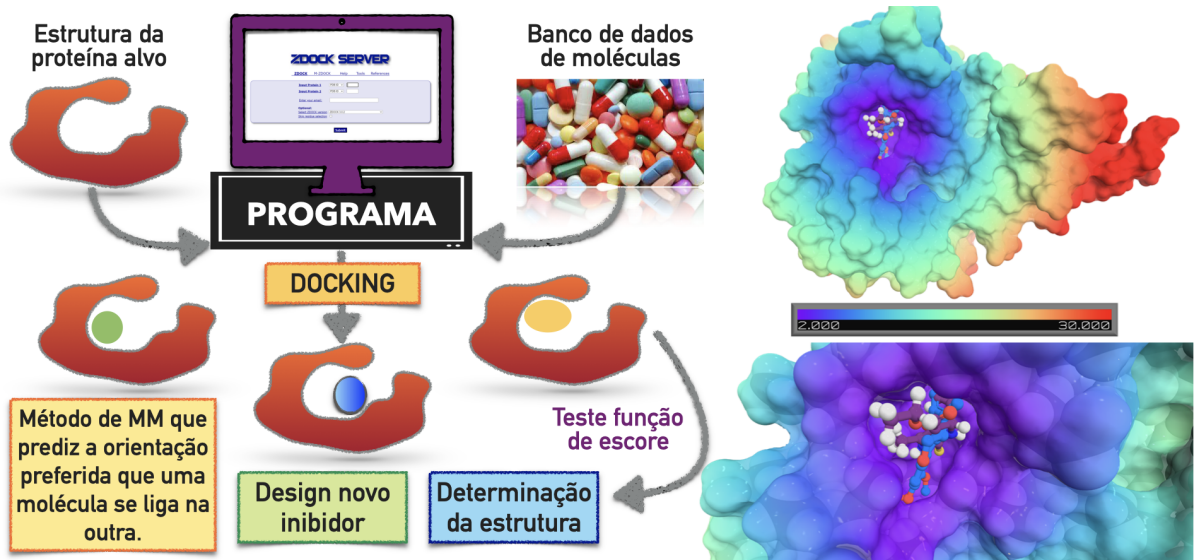
O *docking* molecular é uma estratégia utilizada para prever as características da interação entre moléculas com atividade biológica (ligante, micromoléculas) e seus alvos macromoleculares (receptores, em especial proteínas, biomacromoléculas) específicos de um organismo, quando a estrutura de ambos - receptor e ligante - já forem conhecidas experimentalmente. Um dos objetivos dos programas de *docking* molecular é pode realizar estudo através de uma banco de dados de moléculas com possibilidade de se ligar ao receptor em estudo. Assim, partindo da estrutura conhecida da proteína alvo podemos utilizar o programa de *docking* molecular (atualmente existem vários servidores online), com a possibilidade de testar moléculas de um banco de dados ou moléculas únicas e, desta forma, prever a melhor posição e orientação

Figura 9 – Representação de bola e bastão do (a) lisinopril (LPR, $C_{21}H_{31}N_3O_5$) e do (b) losartan (LST, $C_{22}H_{24}ClN_6O$) com rótulos dos átomos. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro), enquanto os átomos de não carbono são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloro em verde e íon zinco em cinza). A figura foi desenhada usando PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



de um ligante no sítio de ligação da proteína alvo conforme mostrado na Fig. 10.

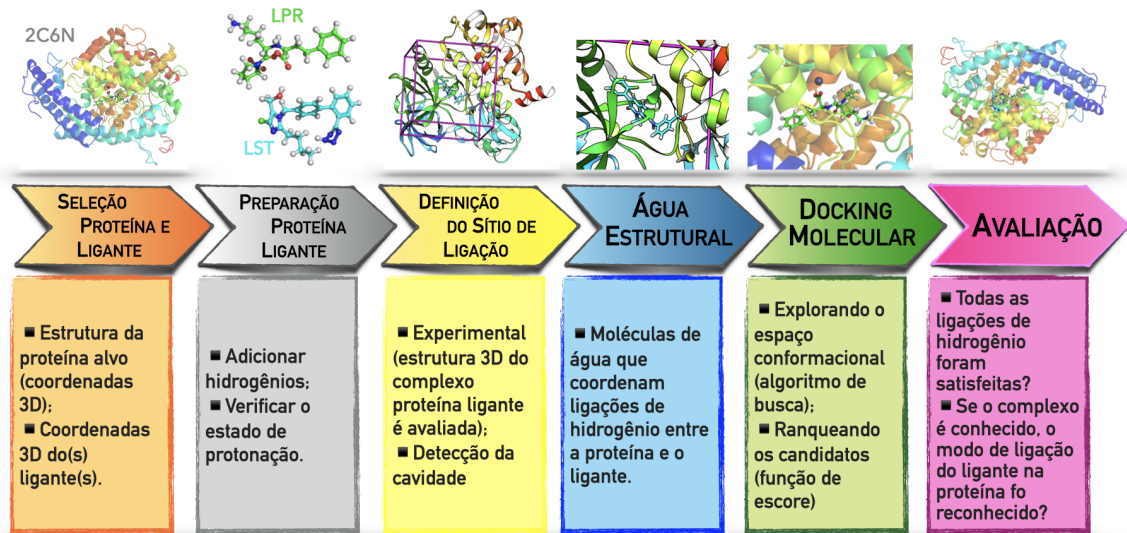
Figura 10 – Estratégia de *docking* molecular. Estrutura alvo conhecida, programa de *docking*, uso de banco de dados e *design* de um novo inibidor.



A geometria otimizada da molécula de losartan (LST) (Fig. 9b) isolada foi obtida através do pacote hamiltoniano semi-empírico PM7 (STEWART, 2013) no programa MO-PAC2012 (<http://openmopac.internet>). A estrutura cristalográfica do lisinopril (LPR, Fig.

9a) com a sACE (complexo LPR-sACE) foi obtida do RCSB Protein Data Bank (PDB ID 2C6N) (CORRADI *et al.*, 2006).

Figura 11 – Estratégia de *docking* molecular: LPR e LST na sACE.



Assim, os complexos formados pelo losartan (LST) e a sACE (PDB 2C6N) foram previamente modelados por *docking* molecular, para identificar os sítios de ligação, utilizando o programa AutoDock Vina (Molecular Graphics Lab) (TROTT; OLSON, 2009), assim como a ferramenta auxiliar AutoDockTools, v.1.5.4 (SANNER, 1999; MORRIS *et al.*, 2009) ambos bastante utilizados no meio científico e com licença para fins acadêmicos. A metodologia aqui utilizada é apresentada de forma esquemática na Fig. 11. O programa AutoDock Vina é capaz de operar pelo pareamento de uma função de *score* ponderada empiricamente aproximando os termos para valores como a ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica (van der Waals), penalizando os vínculos rotativos, e um sofisticado gradiente de busca local como um algoritmo de otimização global. As coordenadas tridimensionais da sACE (PDB 2C6N) foram previamente preparadas usando o programa AutoDock Tools 4.2, pela adição dos hidrogênios polares e cargas de Gasteiger. O ligante utilizado foi o LST otimizado, e o alvo foi a sACE após a remoção do LPR no complexo LPR-sACE. A melhor pose do LST foi selecionada com base na conformação melhor classificada do ligante na sACE e usada para a configuração do complexo LST-sACE. As figuras foram obtidas usando o pacote UCSF Chimera 1.8 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco) (PETTERSEN *et al.*, 2004). Para o procedimento de *docking*, todas as ligações rotacionais dentro do ligante

foram permitidas se movimentar, no entanto, a macromolécula foi mantida rígida. O tamanho do *grid* foi corrigido para incluir toda a enzima (sACE). Todos os outros parâmetros do *docking* forma utilizados como padrões. A melhor solução (pose) dos complexos obtidos por *docking*, ou seja, a conformação gerada com a menor energia livre de ligação foi aceita como o modelo mais provável de interação para o complexo com LST.

Além disso, com a finalidade de validar o protocolo de *docking* foi feito o *redocking* usando o ligante cristalográfico lisinopril (LPR) na sACE, nas mesmas condições de *docking* anteriormente adotadas. O desvio da raiz média quadrada (RMSD) da melhor pose do LPR na sACE proposto pelo programa AutoDock Vina e a conformação real do LPR no cristal foi de 0.55 Å, sugerindo que o programa AutoDock Vina pode propôr um modelo confiável de interação (RMSD < 2.0 Å).

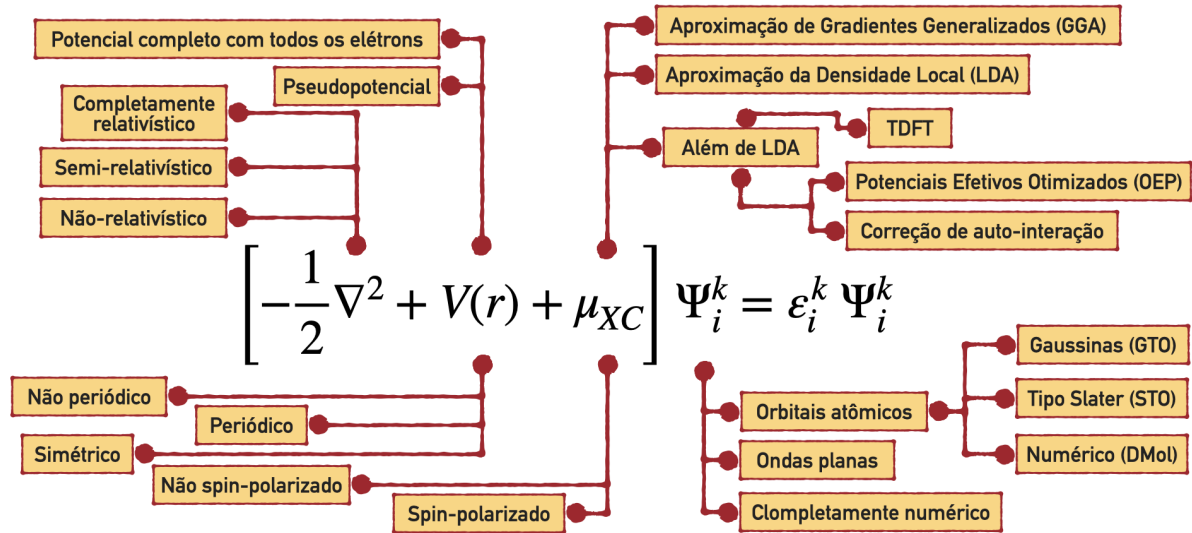
Após a obtenção dos complexos formados pelo LST na sACE através de *docking* molecular, todos os átomos de hidrogênio foram adicionados e suas posições foram classicamente otimizadas, mantendo-os flexíveis, enquanto os outros átomos permaneciam fixos.

3.3 Cálculos DFT

Em 1998, P. Hohenberg e W. Kohn foram agraciados com o prêmio Nobel em Química por suas contribuições ao desenvolvimento da teoria do funcional da densidade (DFT), que foi introduzida em 1964, a qual permitiu tratar do problema quântico de muitos corpos através de uma equação de partículas independentes, sujeitas a um potencial efetivo, que inclui os efeitos de correlação eletrônica. Desta forma, a DFT é hoje uma das principais ferramentas para o tratamento do problema quântico de N corpos. Os cálculos na teoria do funcional da densidade (DFT) foram realizados para descrever as energias de interação entre ligantes-proteínas. Para tal, foi utilizado o código DMol³ (DELLEY, 1990; DELLEY, 2000) do pacote de programas Biovia Accelrys Materials Studio (SYSTEMES, 2017) usando a Aproximação de Densidade Local (LDA) para o funcional de troca e correlação com a parametrização PWC (PERDEW; WANG, 1992) e método de correção de dispersão (DFT-D) OBS (Ortman, Bechstedt e Schmidt) (ORTMANN *et al.*, 2006). E, para expandir os orbitais eletrônicos de Kohn-Sham levamos em conta todos os elétrons explicitamente e com *spin* irrestrito com o conjunto de base de precisão numérica dupla mais polarização (DNP, *double numerical plus polarization*). O conjunto de bases DNP tem acurácia equivalente ao do conjunto de bases Gaussianas 6-311+G(3df,2dp), com erro de superposição de bases muito pequena (BSSE, *Bases Set Superposition Error*). O

raio de corte do orbital para esta base foi ajustado para 3.7 Å e a tolerância para convergência do campo auto-consistente escolhido foi de $10^{-6} E_h$, assegurando uma estrutura eletrônica bem convergente para o sistema.

Figura 12 – Equação geral da DFT.

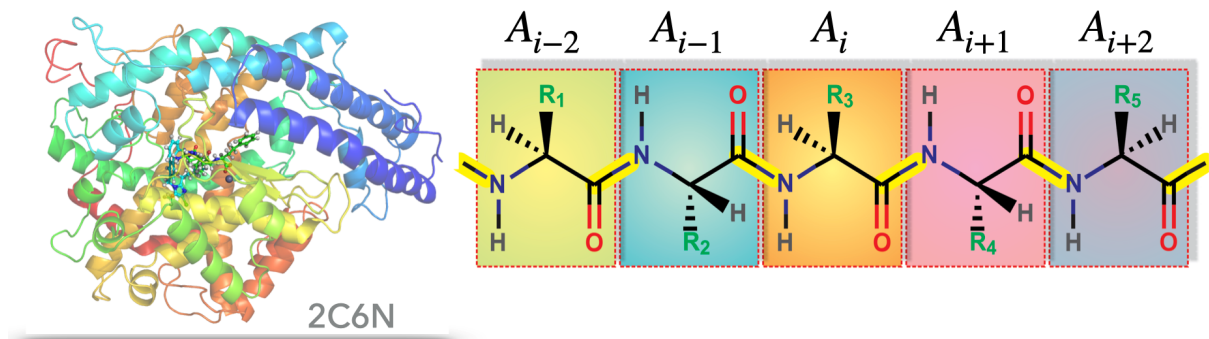


Quando se trata de sistemas onde não há ligações covalentes envolvidas, os métodos DFT puros são bem estabelecidos por não serem capazes de descrever esses sistemas (ZHAO; TRUHLAR, 2008). Quando se utiliza o funcional LDA sabe-se que os valores de energia relativa, quando comparada com as energias experimentais, podem ser superestimados, principalmente quando há a presença no sistema de íons e cadeias carregadas e, além disso, o funcional é insuficiente para caracterizar ligações de hidrogênio (ZANATTA *et al.*, 2012). Entretanto, quando se avalia a interação de ligantes no sítio de ligação estudos mostraram que o funcional LDA apresenta uma melhor concordância com o método MP2 quando comparado com funcionais híbridos (ZANATTA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012). Assim, podemos afirmar que o funcional LDA, usado nos sistemas em estudo na presente tese, pode ajudar a fornecer informações importantes para a compreensão da interação da sACE com os ligantes LPR e LST, anti-hipertensivo inibidor da ACE e bloqueador do receptor de angiotensina II do tipo 1, respectivamente.

3.4 Estratégia MFCC

As energias de interação das moléculas de LPR e LST e cada resíduo de aminoácido da sACE (que contém 612 aminoácidos) foram estimados usando uma adaptação do método MFCC que permite a aplicação de métodos quânticos, devido o complexo ligante-enzima ser decomposto em fragmentos de aminoácidos que são tratados com *caps* moleculares, que imitam as propriedades locais de interação.

Figura 13 – Esquema utilizado para o cálculo da energia de interação através de uma adaptação do método MFCC, mostrando os respectivos *caps*, resíduos de aminoácidos A_{i-1} , A_i e A_{i+1} , usados na metodologia.



A metodologia consiste em um caso particular da aproximação MFCC (do inglês, *Molecular Fragmentation with Conjugate Caps*), onde os *caps* escolhidos são os resíduos de aminoácidos anterior $i-1$ e posterior $i+1$ da sequência da cadeia peptídica da proteína conforme esquema apresentado na Fig. 13.

Em seguida, simulações dentro do formalismo da teoria do funcional da densidade (DFT) usando a aproximação de densidade local (LDA) para o funcional de troca e correlação (PWC) foram realizadas usando o programa de modelagem Biovia Materials Studio DMol³ (SYSTÈMES, 2017; DELLEY, 1990; ORTMANN *et al.*, 2006; DELLEY, 2000). Considerando a necessidade de alcançar o melhor equilíbrio entre o custo computacional por execução da simulação e o tamanho do complexo ligante-proteína investigado, bem como o caráter dominante das forças dispersivas não covalentes nele presentes, escolhemos a abordagem funcional LDA para estimar as energias de interação intermolecular ligante-aminoácido. Isso permitiu determinar as energias de interação entre os inibidores da sACE (LPR e LST) e cada um dos aminoácidos da sACE com boa estimativa e, adicionalmente, obter a energia total de interação somando todas as energias de interação dos aminoácidos individuais. Um conjunto de base de dupla polarização

numérica (DNP) foi escolhido para expandir os orbitais eletrônicos de Kohn-Sham considerando todos os elétrons explicitamente e com spin irrestrito. O raio de corte orbital para este conjunto de base foi definido para 3,7 Å e o limite de convergência de campo auto-consistente foi ajustado para $10^{-6} E_h$. A posição atômica dos hidrogênios do sistema formado pelos ligantes (LST e LPR) e a sACE foram otimizados classicamente, com tolerâncias de convergência de $10^{-5} E_h$ para a força máxima por átomo e 0,005 Å para o deslocamento atômico máximo, com átomos não hidrogênio mantidos fixos.

As estruturas do complexo LPR-sACE (obtidas do Protein Data Bank, PDB ID 2C6N) e do complexo LST-sACE (obtidas por *docking* molecular conforme descrito anteriormente) foram usadas como entradas para cálculos de energias de interação dos ligantes (LPR e LST) com todos os 612 aminoácidos que constituem a sACE. As energias de interação foram estimadas pelo método MFCC (*Molecular Fractionation with Conjugate Caps*) (ZHANG *et al.*, 2003), considerando os *caps* como os aminoácidos vizinhos com a ligação peptídica quebrada completada com um átomo de hidrogênio. Portanto, a energia total de interação do complexo L-sACE (LPR- e LST-sACE), foi obtida pela equação (3.1):

$$E(\text{L-sACE}) = \sum_{n=1}^{612} E_i(\text{L-}A_i) \quad (3.1)$$

que corresponde à soma de todas as energias de interação individuais (E_i) de todos os 612 aminoácidos da cadeia A da proteína sACE (PDB 2C6N) com cada um dos ligantes L (LST e LPR). Assim, a energia total de interação dos ligantes (LPR e LST) no sítio da enzima (sACE) é aproximadamente igual à soma das energias individuais calculadas dos resíduos de aminoácidos da enzima. A energia de interação entre os ligantes L e o aminoácido A_i da sACE, é dada por $E_i(\text{L-}A_i)$:

$$\begin{aligned} E_i(\text{L-}A_i) = & E_A \left(\text{L} + A_{i-1}A_iA_{i+1} + S_1 + S_2 \right) - E_B \left(A_{i-1}A_iA_{i+1} + S_1 + S_2 \right) \\ & - E_C \left(\text{L} + A_{i-1} + A_{i+1} + S_1 + S_2 \right) + E_D \left(A_{i-1} + A_{i+1} + S_1 + S_2 \right) \end{aligned} \quad (3.2)$$

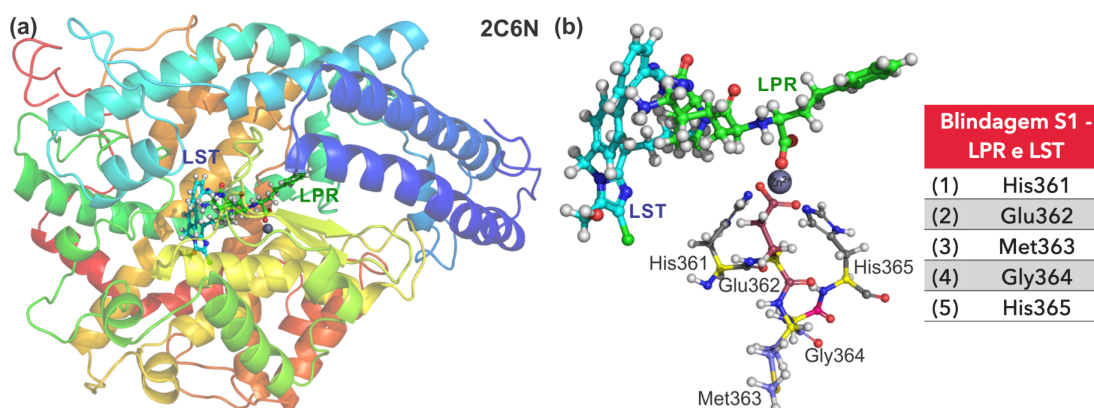
aqui os *caps* A_{i-1} e A_{i+1} são os primeiros aminoácidos vizinhos em ambos os lados do aminoácido A_i com a ligação peptídica quebrada completada com um átomo de hidrogênio. No lado direito da eq. 3.2, E_A é a energia total do sistema formado pela molécula do ligante, o aminoácido (A_i), os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) do A_i e as blindagens (S_1 e S_2); o termo E_B é a energia total do aminoácido (A_i), os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) de A_i e as blindagens (S_1 e S_2) somente; E_C é a energia total do sistema formado pela molécula ligante, os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) do A_i e as blindagens (S_1 e S_2) somente;

finalmente, E_D é a energia total do sistema formado apenas pelos primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) de A_i e as blindagens (S_1 e S_2). Como se pode observar na Eq. (3.2) as blindagens, S_1 e S_2 , aparecem em todos os termos E_A , E_B , E_C e E_D .

Tabela 2 – Aminoácidos que fazem parte das blindagens S_1 e S_2 para cada ligante. Em negrito estão destacados os aminoácidos que estão presentes para ambos os ligantes.

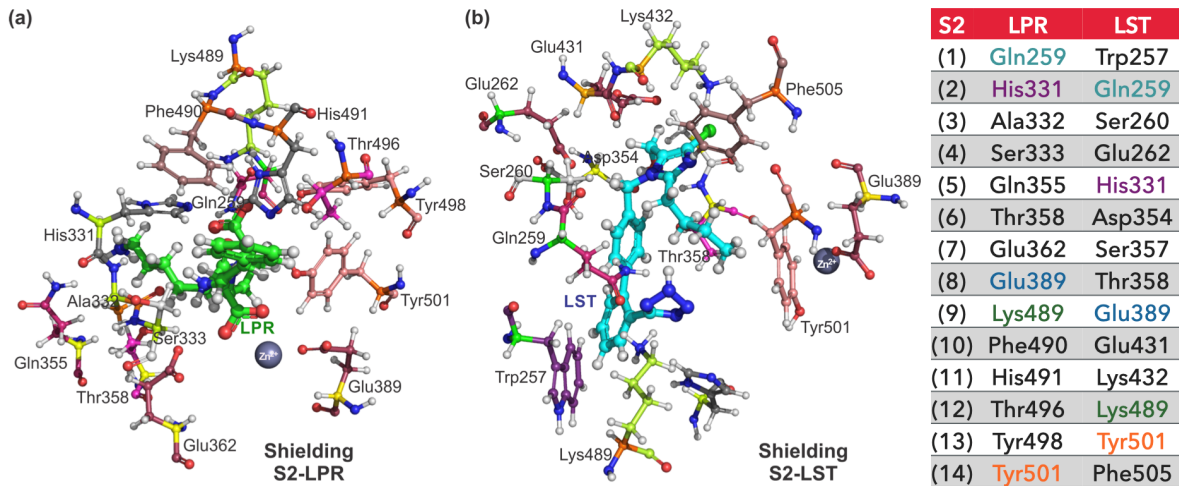
Blindagem/Ligante	LPR			LST		
S_1	His361	Glu362	Met363	His361	Glu362	Met363
(5 aminoácidos)	Gly364	His365		Gly364	His365	
	Gln259	His331	Ala332	Trp257	Gln259	Ser260
	Ser333	Gln355	Thr358	Glu262	His331	Asp354
S_2	Glu362	Glu389	Lys489	Ser357	Thr358	Glu389
(14 aminoácidos)	Phe490	His491	Thr496	Glu431	Lys432	Lys489
	Tyr498	Tyr501		Tyr501	Phe505	

Figura 14 – (a) Representação de bola e bastão do lisinopril (LPR) e do losartan (LST) com a blindagem de aminoácidos S_1 . (b) Superposição na mesma orientação com o sítio de ligação ao zinco da sACE, blindagem S_1 . Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos de acordo com o tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Todos os resíduos estão devidamente rotulados. A figura foi desenhada usando PyMOL(Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



Usamos as blindagens, S_1 e S_2 , devido à interação de longo alcance com o íon zinco (Zn^{2+}) presente no sítio de ligação da sACE. Assim, para a blindagem S_1 é formada pelos cinco aminoácidos pertencentes ao sítio de zinco (His361, Glu362, Met363, Gly364 e His365), conforme ilustrado na Fig. 14 e Tab. 2, ou seja, a blindagem S_1 é a mesma para ambos os ligantes

Figura 15 – Representação de bola e bastão do lisinopril (LPR) e do losartan (LST) com a blindagem de aminoácidos S_2 -LPR e S_2 -LST. Superposição na mesma orientação com o sítio de ligação ao zinco da sACE, (a) blindagem formada por resíduos de aminoácidos dentro de 3 Å com 14 aminoácidos para S_2 -LPR; e (b) blindagem formada por resíduos de aminoácidos dentro de 3 Å e para S_2 -LST. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos de acordo com o tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Todos os resíduos estão devidamente rotulados. A figura foi desenhada usando PyMOL(Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



(LPR e LST). Além disso, utilizamos uma segunda blindagem, S_2 , a qual foi formada por uma camada de resíduos de aminoácidos dentro de um raio de 3.0 Å definido a partir dos ligantes (LPR e LST), logo, a blindagem S_2 vai depender do ligante. Desta forma, a blindagem S_2 é constituída por 14 aminoácidos para o ligante LPR, S_2 -LPR (Gln259, His331, Ala332, Ser333, Gln355, Thr358, Glu362, Glu389, Lys489, Phe490, His491, Thr496, Tyr498 e Tyr501) – ver Fig. 15a – e 14 aminoácidos para o ligante LST, S_2 -LST (Trp257, Gln259, Ser260, Glu262, His331, Asp354, Ser357, Thr358, Glu389, Glu431, Lys432, Lys489, Tyr501 e Phe505) – ver Fig. 15b, conforme apresentado na Tab. 2.

Para ambas as blindagens (S_1 e S_2) os resíduos de aminoácidos foram utilizados em todos os cálculos da energia de interação - Eq. (3.2) - para obter uma melhor descrição dos ligantes com a proteína sACE. Exceto quando o aminoácido de interesse (A_i) estava presente na blindagem, foi considerado como na equação (3.2). Seguindo os mesmos procedimentos descritos no trabalho publicado anteriormente para estatina-HMG-CoA redutase (COSTA *et al.*, 2012), a energia total entre L e A_i foi estimada como na equação (3.1). Os métodos aqui apresentados foram utilizados para obter uma descrição do sítio de interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR) e losartan (LST) na sACE conforme resultados apresentados no próximo capítulo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O losartan (LST) é um conhecido antagonista do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AGTR1), classificado como antagonista na angiotensina II, usado como anti-hipertensivo oral, mas suas ações sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE) ainda não são claras. A ACE está envolvida no controle da pressão arterial catalisando a conversão de Ang I em Ang II na vasoconstrição e degradando o peptídeo vasodilatador bradicinina (BK), conforme descrito em mais detalhes na Fig. 5 no capítulo 2 desta tese. A Ang II interage com os receptores AT1, que fazem parte do grupo de receptores acoplados à proteína G, aumentando a produção de IP3 e DAG pela fosfolipase C, além de desencadear a sinalização do cálcio intracelular. O losartan bloqueia os receptores AT1 e a sinalização de cálcio intracelular promovendo vasodilatação.

Os inibidores da ACE possuem diferentes estruturas químicas permitindo que eles interajam com o sítio de ligação, enzimas em geral, especificamente e com maior (menor) afinidade. Com base nisso, o desenvolvimento de novos medicamentos anti-hipertensivos deve levar em consideração informações estruturais de sistemas modelo como carboxipeptidase (PATRICK, 2017), AnCE (COSTA *et al.*, 2012), ACEt (BARROSO-NETO *et al.*, 2012), sACE (CORRADI *et al.*, 2006), etc., o que pode contribuir decisivamente para o desenvolvimento de inibidores mais potentes, mais específicos e com menos efeitos colaterais. Aqui, usamos dados cristalográficos da sACE (PDB 2C6N) (CORRADI *et al.*, 2006) como um sistema modelo para descrever a interação intermolecular com dois ligantes da sACE, LPR e LST.

O conhecimento da estrutura tridimensional do complexo fármaco-bioreceptor pode permitir a previsão de interações intermoleculares e, então, fornecer informações que auxiliem o planejamento de novos fármacos. No presente capítulo são apresentados os resultados do estudo da interação do LPR e LST com a enzima conversora de angiotensina sACE.

4.1 Losartan interage com a enzima sACE de acordo com estudos *in silico*

Para entender a relação entre LST e ACE, primeiro realizamos ensaios de *docking* molecular usando dados cristalográficos de sACE (PDB 2C6N) (CORRADI *et al.*, 2006). Em seguida, os hidrogênios foram otimizados através de métodos clássicos mantendo os átomos pesados fixos. E, por último, utilizamos o método MFCC para descrição do perfil de interação dos anti-hipertensivos em estudo, LPR e LST, com a enzima (sACE) cujos resultados são apresentados a seguir.

4.2 Docking molecular

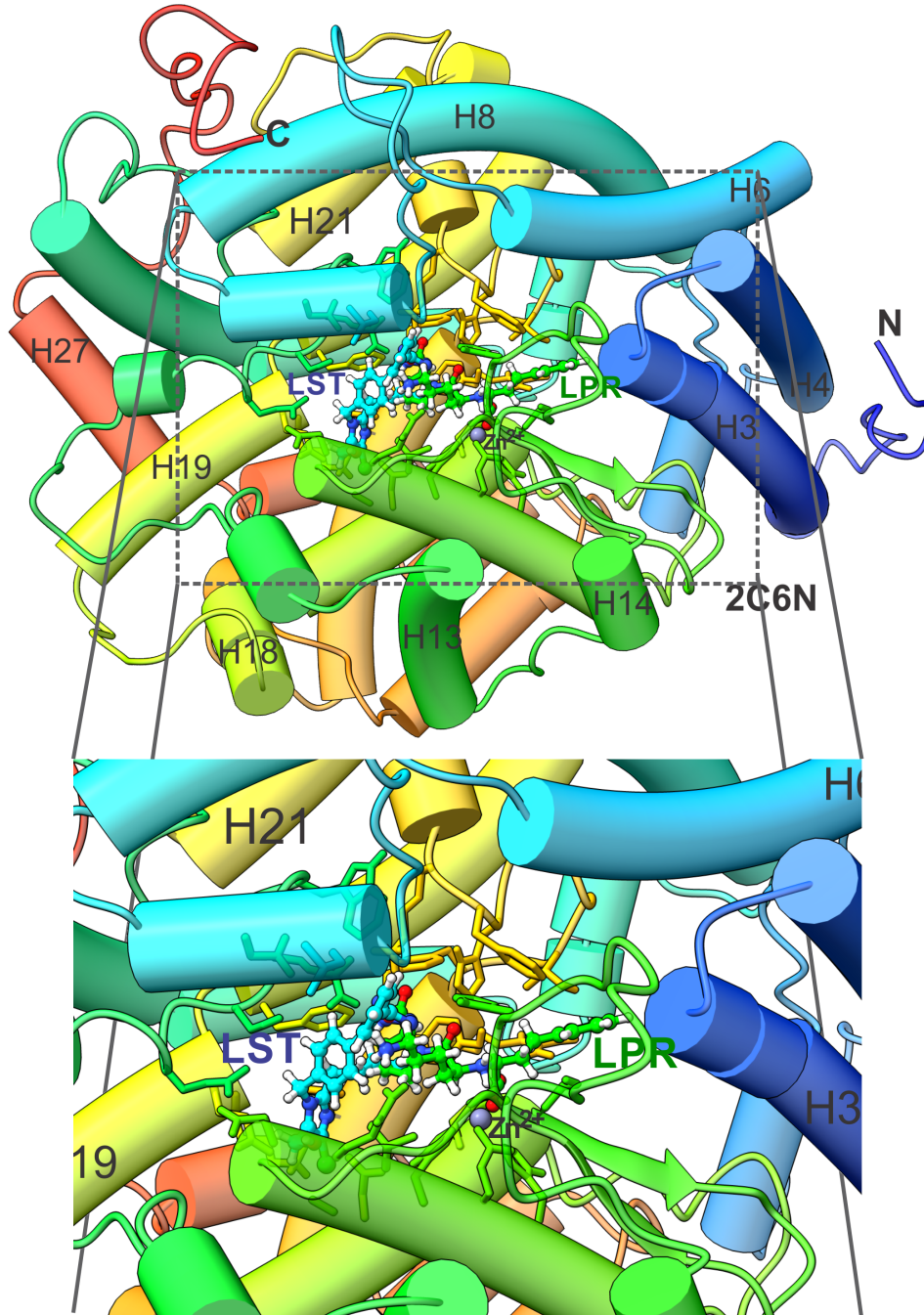
Inicialmente, realizamos uma análise de *docking* molecular da interação do losartan (LST) com a sACE. A pose de encaixe melhor classificada do LST no sítio de ligação da sACE por meio de interação não covalente é mostrada na Fig. 16. Além disso, a Fig. 14a mostra a superposição dos ligantes (LPR e LST) no sítio de ligação do zinco o qual é formado por cinco aminoácidos – His361, Glu362, Met363, Gly364 e His365 – que foram usados para a blindagem S_1 .

Os resultados de *docking* molecular demonstram a ligação do LST no mesmo sítio de ligação da sACE. A melhor pose representante do LST e LPR (obtido da estrutura cristalográfica) está apresentado na Fig. 16 após a otimização dos hidrogênios.

4.3 Energia de interação (MFCC)

Cada ligante tem sua especificidade de ligação ao sítio da sACE, sendo determinado por sua própria estrutura molecular e configuração espacial e, também, pelos resíduos com os quais o ligante interage dentro do sítio de ligação da sACE. Através apenas dos dados cristalográficos ou informações de *docking* molecular não é simples de especificar quais são os resíduos mais importantes na interação dentro do sítio de ligação da proteína. A distribuição de cargas devido a diversidade de aminoácidos carregados ou não que constituem a proteína faz com que não necessariamente um aminoácido mais próximo sem carga ao ligante tenha uma interação mais forte do que um aminoácido carregado mais distante. Diante disto, utilizamos uma estratégia de fracionamento molecular com *caps* conjugados (MFCC) a qual nos fornece mecanismos para obter através de um formalismo *ab initio* a energia de interação entre cada resíduo de aminoácido da enzima (no caso, sACE) e cada um dos ligantes (LPR e LST). Na presente tese, obtivemos as energias de interação de todos os 612 resíduos de aminoácidos da sACE com os anti-hipertensivos LPR e LST. A energia de interação obtida para o complexo L-sACE é uma função da distância r , ou seja, temos $E_{(L-sACE)}(r)$, que é obtida através da soma de todas as energias de interação calculadas dos resíduos dentro da distância r . Quando a distância r aumenta (Ligante-resíduo), o número de resíduos de aminoácidos dentro do raio r também aumenta, o que faz com que a energia de interação seja modificada e sua variação vai depender dos aminoácidos dentro do raio r . Entretanto, espera-se que, para valores de r suficientemente grandes, a energia de interação deve ser estabilizada e convergir, ou seja, não sofrerá grandes

Figura 16 – Sobreposição estrutural da ligação do LPR (PDB 2C6N) e a melhor pose do LST após *docking* flexível no sítio de ligação da sACE. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos de não carbono são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloro em verde e íon de zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).



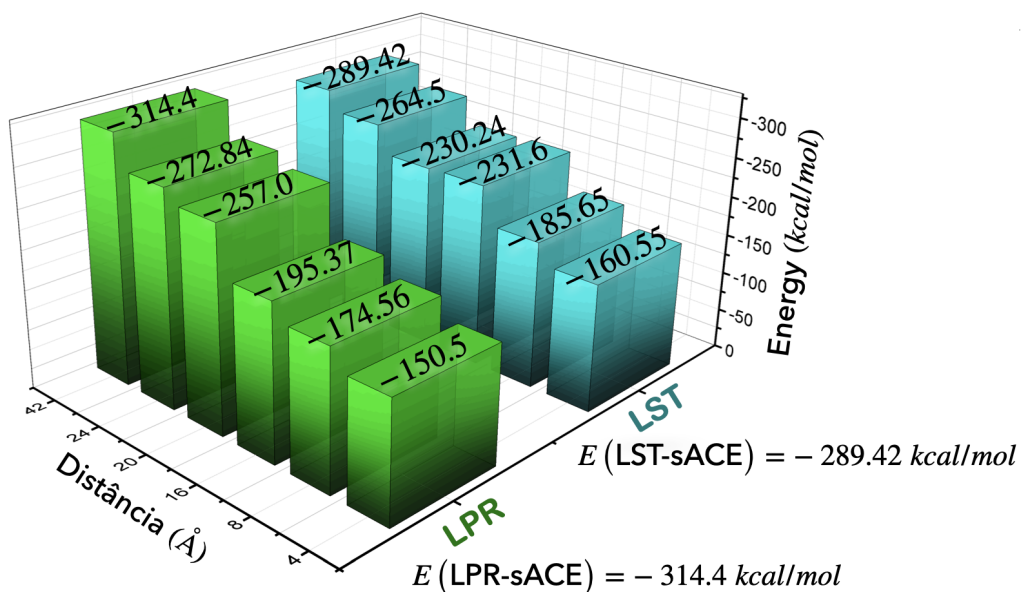
variações com o aumento do número de interações. O valor de r define quão próximo (distante) um aminoácido pode estar do ligante.

Um dos aspectos mais importantes deste trabalho é a determinação da energia de interação de cada aminoácido da proteína sACE com seus respectivos ligantes (LPR e LST) através do método MFCC. A aplicação de estratégias de fragmentação permite conhecer várias propriedades do complexo ligante-proteína (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020). A partir dos resultados das energias de interação de cada aminoácido com cada ligante, foram obtidos os seguintes resultados: (a) a energia total de interação do sistema ligante-sACE, bem como o perfil energético de cada ligante (LPR e LST) com a sACE, representada na Fig. 18; (b) a superfície de energia de interação, veja a Fig. 20; e (c) o painel BIRD (Fig. 19), destacando os principais aminoácidos da interação ligante-sACE.

4.3.1 Energia total de interação LPR- e LST-sACE

Na Fig. 17 está apresentada a energia total de interação em relação à distância r ao ligante (LPR e LST) com a sACE fazendo uma comparação entre as energias de interação calculadas $E_{(L-sACE)}(r)$, para a sACE complexada com LPR e LST com determinados valores de r sendo $r_1 = 4 \text{ \AA}$, $r_2 = 8 \text{ \AA}$, $r_3 = 16 \text{ \AA}$, $r_4 = 20 \text{ \AA}$, $r_5 = 24 \text{ \AA}$ e $r_6 = 42 \text{ \AA}$ (que corresponde a proteína toda).

Figura 17 – Energia total de interação dos anti-hipertensivos lisinopril (LPR, verde) e losartan (LST, azul) com a sACE relativo às distâncias r de interação de $r_1 = 4 \text{ \AA}$, $r_2 = 8 \text{ \AA}$, $r_3 = 16 \text{ \AA}$, $r_4 = 20 \text{ \AA}$, $r_5 = 24 \text{ \AA}$ e $r_6 = 42 \text{ \AA}$.



Pode ser observado na Fig. 17 que para o menor raio de interação $r_1 = 4 \text{ \AA}$, o valor absoluto da energia de interação da sACE com o LPR e LST mostra o LST com energia discretamente mais baixa (maior interação), com uma diferença de apenas $-10.5 \text{ kcal mol}^{-1}$. Para o sítio observado com $r_2 = 8 \text{ \AA}$, o valor absoluto da energia de interação é maior para o LST, onde temos que $E_{(\text{LPR-sACE})}(8 \text{ \AA}) < E_{(\text{LST-sACE})}(8 \text{ \AA})$ diferença essa que se acentua em $r_3 = 16 \text{ \AA}$, onde o LST ainda se mantém com energia de interação mais baixa do que o LPR, $E_{(\text{LPR-sACE})}(16 \text{ \AA}) < E_{(\text{LST-sACE})}(16 \text{ \AA})$. Entretanto, para $r_4 = 20 \text{ \AA}$ o LPR passa a apresentar maior energia de interação quando comparado ao LST, assim, $E_{(\text{LPR-sACE})}(20 \text{ \AA}) > E_{(\text{LST-sACE})}(20 \text{ \AA})$. Quando $r_5 = 24 \text{ \AA}$ o valor absoluto da energia de interação da sACE com o LPR e LST voltam a ser equivalentes, $E_{(\text{LPR-sACE})}(24 \text{ \AA}) \approx E_{(\text{LST-sACE})}(24 \text{ \AA})$. Entretanto, ao observar a energia total de interação pode-se ver que o LPR, para toda a proteína, com $r_6 \approx 50 \text{ \AA}$ temos que o LPR apresenta energia de interação mais baixa do que o LST com a sACE, logo, $E_{(\text{LPR-sACE})}(50 \text{ \AA}) > E_{(\text{LST-sACE})}(50 \text{ \AA})$.

Assim, os resultados demonstram que ambos os anti-hipertensivos, LPR e LST, se ligam com afinidade ao sítio de ligação da sACE. Entretanto, os resultados sugerem que o anti-hipertensivo LPR se liga mais fortemente ao sítio de ligação da sACE quando comparado ao LST. Em seguida, na próxima seção, é apresentado o perfil de energia para uma melhor compreensão de como a distância r influencia na energia de interação do sistema.

4.3.2 Perfil de energia

O perfil de energia de interação do ligante com a sACE, LPR- e LST-sACE, apresentado na Fig. 18 foi obtido pela soma das energias de interação de cada aminoácido da sACE levando em consideração a distância (r) em relação ao ligante. Assim, a partir da Fig. 18 pode-se relacionar as características do perfil de energia com os aminoácidos mais importantes que foram destacados e distribuídos pela distância (r) ao ligante. O perfil de energia mostra uma energia de interação mais baixa (maior interação) entre os anti-hipertensivos e os aminoácidos da sACE, resultado da presença do íon zinco que está dentro do sítio de ligação, estabelecendo interação direta com os grupos químicos C3OO^- e C22N3 dos ligantes LPR e LST, respectivamente. As características do perfil de energia apresentado na Fig. 18 podem ser relacionadas com os resíduos distribuídos por raio apresentados na Tab. 3.

Na Figura 18 pode-se observar que até 2.0 \AA , há uma rápida diminuição na energia de interação (declínio na linha do gráfico), causado principalmente devido a interação do aminoácido

Asp354 com LST (linha azul claro) e os aminoácidos Lys489 e Ala332 com LPR (linha verde). A soma das energias de interação de todos os aminoácidos que estão a uma distância máxima de 3,0 Å dos ligantes é responsável pela energia de interação de aproximadamente $-150 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o LST e LPR, causada principalmente pela interação com os aminoácidos Gln259, Lys489, Thr358, Glu262 e His331 com LST (linha azul claro) e His491, Ser333, Thr358, His331, Tyr501 e Phe490 com LPR (linha verde).

As energias de interação dos aminoácidos que estão distantes mais de 28 Å do ligante têm pouca ou nenhuma contribuição para modificar a energia total de interação do sistema LPR- e LST-sACE.

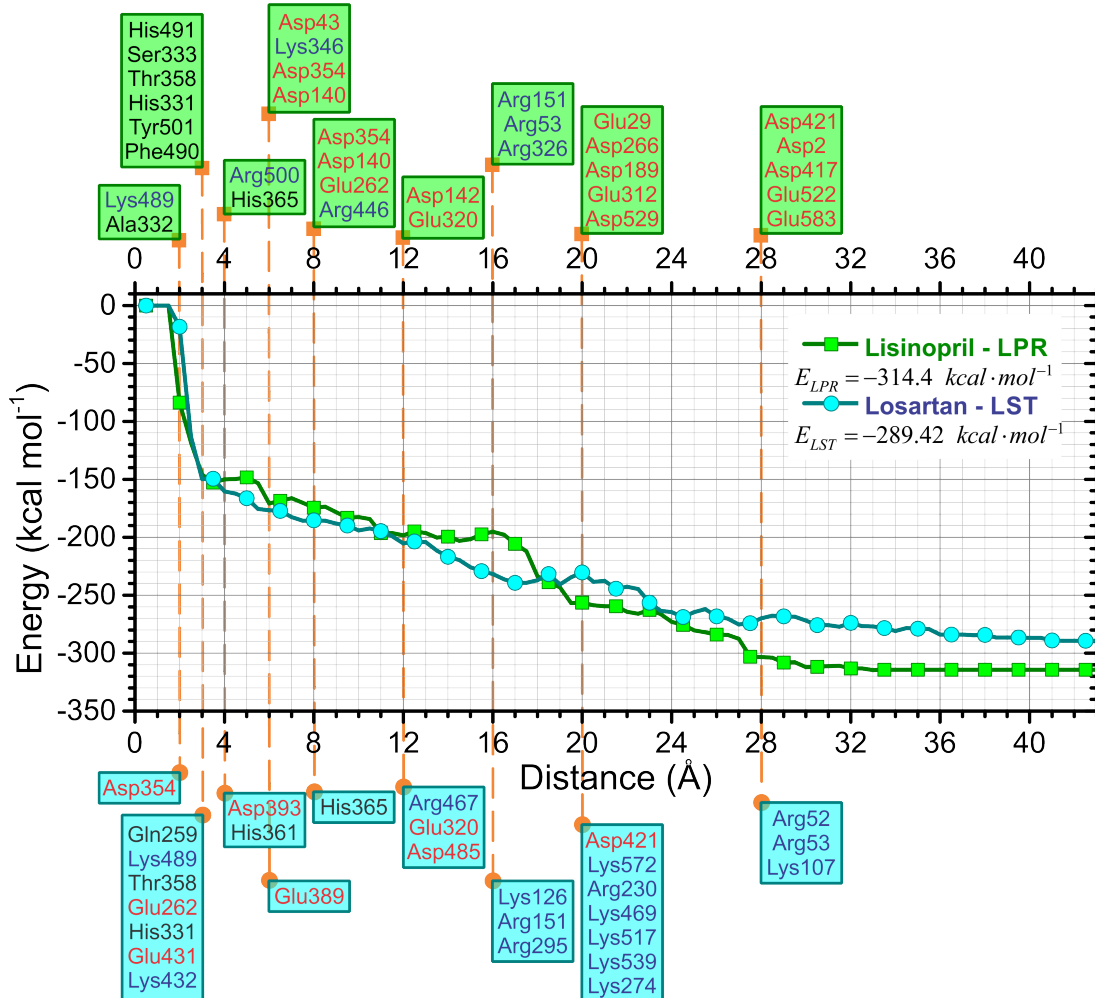
Adicionando as energias de interação dos aminoácidos localizados dentro de 19 Å do ligante, verifica-se que LST apresenta maior energia de interação que LPR. No entanto, a partir da distância 20 Å, LPR tem maior energia de interação que LST, mantendo-se assim até a soma de todas as energias de interação dos aminoácidos da proteína sACE.

Esta diminuição acentuada na energia de interação é devido à interação iônica entre os íons de zinco com carga +2 e a carga negativa do grupo químico C3OO^- com aminoácidos carregados presentes no sítio de ligação da sACE. Além disso, a blindagem parcial (S_1) do íon de zinco longe do local de ligação deve ser levada em consideração para obter uma imagem adequada da estabilidade do complexo ligante-sACE. A energia de interação ligante-sACE, que é a soma das energias individuais de cada resíduo de aminoácido, mostra que o LPR tem uma energia de interação mais atrativa com uma diferença de $\Delta E = -24,98 \text{ kcal mol}^{-1}$.

4.3.3 Painel BIRD

A Figura 19 apresenta o painel gráfico com as energias de interação obtidas para os anti-hipertensivos LST e LPR e os resíduos de aminoácidos mais importantes no sítio de ligação da sACE. Este painel gráfico chamado de BIRD, referência ao acrônimo inglês para as palavras-chave sítio de ligação, energia de interação e domínio dos resíduos (*Binding site, Interaction energy and Residues Domain*), e mostra de forma simplificada: (i) a energia de interação (em kcal mol^{-1}) individual para cada aminoácido da sACE através de barras (verde para o LPR e azul para o LST) horizontais, a partir do qual pode-se estimar quantitativamente o papel de cada resíduo no sítio de ligação da sACE, ou seja, sua eficácia para atrair ou repelir o ligante; (ii) a respectiva região e os átomos do LPR e LST (ao lado de cada barra) que estão mais próximos de cada resíduo do sítio de ligação da sACE e, (iii) a distância entre cada resíduo e o

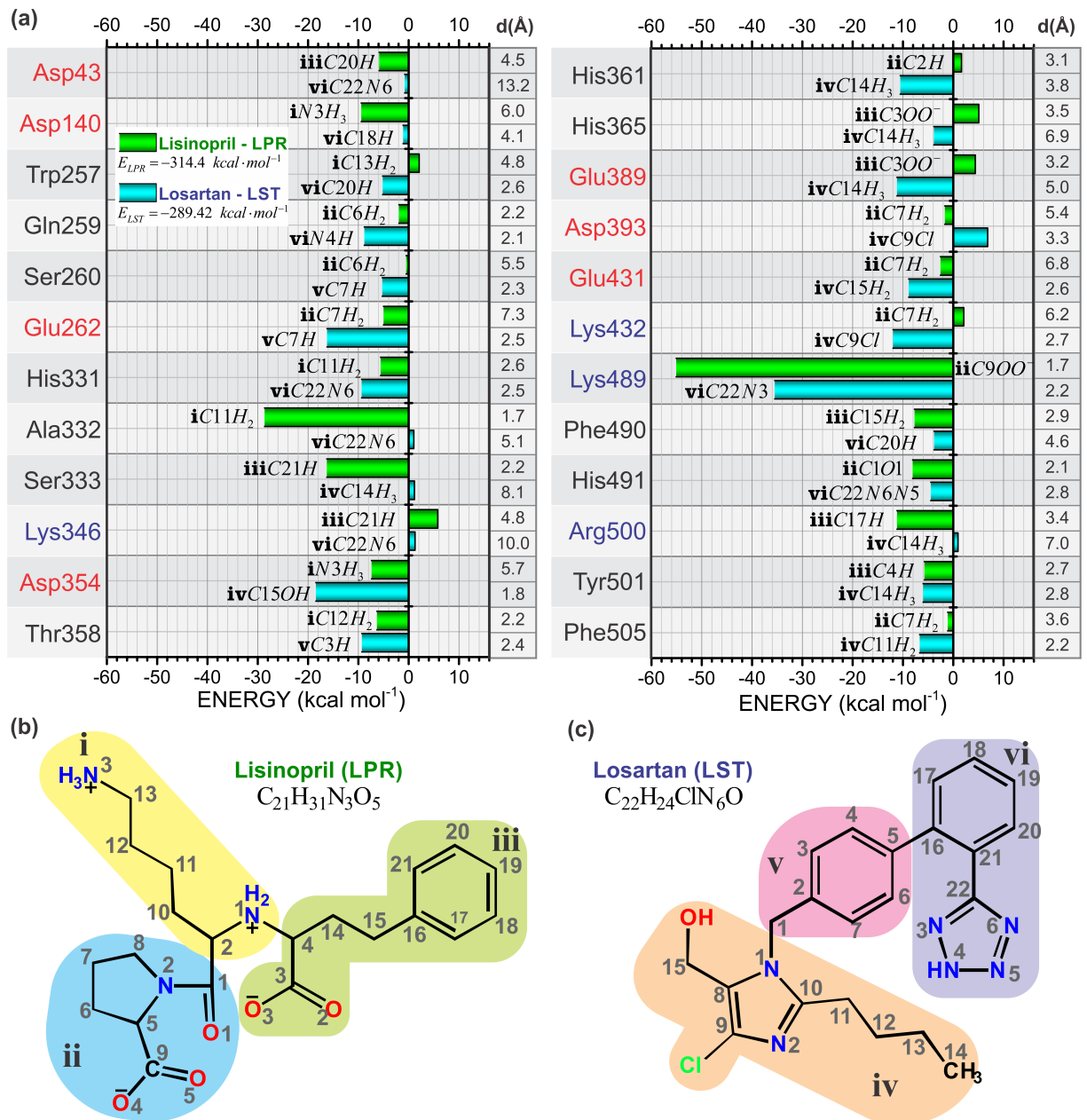
Figura 18 – Energia total de interação do complexo LPR-sACE (quadrados sólidos verdes) e complexo LST-sACE (círculos sólidos azuis claros) em função do raio do sítio de ligação usando o método MFCC - os principais aminoácidos envolvidos na interação de ligação são indicados para LPR-sACE (retângulos verdes, superior) e LST-sACE (retângulos azuis, inferior) agrupados pela distância ao ligante indicado pelas linhas verticais laranja tracejadas. A cor vermelha (azul) é pra destacar os aminoácidos carregados negativamente (positivamente).



ligante (LPR e LST) adicionada ao lado direito do gráfico. Podemos ver no painel BIRD 19 os resíduos de aminoácidos que contribuem mais fortemente para a estabilização do LPR-sACE (Ala332, Ser333, Lys489 e Arg500) e do LST-sACE (Glu262, Asp354, His361, Glu389, Lys432 e Lys489).

Através do BIRD (Fig. 19), é possível investigar os resíduos de sACE com energia de interação relevante para estabilização e a posição relativa dos resíduos dentro do sítio de ligação dos inibidores de sACE. Além disso, há informações quantitativas detalhadas sobre energias de interação resíduo-ligante individuais, permitindo *insights* sobre o mecanismo molecular da interação ligante-proteína, bem como produzindo ferramentas úteis e práticas para o *design* racional da próxima geração de inibidores da sACE. A análise do BIRD demonstrou que as

Figura 19 – (a) Painel gráfico do sítio de ligação, energia de interação e domínio de resíduos (BIRD) com os principais resíduos de aminoácidos da sACE e suas contribuições da energia de interação para o LPR (barras verdes) e o LST (barras azuis). Os átomos mais próximos do LPR e do LST são indicados ao lado de cada barra. A cor vermelha (azul) significa resíduos de aminoácidos carregados negativamente (positivamente). A representação planar das moléculas (b) LPR e (c) LST são subdivididas em três partes **i** (amarelo), **ii** (verde) e **iii** (azul) para LPR e **iv** (roxo), **v** (rosa) e **vi** (laranja) para LST, com átomos marcados para facilitar a análise de sua interação com a proteína alvo sACE.)



estruturas moleculares do LPR e do LST ativam diferentes resíduos dentro do sítio de ligação. De uma forma geral as interações entre os aminoácidos selecionados no BIRD (Fig. 19) e na Tab. 3 são atrativos o que sugere uma forte afinidade dos ligantes com o sítio de interação da enzima (sACE). Merece destaque aqui o aminoácido Lys489, que possui forte energia de interação tanto com o LPR quanto com o LST, com valores de $-55,10 \text{ kcal mol}^{-1}$ para LPR e $-35,52 \text{ kcal permol}$ para o LST que estão no raio de interação menor que 3.0 \AA . LPR forma uma forte ponte salina entre o grupo localizado na região **ii** (ver Fig. 19b) e o grupo de Lys489 em um raio distante igual a 1.7 \AA . Por outro lado, LST forma uma ligação de hidrogênio moderada (2.2 \AA) com o resíduo Lys489 e o hidrogênio se conecta ao átomo localizado na região **vi** (ver Fig. 19c). As energias de interação calculadas para os aminoácidos com distância inferior a 4 \AA são responsáveis por $55,47\%$ ($47,86\%$) da energia de interação total calculada para o LST (LPR) com a sACE.

A partir da Tab. 3 e do painel BIRD (19) pode-se observar que o aminoácido Glu262 apresenta forte interação com o LST, $E(\text{Glu262-LST}) = -16.25 \text{ kcal mol}^{-1}$, e fraca interação com o LPR, $E(\text{Glu262-LPR}) = -5.0 \text{ kcal mol}^{-1}$. Essa diferença pode ser justificada pelo fato da molécula de LST estar localizada nas proximidades do aminoácido Glu262 a 2.5 \AA enquanto o LPR está a 7.3 \AA de distância. A Tabela 9 no Apêndice A apresenta os valores absolutos da energia de interação para cada um dos 612 aminoácidos da sACE com os ligantes (LPR e LST) detalhando os átomos envolvidos na interação, a região (dividida conforme apresentado na Fig. 19)(b-c) e a distância (r) ao ligante em ordem dos aminoácidos. Assim, conseguimos uma descrição detalhada ao nível atômico de como ocorre a interação no sítio de ligação da sACE do LPR e LST. Cerca de $57,50\%$ ($42,00\%$) das interações do LST (LPR) com a sACE estão na região **iv** (**iii**) seguido pela região **vi** (**ii**) com $29,00\%$ ($37,25\%$) e região **v** (**i**) com $13,50\%$ ($20,75\%$). Este resultado mostra que certas regiões do ligante interagem mais com a enzima do que outras, informação importante para o desenvolvimento racional de fármacos e possível modificação estrutural do ligante, nesse caso, é possível sugerir que modificações poderiam ser realizadas nas regiões onde a interação do ligante com a enzima é menor.

O valor absoluto da energia total de interação ligante-sACE sugere que o LST é uma potente molécula inibidora da sACE, com uma correlação direta entre a potência do inibidor da sACE e a energia total de interação do inibidor com a sACE. Para os sítios de ligação com $r = 8 \text{ \AA}$ e 16 \AA o valor absoluto de $E(r)$ sugere que LST é a molécula inibidora da sACE mais eficaz. Após a estabilização de $E(r)$ para $r > 19 \text{ \AA}$, a energia de interação indica que o LPR é o

Tabela 3 – Energia de interação, E_i em kcal mol⁻¹, dos aminoácidos mais importantes da sACE com o ligante (LPR e LST) detalhando os átomos envolvidos na interação, a região e a distância r (em Å) ao ligante.

sACE A_i	LPR			LST		
	(Região) Átomos	E_i	r (Å)	(Região) Átomos	E_i	r (Å)
Asp43	iiiC18-H	-5.89	4.5	viN6	-0.79	13.6
Asp140	iN3-H3	-9.45	6.0	viC18-H	-1.13	4.1
Trp257	iC13-H2	2.10	4.8	viC20-H	-5.18	2.6
Gln259	iiC6-H2	-1.92	2.2	viN4-H	-8.83	2.1
Ser260	iiC6-H2	-0.51	5.5	vC7-H	-5.27	2.3
Glu262	iiC7-H2	-5.00	7.3	vC1-H2	-16.25	2.5
His331	iC11-H2	-5.57	2.6	viN6	-9.35	2.5
Ala332	iC10-H2	-28.67	1.7	viN6	1.00	5.1
Ser333	iiiC17-H	-16.29	2.2	ivC14-H3	1.12	8.1
Lys346	iiiC17-H	5.78	4.8	viN6	1.28	10.0
Asp354	iN3-H3	-7.38	5.7	ivO-H	-18.46	1.8
Thr358	iC12-H2	-6.32	2.2	vC3-H	-9.32	2.4
His361	iC2-H	1.62	3.1	ivC14-H3	-10.55	3.8
His365	iiiC3-O3-O2	5.07	3.5	ivC14-H3	-3.87	6.9
Glu389	iiiC3-O3-O2	4.38	3.2	ivC14-H3	-11.20	5.0
Asp393	iiC7-H2	-1.69	5.4	ivC9-C1	6.83	3.3
Glu431	iiC7-H2	-2.55	6.8	ivC15-H2	-8.86	2.6
Lys432	iiC7-H2	2.09	6.2	ivC9-C1	-11.99	2.7
Lys489	iiC9-O4-O5	-55.10	1.7	viN3	-35.52	2.2
Phe490	iii C15-H2	-7.73	2.9	viC20-H	-3.81	4.6
His491	iiC1-O1	-8.09	2.1	viN5	-4.46	2.8
Arg500	iii C21-H	-11.18	3.4	ivC14-H3	0.92	7.0
Tyr501	iiiC4-H	-5.75	2.7	ivC14-H3	-5.98	2.8
Phe505	iiC7-H2	-1.10	3.6	ivC11-H2	-6.68	2.2

inibidor de sACE mais potente que o LST. Além disso, a energia total de interação sugere que o LPR, com energia de interação igual a $-314,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ é o inibidor de sACE mais eficaz. No entanto, a energia total de interação do LST é significativa e igual a $-289,42 \text{ kcal mol}^{-1}$ (uma diferença de apenas $24,98 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.4 Superfície de energia de interação

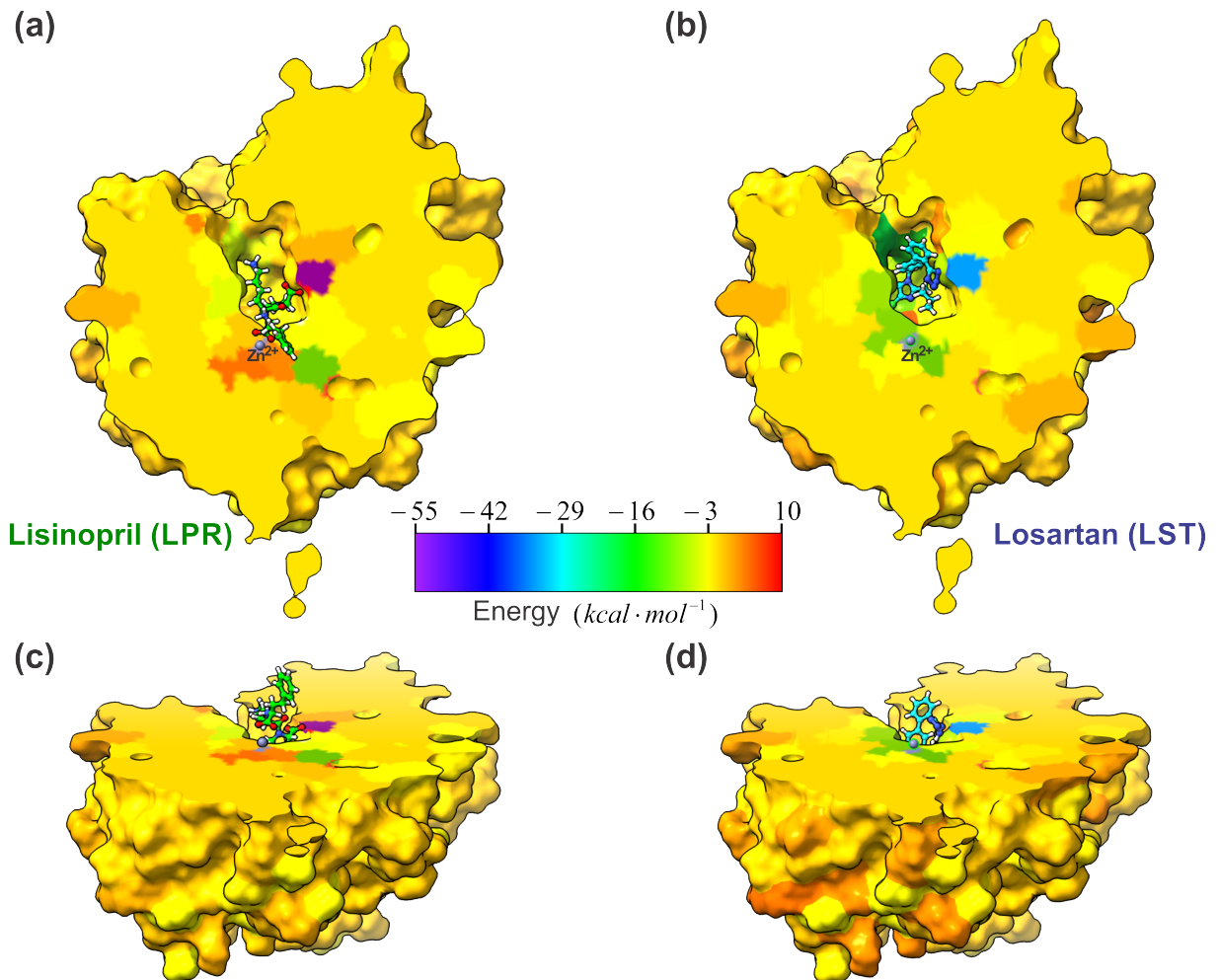
Com a finalidade de representar de forma mais clara, a energia de interação ligante-sACE foi projetada superfície da enzima. A Figura 20 mostra a projeção da energia de interação, $E_i(L-A_i)$, com os ligantes LPR (a e c) e LST (b e d) e a sACE para cada aminoácido, codificado por cores e mapeado na superfície molecular da enzima, de acordo com a barra de escala. As energias de interação dos aminoácidos e ligantes (LST e LPR) na sACE variam entre um valor mínimo de $-55 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e um máximo de 10 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Valores negativos (positivos) da energia de interação indicam atração (repulsão). O corte transversal (Fig. 20a-b) evidenciando o sítio de ligação da sACE mostra através da diferença de cores a distribuição dos valores de energia para cada aminoácido dentro do sítio.

Pode-se observar que o LPR apresenta mais aminoácidos com valores de energia de interação positivos (repulsivos) dentro do sítio. O aminoácido Lys489, que apresenta forte atração para ambos os ligantes, está destacado em lilás e azul para o LPR e LST, respectivamente. Além disso, observa-se uma maior variabilidade na energia de interação através mapa de cores dentro do sítio para o LSP quando comparado ao LST. Para aminoácidos mais distantes do sítio de interação é mostrado que, para ambos os ligantes, a energia de interação fica em torno de -3 kcal mol^{-1} , o que é esperado, já que a energia de interação deve diminuir com a distância, assim, verifica-se na superfície da enzima (Fig. 20c-d) quase em sua totalidade a cor da superfície tendendo para o amarelo.

4.4.1 Interações moleculares (modelo de ligação 2D e 3D)

Os tipos de interação (modelo de ligação 2D e 3D) obtidos a partir da estrutura cristalográfica (para LPR, PDB ID 2C6N) e por *docking* molecular (para LST) são descritos na Fig. 21. Múltiplas interações podem ser observadas com a ligação do LPR a sACE – veja a Fig. 21a-b – mostrando duas ligações de hidrogênio convencionais entre os átomos de oxigênio ($C9OO^-$) do LPR e hidrogênio ($N1H_2$) do LST e aminoácidos Tyr498 (distância igual

Figura 20 – As projeções da energia de interação, $E_i(L-A_i)$, com os ligantes (LPR e LST) e a sACE para cada aminoácido são codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-55 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 10 kcal mol^{-1} (escuro vermelho). LPR-sACE (a) e LST-sACE (b) são exibidos na mesma orientação, com os ligantes mostrados na representação de bola e bastão. Em (c) LST-sACE e (d) LPR-sACE a vista é girada em 60° ao longo do eixo x , em comparação com (a) e (b), respectivamente, mostrando a superfície ao longo da enzima. Os carbonos de cada um dos ligantes são coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos são coloridos por tipo de átomo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).



a 2,15 Å) e Ala332 (2,87 Å), respectivamente. A interação carbono-hidrogênio é formada entre os átomos C1O e o aminoácido His491 (2,15 Å). A interação π -cátion é observada entre N1H₂ e o aminoácido His331 (4,32 Å). Além disso, é possível observar uma interação π -alquil com a região **ii** do LPR e His361 (5,35 Å); a ponte salina entre N1H₂ e C9OO⁻ do LPR e Glu362 (2,71 Å) e Lys489 (1,70 Å), respectivamente; e o íon zinco (Zn⁺²) é observado interagindo com a ponte salina (2,6 Å) e o metal-acceptor (2,53 Å) é interagindo com o C3OO⁻ em LPR. Nos modos de interação para o *docking* molecular do LST com o sítio ativo da sACE (veja Fig. 21c-d), apresenta duas ligações de hidrogênio convencionais entre o hidrogênio (C15OH) e o átomos de nitrogênio (N4) do LST e os aminoácidos Asp354 (com distância 1,78 Å) e Lys489 (com distância 2,23 Å), respectivamente. A interação carbono-hidrogênio é formada entre os átomos C15H, C1H₂ e N5 e aminoácidos Glu431 (2,59 Å), Glu262 (2,48 Å e 2,92 Å) e His491 (2,79 Å), respectivamente. A interação cátion π é observada entre N3 e o aminoácido Lys489 (2,77 Å). A interação π -alquila é observada entre C14H₃ e o aminoácido Tyr501 (4,41 Å). Assim, podemos afirmar que o valor da energia total de interação obtida para LST através do método MFCC sugere esta molécula como um potente inibidor de sACE.

A Fig. 22 apresenta uma visão do sítio de ligação da sACE para os ligantes (LPR e LST) destacando os aminoácidos Asp43, Asp140, Trp257, Gln259, Ser260, Glu262, His331, Lys346, Asp354, Thr356 e Asp393, importantes na interação ligante-sACE e sua distribuição dentro do sítio da enzima. Esses resultados reafirma a possibilidade do LST se ligar no mesmo sítio do LPR para sua atividade como anti-hipertensivo inibidor da sACE.

A Fig. 23 apresenta outra visualização do sítio de ligação da sACE para os ligantes em estudo (LPR e LST). Assim, na Fig. 23(a) e (c) para LPR e LST, respectivamente, na mesma visualização, estão destacados oito aminoácidos do sítio da sACE: Ala332, Ser333, His361, His365, Glu389, Arg500, Phe501 e Phe505. Na Fig. 23(b) e (d) estão os aminoácidos Glu431, Lys432, Lys489, Phe490 e His491, importantes na interação ligante-sACE e sua distribuição dentro do sítio da enzima. Esses resultados reafirma a possibilidade do LST se ligar no mesmo sítio do LPR para sua atividade como anti-hipertensivo inibidor da sACE.

Através da estratégia MFCC e do uso do formalismo DFT foi possível descrever o sítio de ligação dos anti-hipertensivos LPR e LST na enzima sACE.

Figura 21 – Representação da interação tridimensional entre a pose do ligante cristalográfica de (a) LPR-sACE e a melhor previsão de pose de ligante de *docking* (c) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloro em verde e íon zinco em cinza). Também são mostrados o diagrama de interação bidimensional do ligante da pose do ligante, com (b) LPR e (d) LST apresentando diferentes interações com os resíduos da sACE obtidos a partir da cristalografia (LPR) e a melhor previsão de pose de *docking* de LST na sACE. Os resíduos destacados. A figura foi obtida usando o software Discovery Studio Visualizer (ambiente de modelagem de estúdio Discovery, Versão 19.1; <http://www.accelrys.com> (BIOVIA, 2019)).

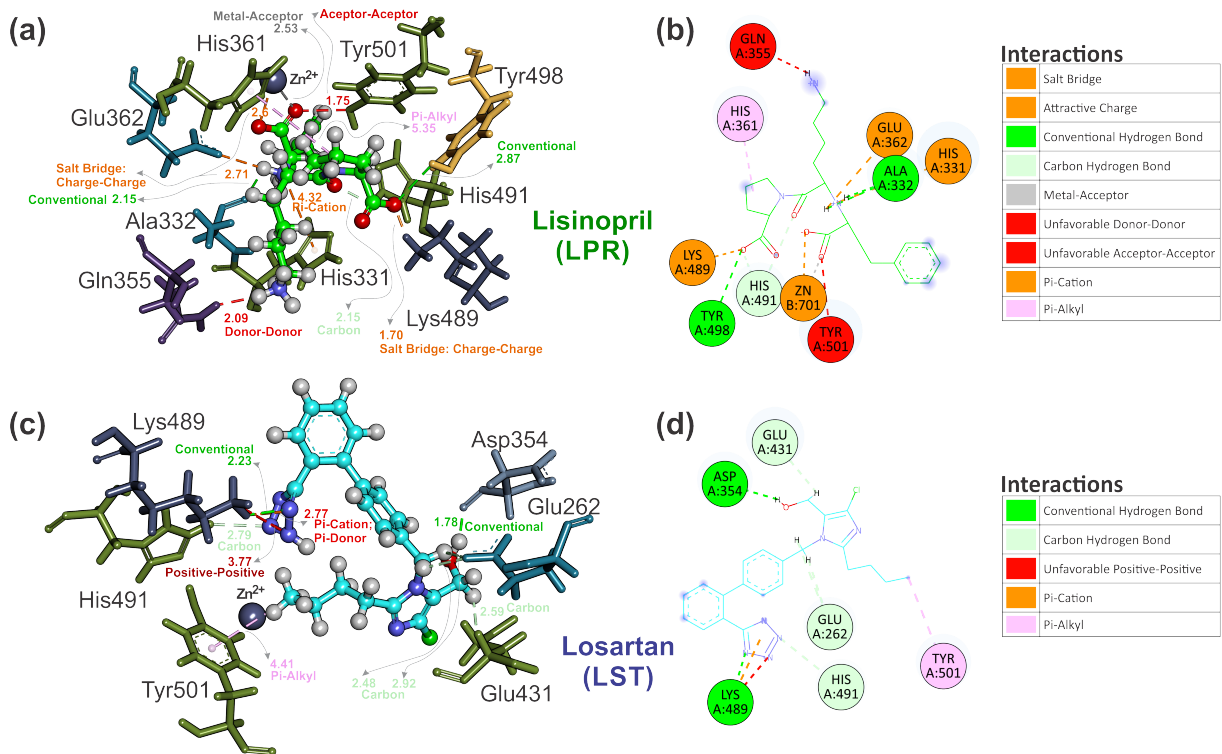


Figura 22 – Pose do ligante cristalográfica de (a) LPR-sACE e a melhor previsão de pose de ligante de *docking* (c) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Destaque aos aminoácidos dentro do sítio de ligação da sACE para o (b) LPR e (d) LST. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).

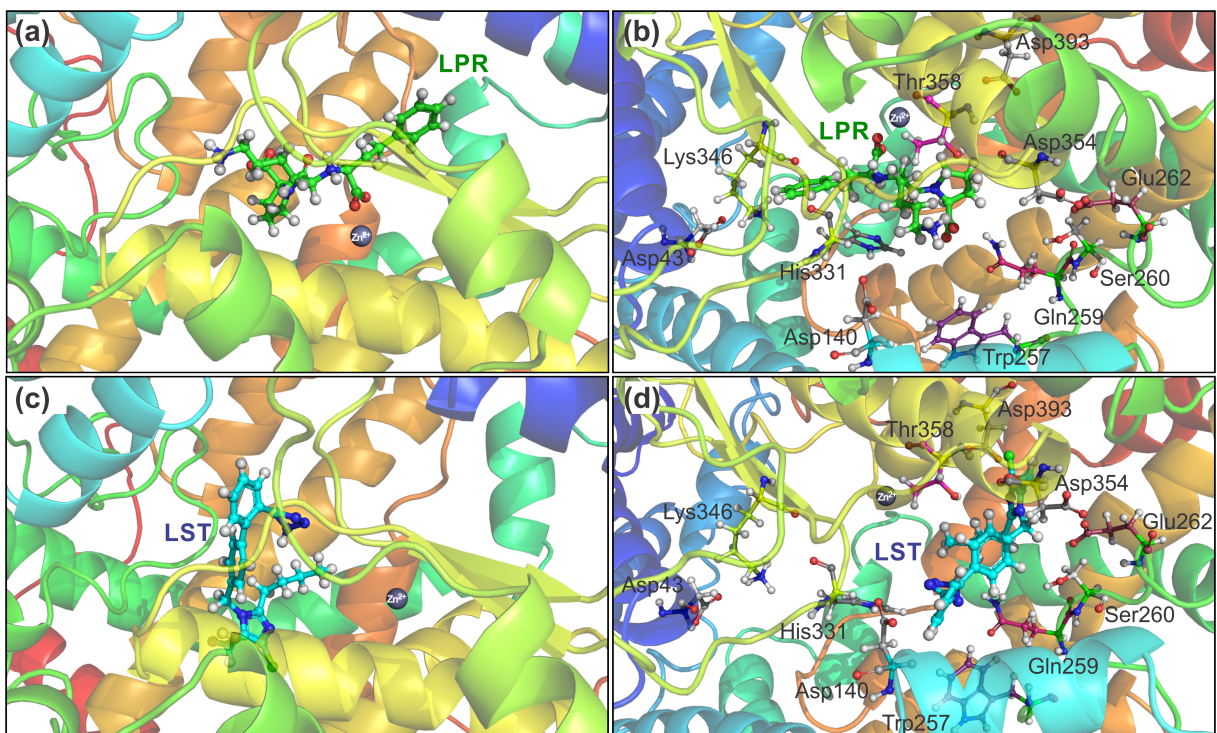
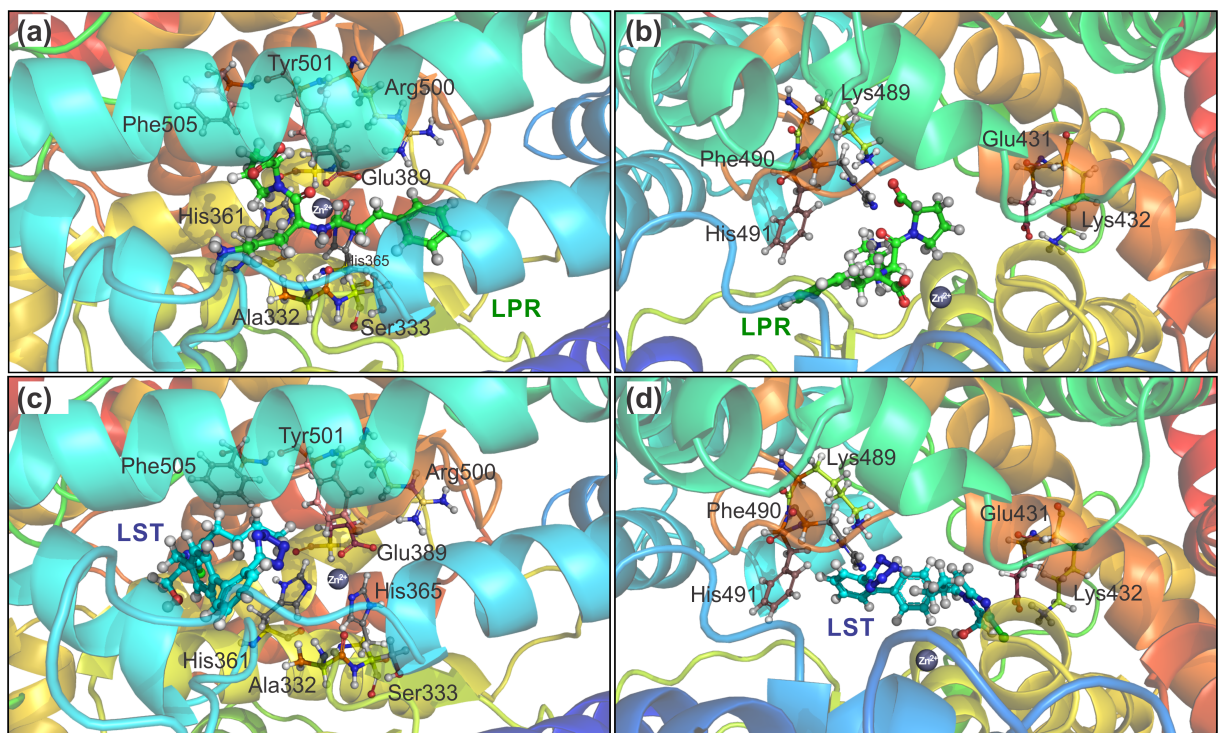


Figura 23 – Sítio de ligação do (a-b) LPR-sACE e (c-d) LST-sACE. O ligante representado em formato de bola e bastão com carbonos de cada um dos ligantes coloridos de forma diferente (LPR em verde e LST em azul claro) e os átomos não carbono são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). Destaque aos aminoácidos dentro do sítio de ligação da sACE para o (b) LPR e (d) LST. A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS: LPR E LST-SACE

A hipertensão é uma das maiores causas de morte prematura em todo o mundo e esse problema tende a se agravar nos próximos anos. Essa doença crônica pode ser tratada com vários agentes, incluindo betabloqueadores, diuréticos e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE), além de mudanças no estilo de vida que incluem intervenções dietéticas.

O sistema renina-angiotensina aldosterona (RAAS) tem se mostrado um elemento chave na regulação da pressão arterial, assim, o estudo do mecanismo de ação dos anti-hipertensivos sobre outros alvos presentes neste sistema pode ajudar a elucidar a eficiência e os efeitos colaterais de alguns medicamentos que atuam no RAAS.

A partir de evidências experimentais de que o losartan pode bloquear a sACE obtidas por Guimarães et al. (GUIMARÃES *et al.*, 2011), usamos a experimentação *in silico* para mostrar detalhes em nível molecular da interação entre o losartan e essa enzima, para isso, usamos dados cristalográficos do complexo lisinopril-sACE, depositados com PDB ID 2C6N (CORRADI *et al.*, 2006). Assim, na presente tese, foi explorado pela primeira vez, através de bioquímica quântica, a interação do anti-hipertensivo losartan (LST) na sACE.

Para entender como o LST inibe a sACE, primeiro determinamos a conformação mais provável do losartan na enzima sACE por meio de simulações de *docking* que mostraram que a molécula do LST compartilha o mesmo sítio de ligação que o LPR, um já conhecido inibidor da sACE.

Além disso, usando o método MFCC através da teoria do funcional da densidade (DFT/LDA), as energias de interação do LPR e do LST com a sACE foram estimadas em aproximadamente $-304 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-289 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Este resultado sugere que o LST tem uma afinidade para o sítio de ligação da sACE. Além disso, o método MFCC nos permitiu determinar os aminoácidos mais importantes na estabilização de cada ligante dentro do sítio de ligação. Por exemplo, o aminoácido Lys489 é essencial para a estabilização de ambas os anti-hipertensivos, pois faz uma ponte salina de aproximadamente $-55 \text{ kcal mol}^{-1}$ com o LPR e forma uma ligação de hidrogênio com o LST de aproximadamente $-35 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Outro resultado importante que podemos destacar neste trabalho foi apresentado na Figura 20, onde projetamos os valores da energia de interação de cada aminoácido da sACE, $E_i(\text{L-A}_i)$, com os ligantes (LPR E LST) na superfície da enzima. O corte feito no sítio de ligação da sACE mostra como a estrutura tridimensional de uma droga pode interagir de forma diferente com o alvo. Este mapa de interação pode ser feito em diferentes níveis do sítio de ligação da

enzima, o que pode fornecer informações importantes para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

As técnicas de bioquímica quântica utilizadas neste trabalho contribuem para explicar e desvendar novos mecanismos de ação do losartan que já é amplamente utilizados na medicina atualmente. Além disso, o presente trabalho reforça o papel das simulações computacionais em nível quântico como uma ferramenta valiosa para o entendimento e desenvolvimento de novos fármacos. Para conciliar a produção de medicamentos mais eficientes e a necessidade de diminuir seu custo de desenvolvimento, o uso de simulações computacionais relativamente baratas é bastante promissor.

6 MODELAGEM DE BIOMACROMOLÉCULAS: UM ESTUDO SOBRE A "CONSTANTE" DIELÉTRICA

Na terceira parte desta tese vamos avaliar como os efeitos da constante dielétrica podem ser modelados a partir da informação estrutural obtida de dados cristalográficos de biomacromoléculas. Assim, no presente estudo, será avaliada a interação da minociclina (minoTc) com a enzima PLA2. Desta forma, o papel central do presente estudo está em modelar a constante dielétrica de proteínas tendo como base as informações estruturais (como coordenadas atômicas) e obter uma descrição da distribuição da constante dielétrica, agora chamada de função dielétrica, em relação à distribuição espacial dos aminoácidos da proteína. A função dielétrica pode ser usada para:

- análise gráfica de como a distribuição da constante dielétrica por toda a extensão da proteína, inclusive nas regiões identificadas como funcionalmente importantes e sítios ativos;
- a função dielétrica pode ser usada nos cálculos de bioquímica quântica através da estratégia MFCC para uma descrição mais realista das interações ligante-receptor;
- analisar a importância de se utilizar uma constante dielétrica adequada na descrição das energias de interação ligante-proteínas.

6.1 Constante dielétrica

No estudo de bioquímica quântica de proteínas é importante avaliar as interações eletrostáticas pois desempenham um importante papel na determinação da estrutura, estabilidade, afinidade de ligação, propriedades químicas e reatividade biológica de proteínas (PERUTZ, 1978; WARSHEL, 1981; SHARP; HONIG, 1990; SIMONSON, 2003; WARSHEL *et al.*, 2006). Apesar do notável avanço neste campo nas últimas décadas, quantificar as energias eletrostáticas em sistemas compostos por proteínas e seus ligantes ainda não é uma tarefa simples. Proteínas são estruturas complexas, e a dificuldade em modelar os efeitos eletrostáticos aumenta com o tamanho e a configuração da estrutura da proteína (WARSHEL *et al.*, 1984; CHEN; ZHANG, 2006; KUKIĆ; NIELSEN, 2010; GORDON *et al.*, 2012; ZHOU; PANG, 2013; LI *et al.*, 2013).

Como proteínas não são sistemas homogêneos, são formadas por aminoácidos com diferentes características, é importante utilizar uma abordagem eletrostática apropriada que leve em consideração que suas propriedades eletrostáticas são fortemente dependentes da sua composição (cofatores, aminoácidos, ligantes, etc.), conformação espacial e, também, do meio

em que está inserida. Para o cálculo de energias eletrostáticas envolvendo proteínas é importante considerar alguns aspectos como, por exemplo, as diferenças entre as propriedades dielétricas dos resíduos de aminoácidos que compõem a proteína, as cavidades e a configuração da interface proteína-solvente (WARSHEL; PAPAZYAN, 1998; SCHUTZ; WARSHEL, 2001).

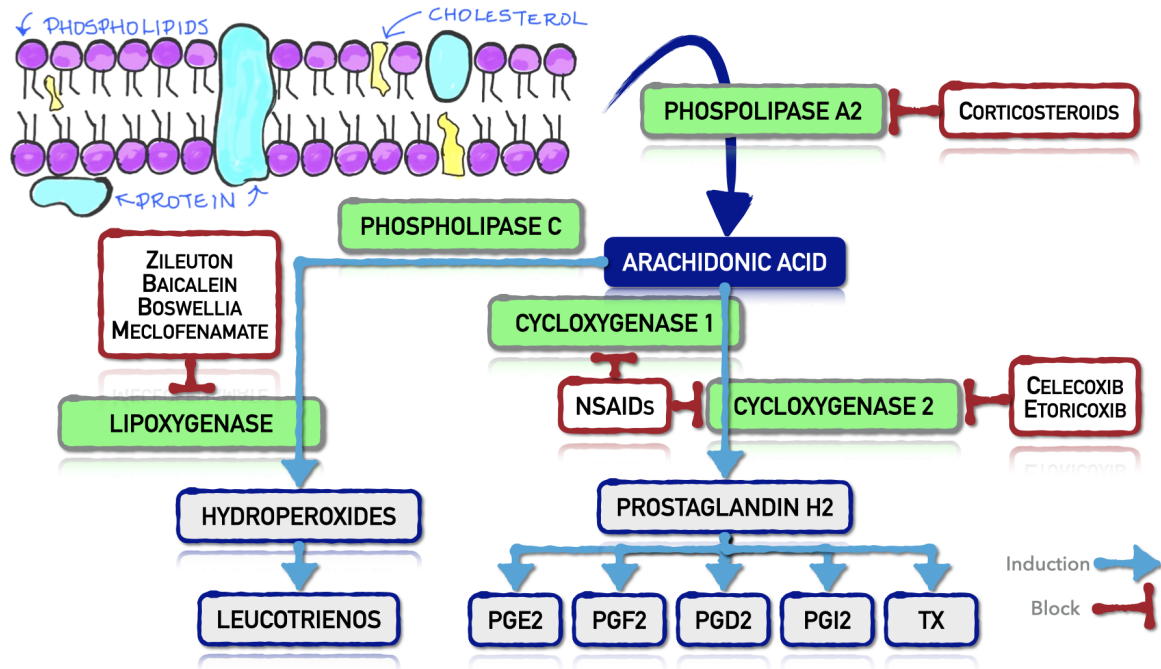
As propriedades dielétricas de proteínas têm sido estudadas recentemente na última década (HUANG *et al.*, 2008) ainda temos muito a se fazer com relação ao problema macroscópico da "constante" dielétrica pois as propriedades dielétricas microscópicas são heterogêneas (ADHIKARI *et al.*, 2021) e a palavra constante se torna problemática no nível molecular (WARSHEL *et al.*, 2006). A constante dielétrica da proteína agora deve ser tratada como uma função dielétrica dependente da posição na proteína (LI *et al.*, 2013). A dificuldade em modelar a constante dielétrica de biomacromoléculas complexas está diretamente relacionada à extensa heterogeneidade molecular das proteínas.

O conhecimento detalhado de como a "constante" dielétrica varia com a distribuição espacial dos aminoácidos da proteína é importante para descrição das interações eletrostáticas de longo alcance em estudos de associação ligante e substrato (biomacromolécula) e, também, a afinidade de ligação, por exemplo. Assim, para estudo de modelagem da função dielétrica de proteínas foi escolhida a enzima fosfolipase A2 (PLA2), que será descrita em mais detalhes a seguir.

6.2 Fosfolipase A2 (PLA2)

A superfamília das fosfolipases A2 (PLA2) consiste de vários grupos de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster sn-1 em uma grande variedade de fosfolipídios. Os produtos desta reação, um ácido graxo livre e um fosfolipídio, possuem uma importante diversidade de papéis fisiológicos. Há cinco tipos principais de PLA2: as secretadas sPLA2, a citosólica cPLA2, a independente de Ca^{2+} iPLA2, as acetilhidrolases PAF e as lisossomais (BURKE; DENNIS, 2009). As PLA2 ocorrem abundantemente em venenos de serpente (TEIXEIRA *et al.*, 2003), que são uma mistura complexa de proteínas enzimáticas e tóxicas incluindo miotoxinas, metaloproteases hemorrágicas e outras enzimas proteolíticas, componentes coagulantes, neurotoxinas, citotoxinas e cardiotoxinas, entre outras. Intensa inflamação local é uma característica associada ao envenenamento devido à presença de PLA2 no veneno de serpente. A PLA2 é capaz também de induzir vários efeitos farmacológicos como edema, hemorragia e agregação plaquetária, assim como efeitos de neurotoxicidade, anticoagulação e miotoxidade (GUTIÉRREZ, 2002).

Figura 24 – Caminho da inflamação.



A ação da PLA2 na membrana de fosfolípidios libera, entre outras moléculas, o ácido araquidônico (AA), que é um precursor dos eicosanóides pró-inflamatórios. Usualmente, o ácido araquidônico liberado é convertido em prostaglandinas e leucotrienos pelas cicloxigenases (COX1/COX2) e pela 5-lipoxigenase (5-LO), respectivamente, ver Fig. 24. As drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NAIDs) reduzem a conversão de AA em prostaglandinas, inibindo COX1/COX2, mas não a 5-LO, que em níveis elevados está diretamente ligado a efeitos adversos no trato intestinal e renal, como observado com pacientes que usam drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs, Non-steroidal anti-inflammatory drugs). Uma droga anti-inflamatória eficiente deve seletivamente inibir PLA2 através não somente da ação na formação das prostaglandinas mas também nos leucotrienos e seus efeitos colaterais. No desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias, a capacidade de inibição da PLA2 tem sido testada por muitas substâncias químicas; compostos polifenólicos, como os flavonoides, já mostraram apresentar grande capacidade de inibição da PLA2, assim como o ácido rosmarínico e a vitamina E (SILVA *et al.*, 2009).

Nas últimas duas décadas, tem se tornado disponível informações estruturais das PLA2s obtidas a partir de difração de raios-X e estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) (ARNI; WARD, 1996), que através da relação estrutura-atividade proporcionam uma

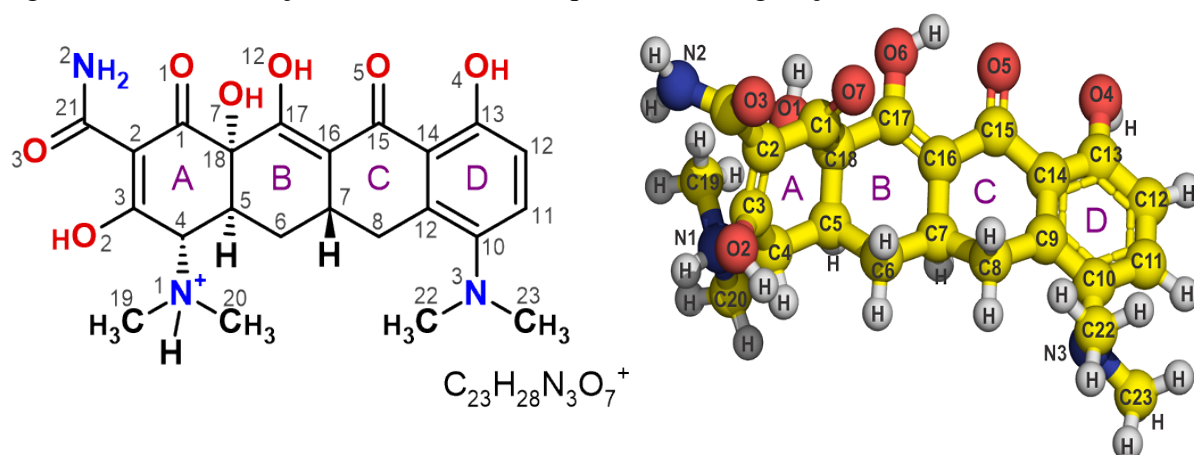
compreensão valiosa de sua bioquímica. Muitas estruturas cristalinas diferentes existem para o grupo IA (GIA) das PLA2 de veneno de serpente (FREMONT *et al.*, 1993; SCOTT *et al.*, 1990; SEGELKE *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 1990). Utilizando-se de dados tridimensionais de alta resolução das enzimas PLA2 existentes e de seus complexos com diferentes ligantes, modelos detalhados estruturais foram desenvolvidos para se compreender e racionalizar a interação da PLA2 com flavonoides (LÄTTIG *et al.*, 2007). A estrutura cristalina da PLA2 complexada com produtos de hidrólise do fator de ativação de plaquetas foi resolvida a 1,55 Å (PAN *et al.*, 2002). Recentemente, a base estrutural para a inibição da PLA2 através das tetraciclinas lipofílicas minociclina (minoTc) e doxíciclina foram elucidadas. Através da análise de raios-X de estruturas cristalinas com resolução de 1,65 Å foi obtida a estrutura da minoTc complexada com PLA2 do veneno da serpente indiana *N. naja naja* (DALM *et al.*, 2010).

Simulações computacionais baseadas em *docking* e dinâmica molecular, principalmente, e em cálculos semi-clássicos e quânticos na teoria do funcional da densidade (DFT) têm sido realizados para compreensão aprofundada do sítio de ligação de fármacos a enzima PLA2 (SILVA *et al.*, 2009; LÄTTIG *et al.*, 2007). Estes experimentos *in silico* contribuem de forma marcante para a elucidação detalhada do papel individual de cada resíduo do sítio e dos átomos dos fármacos na relação estrutura-atividade, proporcionando informações valiosas para o desenvolvimento de inibidores mais potentes e específicos, por exemplo. Uma excelente oportunidade para a simulação computacional seria o estudo da interação entre os monômeros da PLA2, algo ainda não contemplado na literatura, mas que não será o foco dessa tese.

6.3 Minociclina (minoTc)

Minociclina (minoTc), fórmula molecular $C_{23}H_{27}N_3O_7$ (DrugBank DB01017, PubChem CID 54675783) é um fármaco análogo das tetraciclinas que apresenta um grupo dimetilamino na posição 4 (ver Fig. 25) é utilizada para o tratamento de uma grande número de infecções do corpo, um antibiótico indicado no tratamento contra bactérias tanto gram-negativas quanto gram-positivas. A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética que foi descoberta em 1947 por Benjamin M. Duggar a qual faz parte da segunda geração de tetraciclinas, sendo mais eficaz que as gerações anteriores. Dalm et al. (DALM *et al.*, 2010) foram os primeiros a descrever a interação da minoTc na enzima PLA2.

Figura 25 – Conformação 2D da minoTc (esquerda) e configuração 3D (direita)



7 FARMACOLOGIA MOLECULAR QUÂNTICA: MINOTC-PLA2

É importante compreender e estimar as interações moleculares envolvendo proteínas, polipeptídeos e moléculas com atividade biológica, assim, tem crescido o interesse em determinar as propriedades dielétricas de proteínas.

Para determinação da função dielétrica é necessário o conhecimento da composição estrutural, configuração espacial, tamanho e natureza da proteína em estudo. Para no presente estudo de modelagem da função dielétrica em proteínas vamos fazer uso da estrutura obtida por difração de raios-X da enzima PLA2 co-cristalizada com o minociclina (minoTc), PDB 2WQ5, conforme metodologia descrita a seguir.

7.1 Dados estruturais

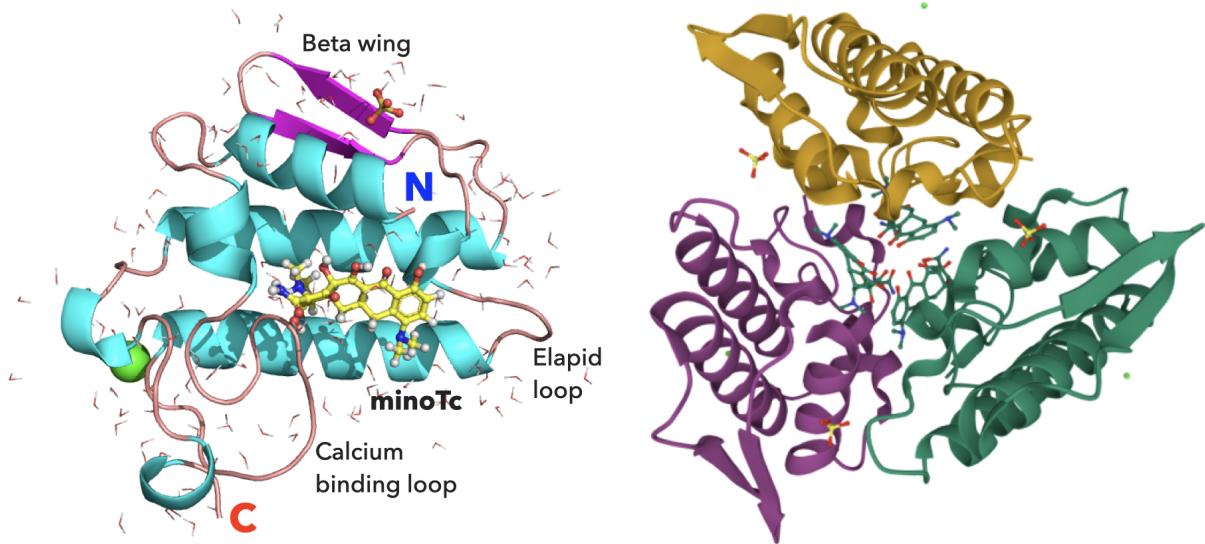
Todas as simulações computacionais neste trabalho fizeram uso da estrutura cristalizada da fosfolipase A2 (PLA2) da serpente indiana *N. naja naja* complexada com a tetraciclina lipofílica minociclina (minoTc), determinada por difração de raios-X por Dalm et al. (DALM *et al.*, 2010) (ver Fig. 26). A estrutura 3D foi baixada do banco de dados PDB (<http://www.rcsb.org>), PDB ID 2WQ5, em alta resolução de 1.65 Å e pH 7.4. Os hidrogênios foram adicionados à estrutura e então submetidos à otimização da geometria clássica com o campo de força CVFF (do inglês, Consistent Valence Forcefield) (DAUBER-OSGUTHORPE *et al.*, 1988) com as posições atômicas dos átomos não-hidrogênio mantidas fixas. A estrutura primária da PLA2 é composta por 119 resíduos de aminoácidos, que configuram uma estrutura terciária com três α -hélices, dois seguimentos helicoidais curtos, uma folha- β antiparalela de fita dupla (resíduos 75-84), sete pontes dissulfeto e uma alça de ligação ao Ca^{+2} (resíduos 28-33), ver Fig. 26 esquerda. Além disso, revela uma estrutura quaternária composta por três unidades monoméricas, cada uma co-cristalizada com uma molécula minoTc ver Fig. 26 direita.

Depois de preparada a enzima PLA2 co-cristalizada com a minociclina (minoTc) os dados foram usados como entrada para o cálculo da energia de interação através da estratégia MFCC.

7.2 Cálculos DFT

Aqui, os cálculos DFT para a obtenção da energia de interação seguiram os mesmos parâmetros apresentados na seção 3.3 do capítulo 3. Entretanto, o solvente foi simulado utilizando

Figura 26 – Visão geral do trîmero (direita) e monômero (esquerda) da PLA2 co-cristalizada com o a minociclina (minoTc), uma tetraciclina lipofílica, minoTc-PLA2, obtida por difração de raios-X, PDB 2WQ5 (DALM *et al.*, 2010). No lado esquerdo a minoTc (carbono amarelo), ilustrando os elementos da estrutura secundária da PLA2. No lado direito temos cada monômero da PLA2 foi colorido diferente e a minoTc destacada em cada monômero (carbono verde) A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



o método COSMO, que é baseado no modelo contínuo de solvatação para os valores de constante dielétrica: D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e DF ($(\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7).

7.3 Estratégia MFCC: minoTc-PLA2

A estratégia MFCC aqui utilizada foi similar a apresentada na seção 3.4 do capítulo 3. Assim, simulações dentro do formalismo da teoria do funcional de densidade (DFT) usando a aproximação de densidade local (LDA) para o funcional de troca e correlação (DFT/LDA) foram realizadas usando o programa de modelagem Biovia Materials Studio DMol³ (SYSTÈMES, 2017; DELLEY, 1990; ORTMANN *et al.*, 2006; DELLEY, 2000). Um conjunto de base de dupla polarização numérica (DNP) foi escolhido para expandir os orbitais eletrônicos de Kohn-Sham considerando todos os elétrons explicitamente e com spin irrestrito. O raio de corte orbital para este conjunto de base foi definido para 3,7 Å e o limite de convergência de campo auto-consistente foi ajustado para $10^{-6} E_h$. As posições atômicas dos hidrogênios do sistema minoTc-PLA2 foram otimizados classicamente com o campo de força CVFF (do

inglês, Consistent Valence Forcefield) (DAUBER-OSGUTHORPE *et al.*, 1988), com átomos não hidrogênio mantidos fixos.

Tabela 4 – Ligações dissulfeto presentes na PLA2 (PDB 2WQ5).

Ligação dissulfeto	Aminoácido $S_i - S_j$
1	Cys11–Cys71
2	Cys26–Cys118
3	Cys28–Cys44
4	Cys43–Cys99
5	Cys50–Cys92
6	Cys60–Cys85
7	Cys78–Cys90

Portanto, a energia total de interação através da estratégia MFCC do complexo minoTc-PLA2 foi obtida pela equação (7.1):

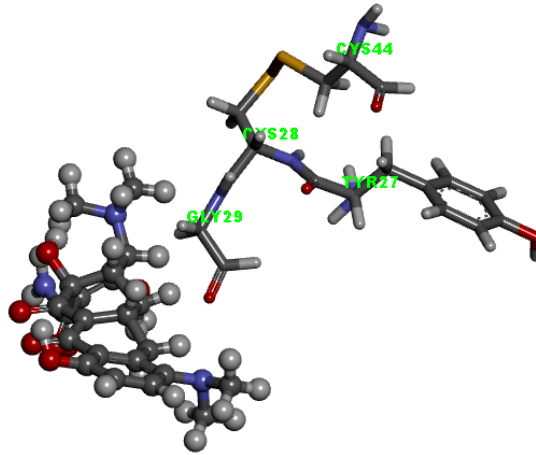
$$E(\text{minoTc-PLA2}) = \sum_{n=1}^{119} E_i(\text{minoTc-}A_i) \quad (7.1)$$

que corresponde à soma de todas as energias de interação individuais (E_i) de todos os 119 aminoácidos da enzima PLA2 (PDB 2WQ5) (DALM *et al.*, 2010) com a tetraciclina minociclina (minoTc). Assim, a energia total de interação da minoTc no sítio da enzima PLA2 é aproximadamente igual à soma das energias individuais calculadas dos resíduos de aminoácidos da enzima. A energia de interação entre a minoTc e o aminoácido A_i da PLA2, é dada por $E_i(\text{minoTc-}A_i)$:

$$E_i(\text{minoTc-}A_i) = E_A(\text{minoTc} + A_{i-1}A_iA_{i+1}) - E_B(A_{i-1}A_iA_{i+1}) - E_C(\text{minoTc} + A_{i-1} + A_{i+1}) + E_D(A_{i-1} + A_{i+1}) \quad (7.2)$$

aqui os *caps* A_{i-1} e A_{i+1} são os primeiros aminoácidos vizinhos em ambos os lados do aminoácido A_i com a ligação peptídica quebrada completada com um átomo de hidrogênio. No lado direito da eq. 7.2, E_A é a energia total do sistema formado pela molécula minoTc, o aminoácido (A_i) e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) do A_i ; o termo E_B é a energia total do aminoácido (A_i) e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) de A_i ; E_C é a energia total do sistema formado pela molécula minoTc e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) do A_i ; finalmente, E_D é a energia total do sistema formado apenas pelos primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) de A_i .

Figura 27 – Visão esquemática mostrando a estratégia MFCC para ligação dissulfeto.



Devido à presença de sete ligações dissulfeto na configuração estrutural da enzima PLA2, a estratégia MFCC utilizada foi modificada para incluir essas ligações no cálculo da energia de interação. Assim, quando o aminoácido A_i , que agora vamos chamar S_i faz uma ligação dissulfeto com outro aminoácido (S_j) vizinho, esse será considerado como *cap* conforme apresentado na Fig. 27. Então, desta forma, a energia de interação entre a minoTc e o aminoácido S_i da PLA2 que faz ponte dissulfeto com outro aminoácido S_j , é dada por $E_i(\text{minoTc}-S_i)$:

$$E_i(\text{minoTc}-S_i) = E_A(\text{minoTc} + A_{i-1}S_iA_{i+1}S_j) - E_B(A_{i-1}S_iA_{i+1}S_j) - E_C(\text{minoTc} + A_{i-1} + A_{i+1} + S_j) + E_D(A_{i-1} + A_{i+1} + S_j) \quad (7.3)$$

aqui os *caps* A_{i-1} e A_{i+1} continuam sendo os primeiros aminoácidos vizinhos em ambos os lados do aminoácido S_i (que faz ligação dissulfeto) com a ligação peptídica quebrada completada com um átomo de hidrogênio. No lado direito da eq. 7.3, E_A é a energia total do sistema formado pela molécula minoTc, o aminoácido (S_i) e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} e A_{i+1}) e o aminoácido vizinho que faz a ligação dissulfeto (S_j) do S_i ; o termo E_B é a energia total do aminoácido (S_i) e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} , A_{i+1} e S_j) de S_i ; E_C é a energia total do sistema formado pela molécula minoTc e os primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} , A_{i+1} e S_j) do A_i ; finalmente, E_D é a energia total do sistema formado apenas pelos primeiros aminoácidos vizinhos (A_{i-1} , A_{i+1} e S_j) de S_i . O mesmo tratamento é utilizado quando o aminoácido de interesse é S_j , mas agora S_i se torna *cap*.

7.4 Constante dielétrica não-homogênea (função dielétrica)

Li et al. (2013) (LI *et al.*, 2013), considerando a dependência espacial da "constante" dielétrica das biomacromoléculas e da modelagem eletrostática contínua, propuseram uma função dielétrica para uma macromolécula com N átomos, dada por

$$\varepsilon(r) = \rho_{mol} \cdot \varepsilon_{in} + (1 - \rho_{mol}) \cdot \varepsilon_{out} \quad (7.4)$$

uma função linear, onde $\varepsilon(r)$ do lado esquerdo da equação é a função distribuição dielétrica, ε_{in} é o valor dielétrico de referência quando a densidade é 1, ε_{out} é o valor dielétrico de referência para a fase aquosa e ρ_{mol} é a densidade molecular na posição r , dada por

$$\rho_{mol}(r) = 1 - \prod_i [1 - \rho_i(r)] \quad (7.5)$$

onde $\rho_i(r)$ é a densidade de um único átomo i na posição r , que pode ser obtida pela distribuição Gaussiana

$$\rho_i(r) = \exp \left[-\frac{r_i^2}{\sigma^2 \cdot R_i^2} \right] \quad (7.6)$$

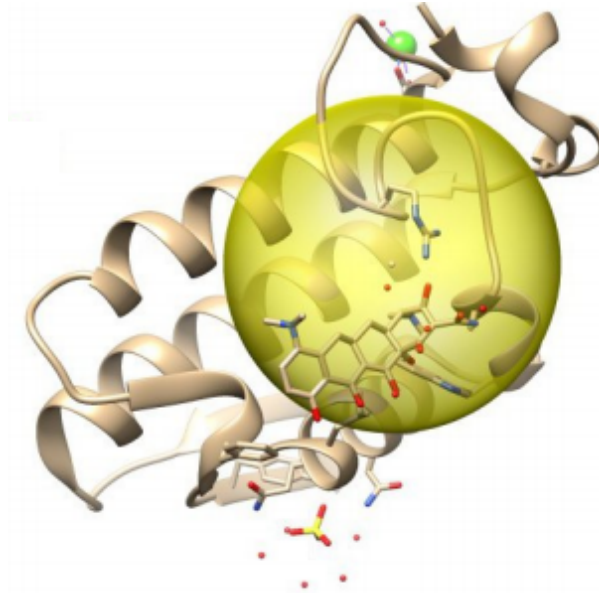
e, assim, temos que r_i é a distância entre o centro do átomo i e a posição r , R_i é o raio de van der Waals (vdW) do átomo i e σ^2 é a variância da distribuição gaussiana.

Assim, obtida a função dielétrica dada pela Eq. 7.4, podemos obter um valor de "constante" dielétrica para cada sistema a ser estudado para uso na estratégia MFCC, ou seja, vamos obter uma constante dielétrica média para cada interação minoTc e aminoácido A_i , assim, matematicamente, a constante dielétrica, $\varepsilon_{minoTc-A_i}$, é dada por

$$\bar{\varepsilon}_{minoTc-A_i} = \frac{1}{V_{minoTc-A_i}} \int_{V_{minoTc-A_i}} \varepsilon_{mol}(r) dv_{minoTc-A_i} \quad (7.7)$$

onde $V_{minoTc-A_i}$ é o volume da esfera que contém o ligante, minoTc, e o aminoácido A_i e ε_{mol} é o valor da "constante" dielétrica na posição r . A Fig. 28 é mostrada a esfera que delimita a região de interesse para a interação do aminoácido Asp da PLA2 e a minoTc. Entretanto, no cálculo da função dielétrica, através da modelagem eletrostática implícita, a função dielétrica considera também a contribuição do solvente, bem como a contribuição de todos os átomos do complexo de interesse. Assim foram obtidos para todas as interações minoTc- A_i da enzima PLA2 a constante dielétrica a partir da eq. 7.7. Os resultados foram usados para obtenção da energia de interação através da estratégia MFCC no lugar da constante dielétrica, utilizamos um valor para cada interação em estudo.

Figura 28 – Ilustração da região de interesse onde será calculado o valor médio da constante dielétrica utilizada para obtenção da energia de interação, usando como exemplo o aminoácido Asp da PLA2 e a minoTc (PDB 2WQ5). A figura foi desenhada usando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015) (PyMOL Molecular Graphics System; <http://www.pymol.org>).



No presente estudo avaliamos o comportamento da energia de interação total [Eq. 7.1] bem como a energia de interação para cada aminoácido i [Eq. 7.2] da PLA2 com a minociclina (minoTc) para os valores de constante dielétrica: D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7). Desta forma, o solvente foi simulado utilizando o método COSMO, que é baseado no modelo contínuo de solvatação.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da estrutura cristalina da fosfolipase A2 (PLA2) da serpente indiana *N. naja naja* co-cristalizada com a tetraciclina lipofílica minociclina (minoTc) (DALM *et al.*, 2010) foi realizado estudo para compreender as interações intermoleculares envolvidas no complexo minoTc-PLA2. Adicionalmente, avaliar como o perfil de energia de interação minoTc-PLA2 é influenciado com a variação da constante dielétrica homogênea e função dielétrica não-homogênea. No presente capítulo são apresentados os resultados do estudo da interação da minoTc com a enzima PLA2.

8.1 Constante dielétrica não-homogênea

Assim, a partir dos dados estruturais do sistema minTc-PLA2 obtivemos a função dielétrica não-homogênea, $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$, dada pela Eq. 7.7, para a interação minoTc aminoácido de interesse A_i da PLA2. A Fig. 29, apresenta um histograma com a frequência relativa dos valores de $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$ que foi obtida depois que a função dielétrica de todas as interações foram calculadas a partir da Eq. 7.7 e estão apresentados na Tab. 10 do Apêndice e na Tab. 5. Entretanto, na Tab. 5, estão destacados os resultados para os aminoácidos com pelo menos um átomo distante até 8.0 Å da minoTc. A partir destes resultados, pode-se verificar que os valores obtidos da função dielétrica ($\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$) valor mínimo igual a 21, máximo igual a 57 e valor médio igual a 32.

8.2 Superfície da função dielétrica não-homogênea para o sistema minoTc- A_i ($\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$)

Assim, a partir dos resultados obtidos para a função dielétrica, $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$, Eq. 7.7 foi possível projetar uma superfície na enzima PLA2 com os respectivos valores para o sistema formado por cada aminoácido A_i com a minoTc.

Na Fig. 30 é apresentada a projeção de $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-A}_i}$, destacando o sítio de ligação da minoTc, codificado por cores e mapeado na superfície molecular da enzima, de acordo com a barra de escala. As funções dielétricas calculadas para os sistemas minoTc- A_i variam entre um valor mínimo de 21 (lilás) e um máximo de 57 (vermelho). Assim, pode-se observar na parte superior da imagem a Lys115 ($r = 13.38$ Å) com a superfície colorida em vermelho, é o aminoácido que apresenta maior valor de constante dielétrica onde $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-Lys115}} = 56.70$. A Fig. 31 apresenta a superfície em três posições com um corte transversal para evidenciar o sítio de ligação da PLA2 e mostra através da diferença de cores a distribuição dos valores de função

Figura 29 – Histograma (eixo esquerdo), frequência acumulada (eixo direito) e gráfico de caixa de todos os valores dielétricos obtidos para o sistema onde os triângulos delimitam o intervalo mínimo-máximo, as barras marcam o intervalo 10-90%, a linha representa a mediana e o quadrado, uma média dos valores definidos.

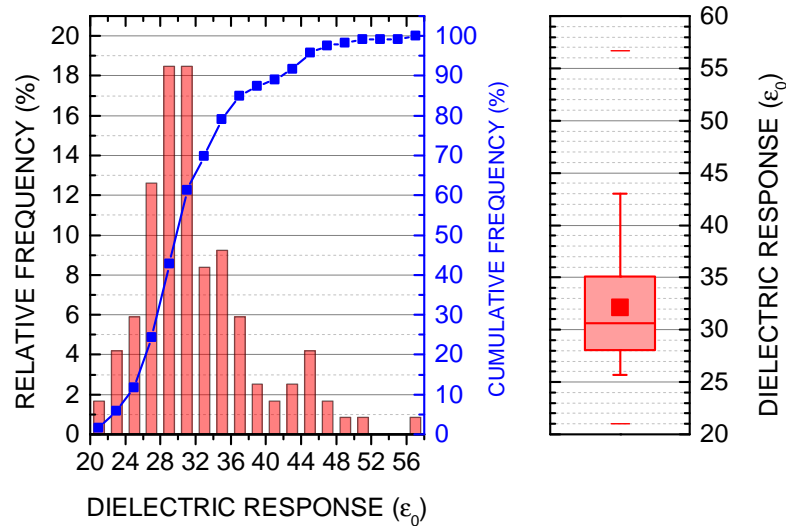
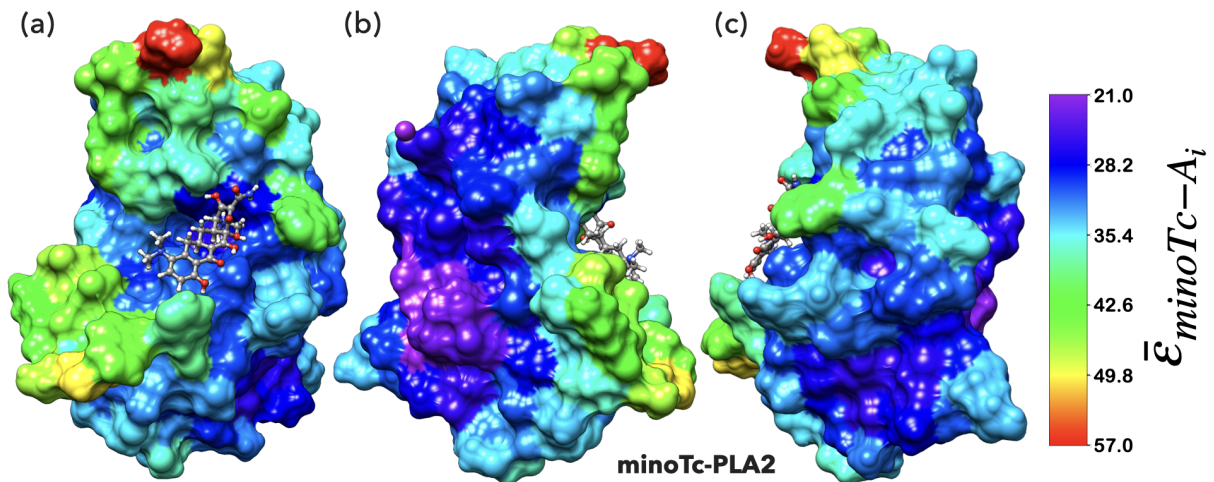


Tabela 5 – Relação dos valores da função dielétrica não-homogênea para os aminoácidos A_i com pelo menos um átomo em $r \leq 8.0$ Å. A_i é o aminoácidos de interesse, r (Å) é a distância do aminoácido i em relação a minoTc e $\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$ é a função dielétrica não-homogênea obtida através da Eq. 7.7.

A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$	A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$	A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}_{\text{minotTc-}A_i}$
Gly29	1.68	28.25	Trp19	4.10	41.17	Asn1	6.19	30.26
Trp18	1.81	30.01	Pro62	4.90	31.20	Lys6	6.35	33.66
Ala22	2.00	28.37	Glu55	5.14	44.99	Cys44	6.46	30.80
Arg30	2.27	37.45	Trp61	5.26	44.31	Asn111	6.49	43.52
Phe64	2.35	38.62	Tyr51	5.30	29.41	Tyr110	6.62	35.91
Leu2	2.55	30.30	Phe100	5.51	26.26	Gly31	6.72	39.08
Phe63	2.69	31.05	Tyr24	5.52	29.10	Asp20	6.95	30.82
Asp23	3.34	32.17	Tyr27	5.52	30.05	Lys65	7.04	32.39
Phe5	3.80	28.21	Ile9	5.56	25.92	Tyr3	7.46	34.01
Phe21	3.96	28.41	His47	5.64	29.49	Leu114	7.63	39.07
Cys28	3.97	26.17	Asp48	6.14	32.28	Cys60	7.97	40.97

Figura 30 – As projeções da função dielétrica, $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc}-A_i}$, na PLA2 para cada aminoácido codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala que varia entre 20 (lilás) e 57 (vermelho). (a) a minoTc é destacada na representação bola e bastão, carbono cinza, e os átomos coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio cinza claro). Em (b) e (c) a vista é girada em 45° e 90° ao longo do eixo z, respectivamente, em comparação com (a), mostrando a superfície ao longo da enzima PLA2. A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).



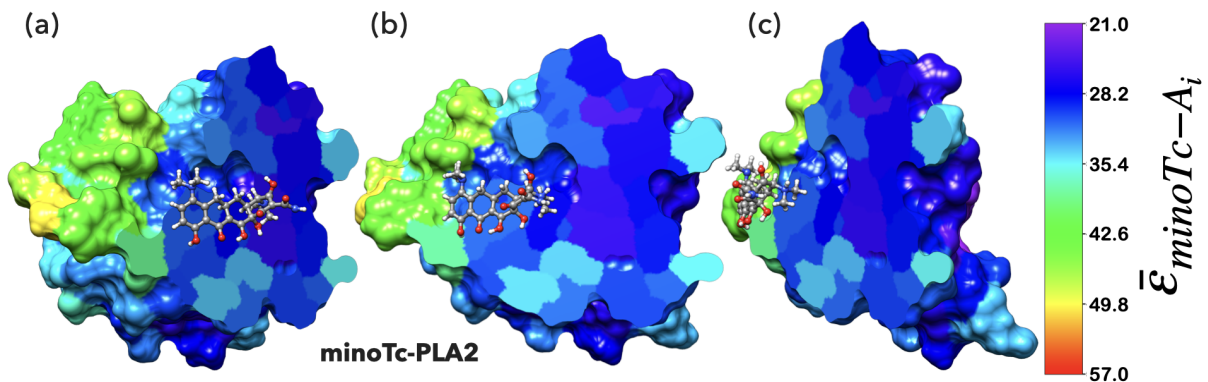
dielétrica ($\bar{\epsilon}_{\text{minoTc}-A_i}$) obtidos para cada sistema formado pelos aminoácidos do sítio de ligação com a minoTc.

No corte transversal (Fig. 31) é observado cores mais próximas do azul dentro do sítio de ligação da minoTc, ou seja, com valores mais próximos de 28.2 para $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc}-A_i}$ quando os aminoácidos estão mais próximos da minoTc. Entretanto, a média dos valores obtidos para $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc}-A_i}$ para os aminoácidos que estão distantes até $r = 8.0 \text{ \AA}$ da minoTc permanece igual 32, que é a mesma média obtida para todos os aminoácidos da enzima PLA2 (ver Fig. 29).

8.3 Energia de interação (MFCC) - minoTc-PLA2

Através da estratégia MFCC e com o uso da metodologia DFT foi possível determinar a energia de interação de cada aminoácido da enzima PLA2 com a minoTc. A aplicação de estratégias de fragmentação permite conhecer várias propriedades do complexo ligante-proteína (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020). A partir dos resultados das energias de interação de cada aminoácido da enzima PLA2 com a minoTc usando constante dielétrica homogênea [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$),

Figura 31 – Corte transversal para evidenciar no sítio de ligação da PLA2 as projeções da função dielétrica, $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc}-A_i}$, na PLA2 para cada aminoácido codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala que varia entre 21 (lilás) e 57 (vermelho). (a) a minoTc é destacada na representação bola e bastão, carbono cinza, e os átomos coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio cinza claro). Em (b) e (c) a vista é girada em 45° e 90° ao longo do eixo z, respectivamente, em comparação com (a), mostrando a superfície ao longo da enzima PLA2. A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).



água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)] foram obtidos os seguintes resultados: (a) a energia total de interação do sistema minoTc-PLA2, bem como o perfil energético da minoTc com a enzima PLA2, representada na Fig. ??; (b) as superfícies de energia de interação para cada constante dielétrica, veja as Figs. 36 a 39; e (c) o painel BIRD (Fig. 35), destacando os principais aminoácidos da interação minoTc-PLA2.

8.3.1 Energia total de interação minoTc-PLA2

A partir dos valores de energia de interação dos aminoácidos individuais da PLA2 com a minoTc obtidos a partir das Eqs. 7.2 ou 7.3 (quando o aminoácido faz uma ligação dissulfeto), é possível obter a energia total de interação do sistema minoTc-PLA2 (Eq. 7.1). Assim, para as distâncias $r = 2, 3, 6, 10, 12, 15$ e 24 \AA as energias de interação dos aminoácidos individuais foram somadas em relação a constante dielétrica utilizada no cálculo, os resultados estão apresentados na Fig. 32.

A energia total de interação é a soma de todas as energias de interação individuais de cada aminoácido da PLA2 com a minoTc. Para todos os valores de r as energias da constante dielétrica D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) foram maiores do que as demais constantes dielétricas, com exceção

Figura 32 – Gráfico em barras da distribuição de energia de interação minoTc-PLA2 por constante dielétrica e por raio. No eixo x temos a constante dielétrica homogênea [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)], já no eixo y temos a distância r do aminoácido relação a minoTc onde é feita a soma das energias de interação.

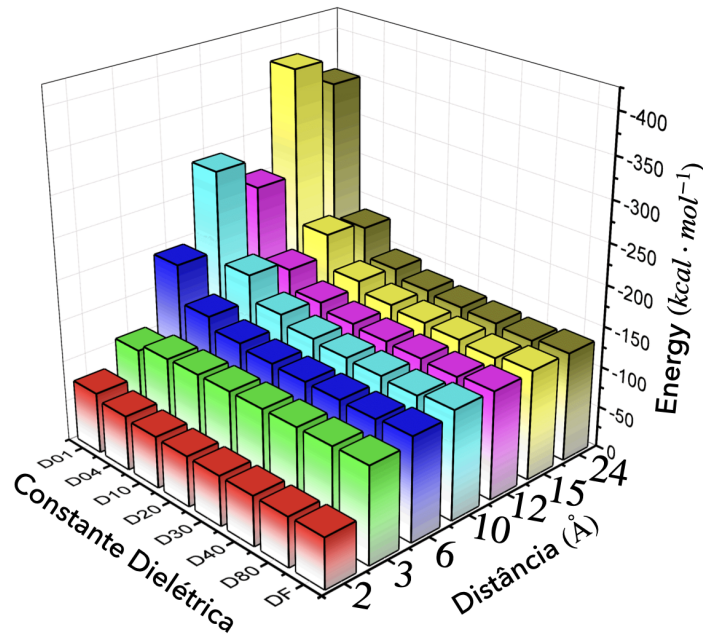


Tabela 6 – Relação dos valores da energia de interação por constante dielétrica [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)] somados nos intervalos de distância $r = 2, 3, 6, 10, 12, 15$ e 24 \AA (proteínas inteira).

$r \text{ (\AA)}$	Energia de interação (kmol^{-1} por constante dielétrica)							
	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
2	-74.3	-66.7	-63.1	-61.4	-60.8	-60.5	-60.0	-60.7
3	-106.6	-115.6	-116.4	-116.3	-116.3	-116.2	-116.2	-116.7
6	-193.2	-147.3	-133.3	-127.9	-126.1	-125.1	-123.7	-125.6
10	-289.8	-179.1	-148.2	-137.1	-133.2	-131.2	-128.2	-132.3
12	-253.8	-167.0	-143.2	-134.9	-132.0	-130.5	-128.3	-131.4
15	-383.6	-193.1	-150.7	-138.4	-134.3	-132.3	-129.2	-133.6
24	-351.7	-184.3	-147.3	-137.0	-133.6	-131.9	-129.3	-133.0

Fonte: Autoria Própria, 2022.

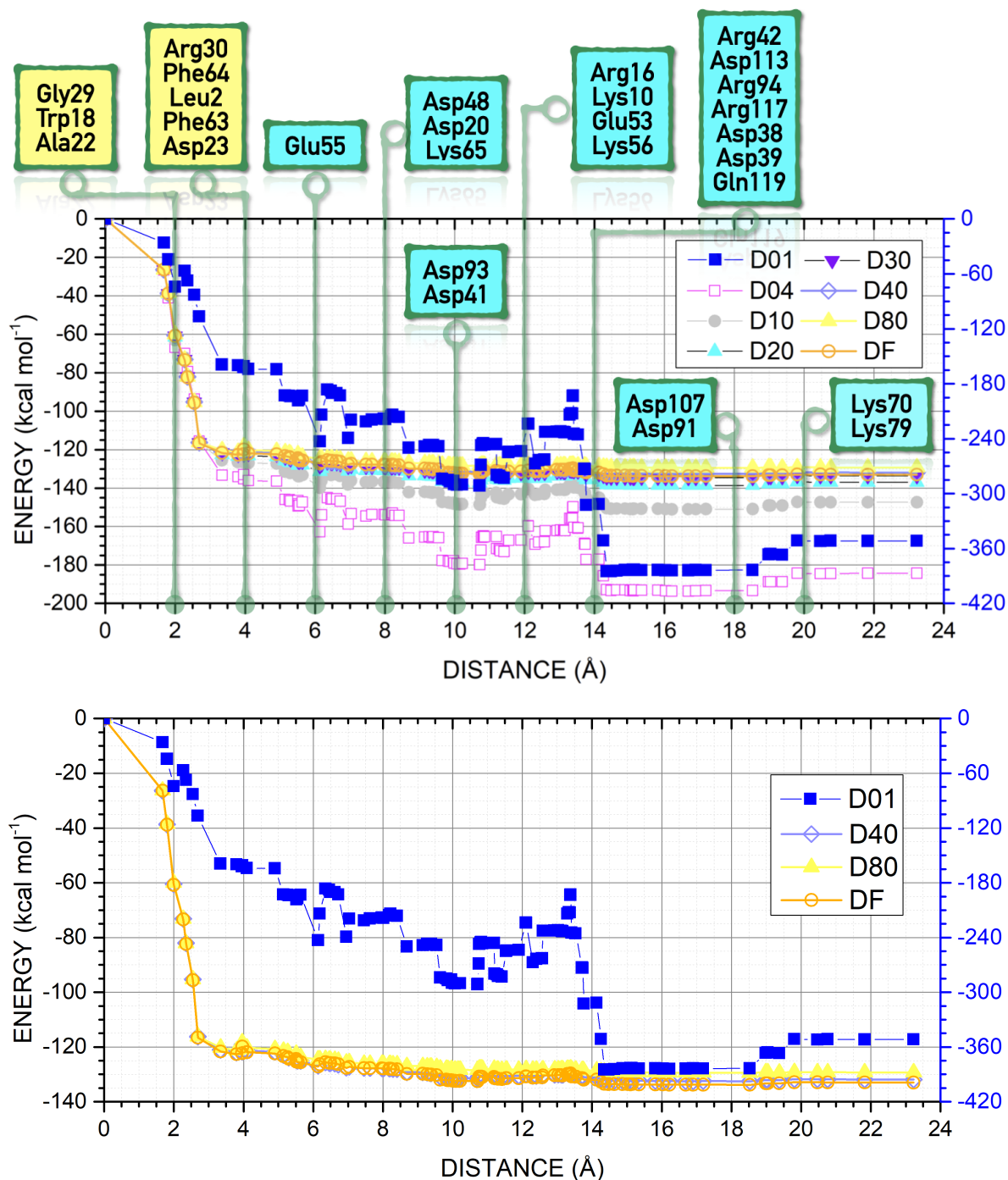
de $r = 3.0 \text{ \AA}$. Além disso, para D01 houve maior variação da energia de interação com o raio. Os valores de energia de interação total seguem a seguinte ordem com relação a constante dielétrica: D01 [$E_{D01}(24 \text{ \AA}) = -351.7 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D04 [$E_{D04}(24 \text{ \AA}) = -183.3 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D10 [$E_{D10}(24 \text{ \AA}) = -147.3 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D20 [$E_{D20}(24 \text{ \AA}) = -137.0 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D30 [$E_{D30}(24 \text{ \AA}) = -133.6 \text{ kcal mol}^{-1}$] > DF [$E_{DF}(24 \text{ \AA}) = -133.0 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D40 [$E_{D40}(24 \text{ \AA}) = -131.9 \text{ kcal mol}^{-1}$] > D80 [$E_{D80}(24 \text{ \AA}) = -129.3 \text{ kcal mol}^{-1}$]. A energia de interação obtida com a função dielétrica não homogênea DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$) é equivalente aos valores de energia de interação quando usada as constantes dielétricas homogêneas D20, D30, D40 e D80.

8.4 Perfil de Energia minoTc-PLA2

A partir dos resultados das energias de interação individuais de cada aminoácido da PLA2 com a minoTc foi possível obter o perfil de energia de interação para as constantes dielétricas homogêneas e não-homogênea apresentado na Fig. 33. O perfil de energia foi obtido a partir da soma das energias de interação de cada aminoácido com relação a distância (r) que é a distância de cada aminoácido A_i a minoTc, para cada metodologia. Os aminoácidos Gly29, Trp18 e Ala22 apresentam forte energia de interação com a minoTc para todas as metodologias com valores variando entre -26 e $-12 \text{ kcal mol}^{-1}$ e distantes até 2.0 \AA da minoTc. No intervalo entre 2.0 \AA e 4.0 \AA temos a forte influência dos aminoácidos Arg30, Phe64, Leu2 e Phe63 com energias de interação variando de -12 a -5 kcal mol^{-1} para a constante dielétrica não-homogênea DF e -52 a 17 kcal mol^{-1} para a constante dielétrica homogênea D01. O aminoácido Arg30 apresenta energia de interação repulsiva ($17.37 \text{ kcal mol}^{-1}$) para a constante dielétrica homogênea D01, mas é atrativa para as outras constantes dielétricas homogêneas estudadas e a para a não-homogênea a qual tem valor de $-12.6 \text{ kcal mol}^{-1}$. A partir de 4.0 \AA da minoTc todos os aminoácidos apresentaram energia de interação em módulo inferior a 2 kcal mol^{-1} para as constantes dielétricas homogêneas (D10, D20, D30, D40 e D80) e não-homogênea (DF), entretanto, para as constantes dielétricas homogêneas D01 e D04 ainda encontra-se interações maiores em módulo que 2 kcal mol^{-1} o que influencia na energia total de interação minoTc-PLA2.

O aminoácido Asp48 (6.14 \AA), cuja cadeia lateral tem carga formal -1 , apresenta energia de interação fortemente atrativa de $-49 \text{ kcal mol}^{-1}$ quando utilizada a constante dielétrica homogênea D01, mas essa energia cai para $-1.55 \text{ kcal mol}^{-1}$ com a constante dielétrica não-homogênea DF. Assim, podemos verificar que as energias de interação dos aminoácidos que estão

Figura 33 – Energia total de interação do sistema minoTc-PLA2 em função do raio do sítio de ligação usando a estratégia MFCC para as constantes dielétricas homogêneas D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e não-homogênea DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7) no eixo esquerdo e D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) no eixo direito. Os principais aminoácidos envolvidos na interação são indicados nos retângulos amarelos (constante dielétrica homogênea e não-homogênea) e retângulos azuis (apenas para D01) agrupados pela distância ao ligante (minoTc) indicado pelas linhas verticais sólidas verde (topo figura). As principais metodologias destacadas na base.



distantes mais de 4 Å da minoTc para as constantes dielétricas homogêneas (D10, D20, D30, D40 e D80) e não-homogênea (DF) têm pouco ou nenhuma contribuição para modificar a energia de interação total do complexo minoTc-PLA2. Além disso, o perfil de energia mostra uma maior variação nos valores de energia de interação para as constantes dielétricas homogêneas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) e D04 ($\epsilon = 4$) devido as interações de longo alcance pela presença de aminoácidos carregados.

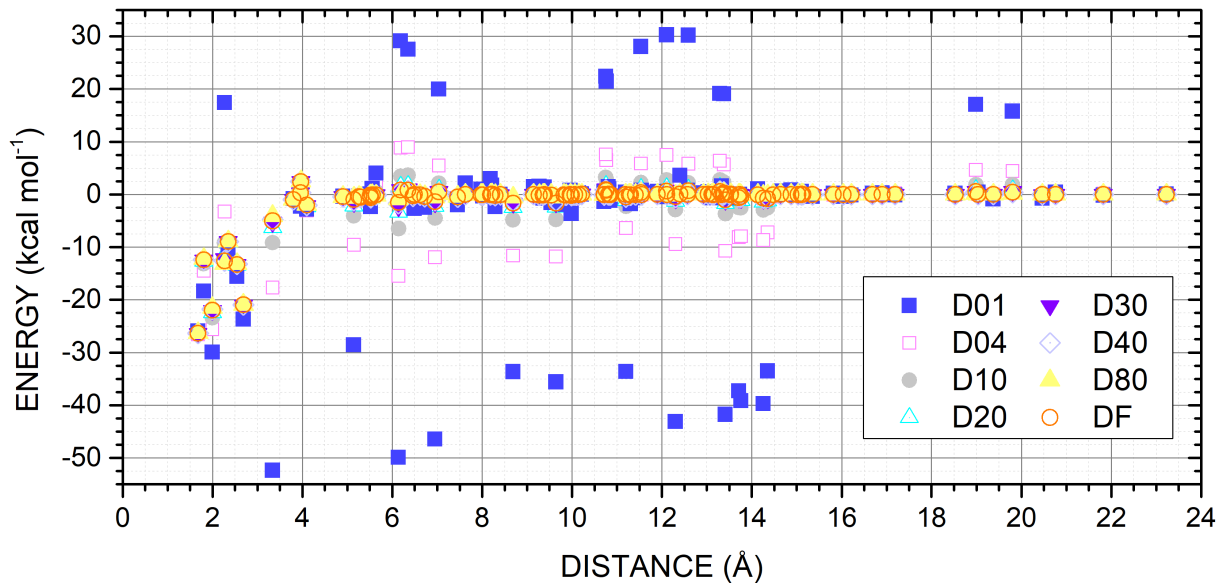
Tabela 7 – Relação dos valores da energia de interação total do complexo minoTc-PLA2 para as constantes dielétricas homogênea [D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água)] e não-homogênea [DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$, Eq. 7.7)].

Energia de interação total (kcal mol ⁻¹) do complexo minoTc-PLA2 por constante dielétrica							
Homogênea							Não-homogênea
D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
-351.7	-184.3	-147.3	-137.0	-133.6	-131.9	-129.3	-133.0

Em todo o perfil de energia a constante dielétrica D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) apresenta os menores valores de energia, cujos valores são pouco modificados apenas após 14 Å, seguido por D04. Essa diminuição acentuada da energia de interação é devido às interações entre os aminoácidos carregados e a minoTc. A Tab. 7 apresenta os valores da energia total de interação minoTC-PLA2 para cada metodologia de constante dielétrica adotada no presente estudo. A energia de interação minoTc-PLA2, que é a soma das energias individuais de cada aminoácido, mostra que quando se usa a constante dielétrica não-homogênea (DF) temos uma diferença (em kcal mol⁻¹ de $\Delta E_{(DF-D01)} = +218.7$, $\Delta E_{(DF-D04)} = +51.31$, $\Delta E_{(DF-D10)} = +14.4$, $\Delta E_{(DF-D20)} = +4.1$, $\Delta E_{(DF-D30)} = +0.61$, $\Delta E_{(DF-D40)} = -1.1$ e $\Delta E_{(DF-D80)} = -3.7$ em relação às energias das constantes dielétricas homogêneas D01, D04, D20, D30, D40 e D80, respectivamente. Assim, o perfil de energia de interação das constantes dielétricas homogêneas D01, D40 e D80 e não-homogênea DF que apresentam diferenças significativas em relação a energia total de interação minoTc-PLA2 estão destacadas na Fig. 33 (base), para melhor compreensão.

A Fig. 34 apresenta a distribuição da energia de interação, $E_i(\text{minoTc} - A_i)$, para cada aminoácido A_i da enzima PLA2 em relação a distância (r) ao ligante (minoTc) para as constantes dielétricas homogêneas (D01, D04, D10, D20, D30, D40 e D80) e não-homogêneas (DF). Desta forma, é possível observa que a metodologia da constante dielétrica homogênea D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) apresentou as maiores variações da energia de interação dos aminoácidos

Figura 34 – Distribuição da da energia de interação $E_i(\text{minoTc}-A_i)$ para cada aminoácido A_i da enzima PLA2 pela distância r (Å) para as constantes dielétricas homogêneas (D01, D04, D10, D30, D40 e D80) e não-homogênea (DF).



e que, mesmo aminoácidos distantes, as interações chegaram a até 40 kcal mol^{-1} em módulo. Os valores das energias de interação com a minoTc para cada aminoácido da PLA2 estão apresentados na Tab. 10 do Apêndice A. Entretanto, as maiores energias de interação para as metodologias em estudo estão destacadas na Tab. 8.

8.4.1 Painel BIRD

A Figura 35 apresenta o painel gráfico com as energias de interação obtidas para a minoTc e os resíduos de aminoácidos mais importantes no sítio de ligação da PLA2. Este painel gráfico chamado de BIRD, referência ao acrônimo inglês para as palavras-chave sítio de ligação, energia de interação e domínio dos resíduos (*Binding site, Interaction energy and Residues Domain*), e mostra de forma simplificada: (i) a energia de interação (em kcal mol^{-1}) individual para cada aminoácido com a SACE através de barras horizontais, coloridas para cada metodologia conforme indicado na legenda para D01 (azul), D40 (azul claro), D80 (amarelo) e DF (laranja).

A partir do BIRD pode-se estimar quantitativamente o papel de cada resíduo no sítio de ligação da PLA2 para cada metodologia de constante dielétrica estudada, ou seja, sua eficácia para atrair ou repelir o ligante. Podemos ver no painel BIRD da Fig. 35 que os resíduos de

Tabela 8 – Maiores energias de interação E_i dos aminoácidos (A_i) do complexo minoTc-PLA2 para as constantes dielétricas homogêneas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$) e D80 ($\epsilon = 80$, água) e não-homogênea DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$ dado pela Eq. 7.7); r_i é a distância dada em (Å) entre o átomo do aminoácido i da PLA2 e o átomo da minoTc.

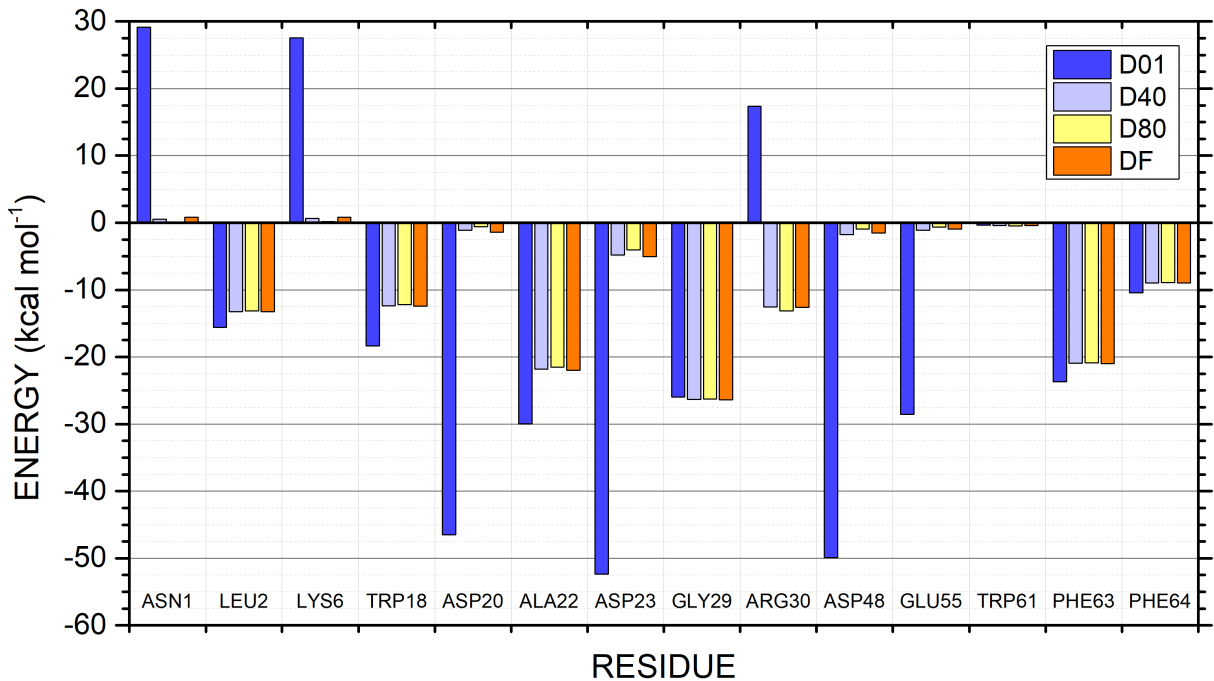
PLA2		Energia de interação E_i (kcal mol ⁻¹) minoTc-PLA2							
A_i	r (Å)	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
Asn1	6.2	29.1	8.8	3.5	1.5	0.9	0.6	0.1	0.8
Leu2	2.5	-15.6	-14.3	-13.7	-13.4	-13.3	-13.2	-13.2	-13.3
Lys6	6.4	27.5	9.0	3.7	1.7	1.0	0.7	0.2	0.8
Trp18	1.8	-18.4	-14.5	-13.1	-12.6	-12.5	-12.4	-12.2	-12.4
Asp20	7.0	-46.5	-11.9	-4.5	-2.3	-1.5	-1.2	-0.6	-1.4
Ala22	2.0	-30.0	-25.6	-23.4	-22.4	-22.0	-21.8	-21.5	-22.0
Asp23	3.3	-52.4	-17.7	-9.2	-6.3	-5.3	-4.8	-4.1	-5.0
Gly29	1.7	-26.0	-26.6	-26.5	-26.4	-26.4	-26.3	-26.3	-26.4
Arg30	2.3	17.4	-3.2	-9.2	-11.4	-12.2	-12.6	-13.1	-12.6
Asp48	6.1	-49.9	-15.5	-6.5	-3.4	-2.3	-1.7	-0.9	-1.5
Glu55	5.1	-28.6	-9.6	-4.1	-2.1	-1.5	-1.1	-0.6	-1.0
Trp61	5.3	-0.4	-0.1	-0.3	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4
Phe63	2.7	-23.7	-21.9	-21.3	-21.1	-21.0	-21.0	-20.9	-21.0
Phe64	2.4	-10.4	-9.5	-9.1	-9.0	-9.0	-8.9	-8.9	-8.9

aminoácidos que contribuem mais fortemente para a estabilização da interação minoTc-PLA2 são Leu2, Trp18, Ala22, Gly29, Arg30, Phe63 e Phe64. A Tab. 8 mostra a energia de interação dos aminoácidos destacados no painel BIRD (Fig. 35).

8.5 Superfície de energia de interação

Para destacar como a energia de interação de cada aminoácido do sistema minoTc-PLA2 é modificada vamos usar a projeção desses valores na superfície da enzima PLA2. As Figs. 36 a 39 mostram a projeção da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-}A_i)$, em várias orientações, para cada aminoácido, codificado por cores e mapeado na superfície molecular da enzima, de acordo com a barra de escala. As energias de interação minoTc-PLA2 variam entre um valor mínimo de $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e um máximo de 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Valores negativos (positivos) da energia de interação indicam atração (repulsão).

Figura 35 – Painel BIRD.



Com a projeção das superfícies de energia de interação fica mais evidente que não há diferença significativa entre as metodologias para obtenção do MFCC que usaram constante dielétrica homogênea D40 e D80 quando comparadas com

Quando comparadas as superfícies de energia de interação para as constantes dielétricas homogêneas (D01, D40 e D80) e não-homogênea (DF) verificamos que D40, D80 e DF apresentam muita semelhança, tornando quase indistinguível as cores na superfície molecular da PLA2 com as interações mais distantes com coloração em tom de verde, ou seja, com energias de interação em torno de -2 kcal mol^{-1} . Entretanto, quando o método usa D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) verifica-se na superfície da PLA2, mais distante da minoTC, cores em tom azul, vermelho e lilás, resultado das energias de interação elevadas para grandes distâncias devido ao meio dielétrico. Esses resultados reafirmam a importância do uso de constante dielétrica para estudo da interação minoTc-PLA2.

Quando se observa o corte transversal da projeção da superfície de interação apresentados nas Figs. 38 e 39 é possível observar melhor as interações dentro do sítio de ligação. Desta forma, podemos verificar que dentro do sítio de ligação da PLA2 as energias de interação para a constante dielétrica homogênea D01 (vácuo) mostram um range de interação maior do que os outras constantes homogêneas (D40 e D80) e não-homogênea (DF).

Figura 36 – As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc}-A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).

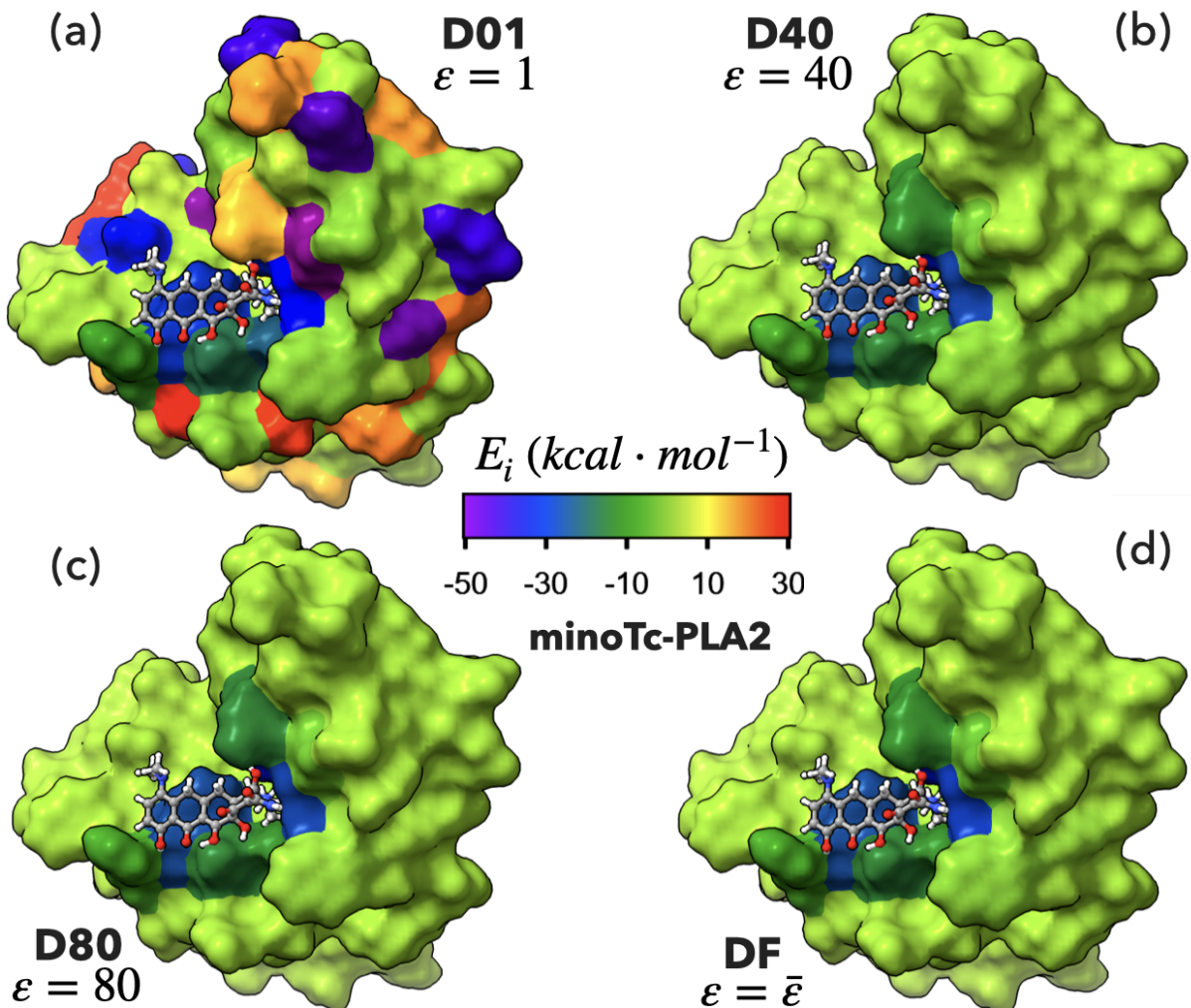


Figura 37 – A vista é girada em 45° ao longo do eixo y em comparação com a Fig. 36. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-}A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloro em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).

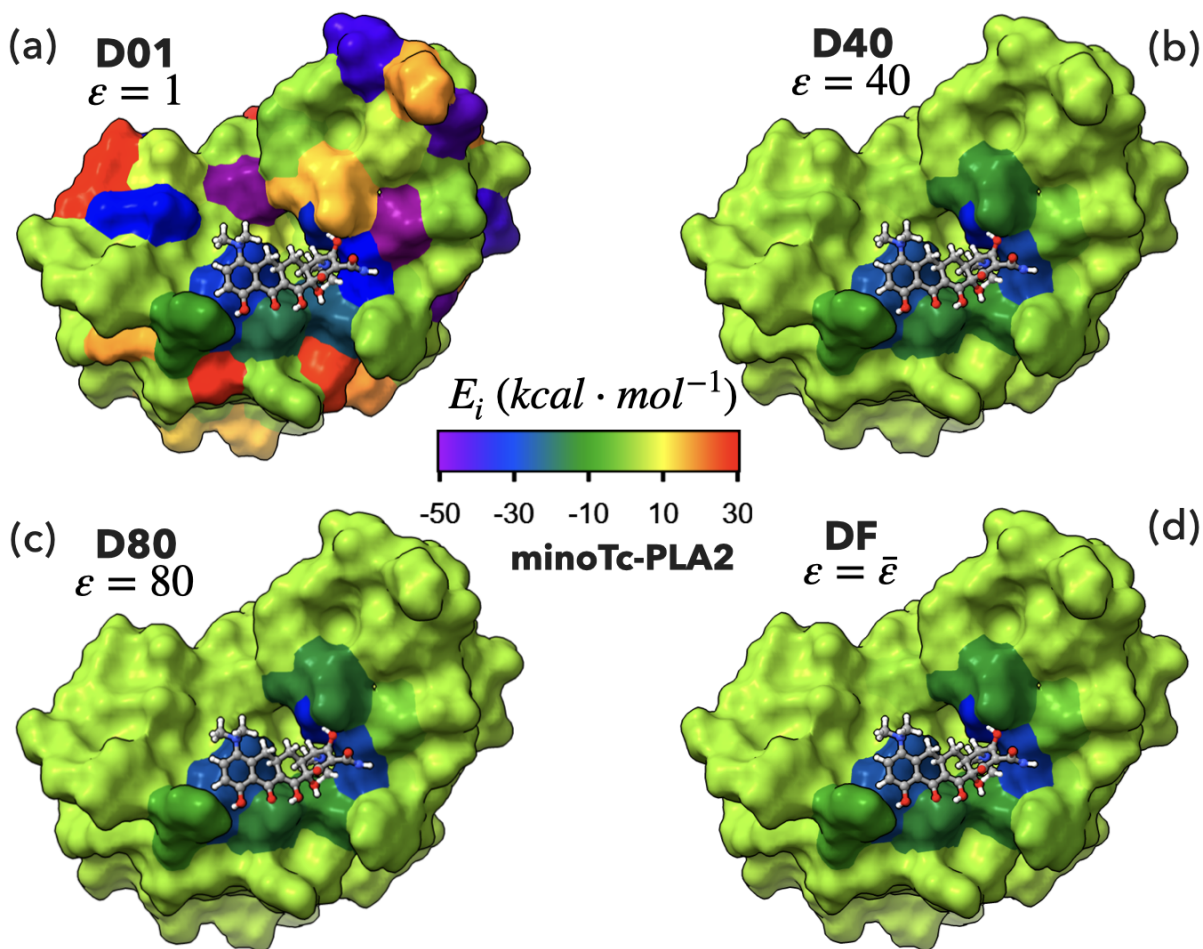


Figura 38 – Corte transversal realizado na Fig. 36 para evidenciar o sítio de ligação da PLA2. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc}-A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).

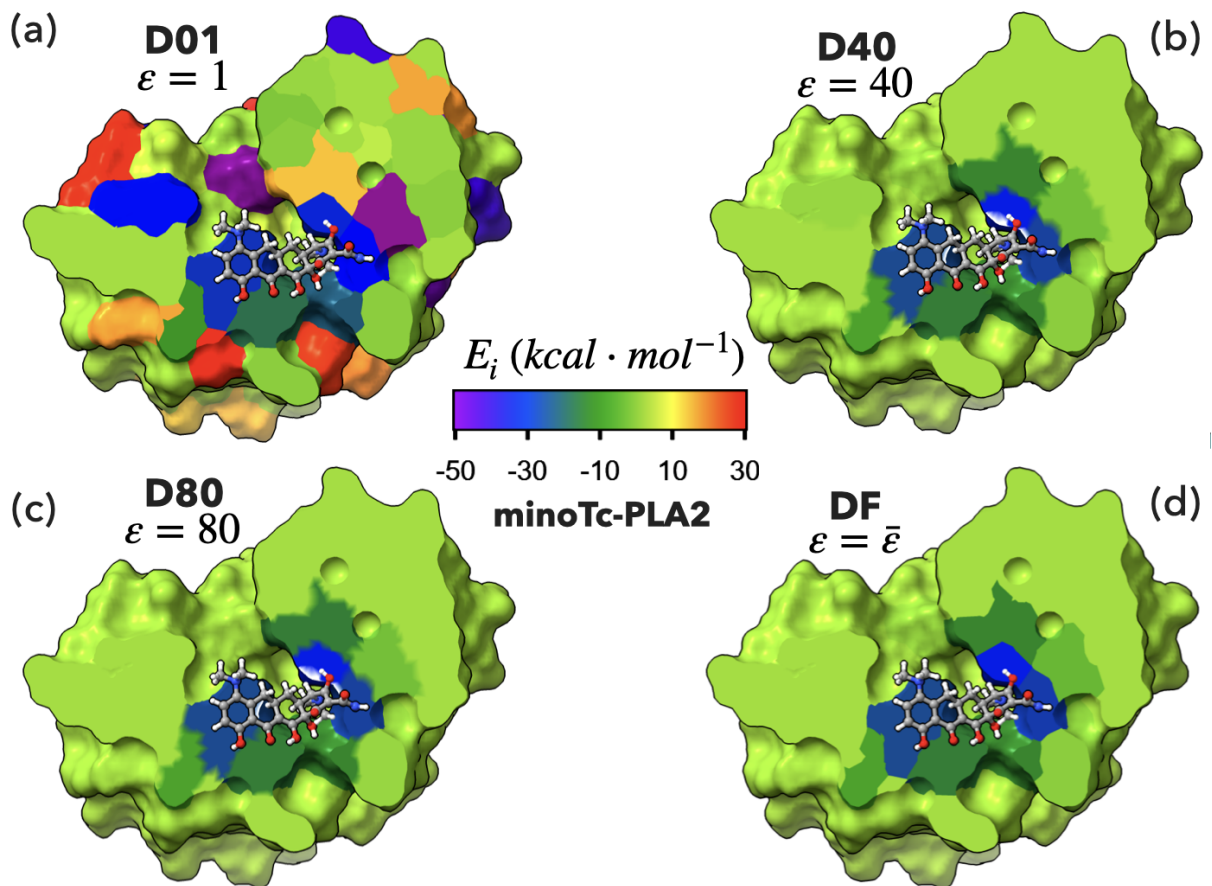
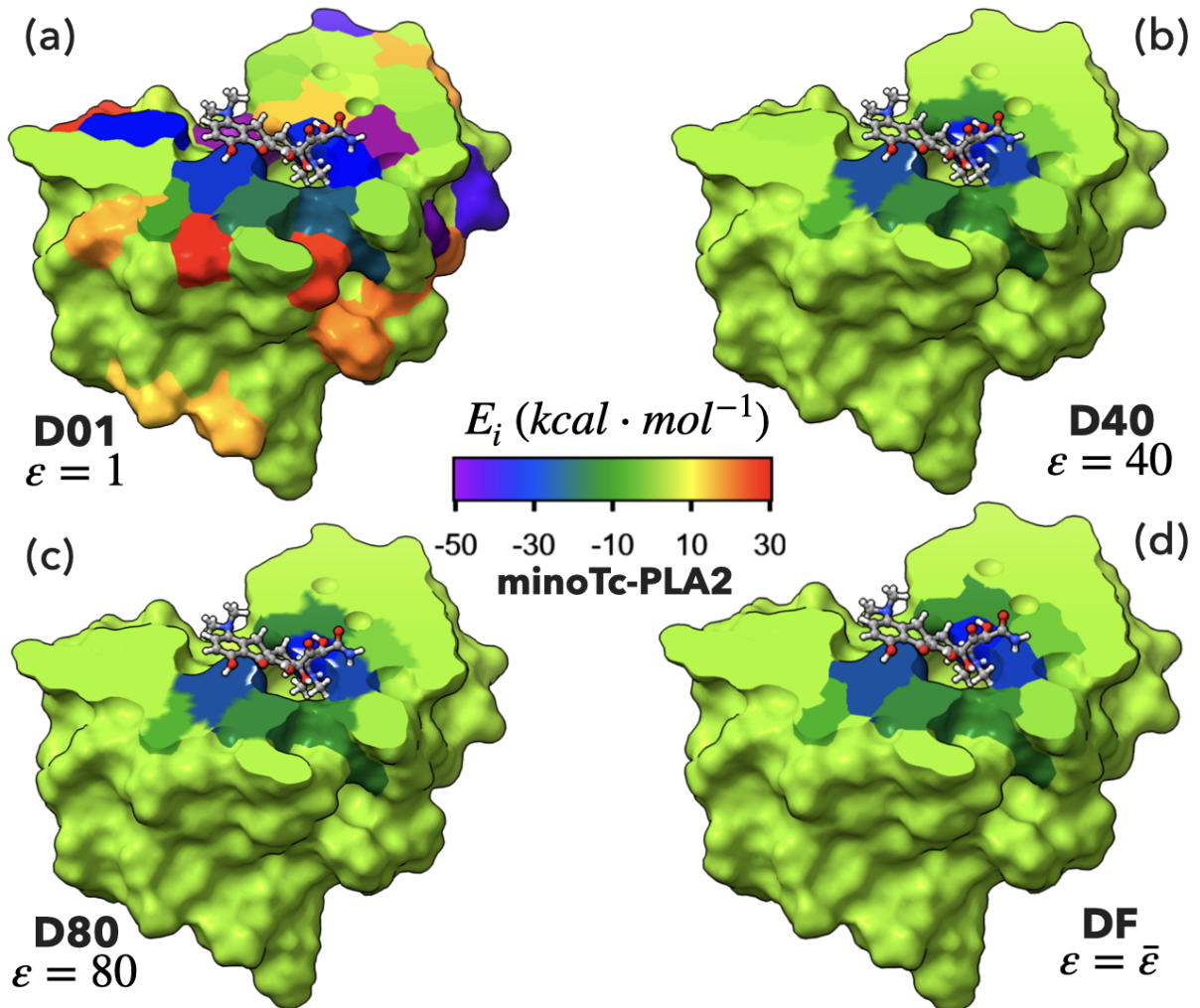


Figura 39 – A vista é girada em 45° ao longo do eixo x em comparação com a Fig. 38. As projeções da energia de interação, $E_i(\text{minoTc-}A_i)$ da PLA2 para cada aminoácido estão codificadas por cores e mapeadas na superfície molecular, de acordo com a barra de escala. A barra de escala indica que a energia de interação varia entre $-50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (lilás) e 30 kcal mol^{-1} (vermelho escuro). Para as constantes dielétricas (a) D01, (b) D40, (c) D80 e (d) DF são exibidos na mesma orientação, com o ligante mostrado na representação de bola e bastão. Os carbonos da minoTc são coloridos de cinza claro e os outros átomos são coloridos por tipo (oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, cloreto em verde e íon zinco em cinza). A figura foi obtida usando o pacote UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN *et al.*, 2004).



9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS: MINOTC-PLA2

Em resumo, nesta unidade foram realizados cálculos de energia de interação da minociclina (minoTc) com a enzima fosfolipase A2 (PLA2) a partir dos dados da estrutura cristalizada com PDB 2WQ5. A enzima PLA2 escolhida para o estudo tem a vantagem de conter apenas 119 aminoácidos que foi vantajoso para tempo de custo computacional e, assim, poder aplicar diversas metodologias. Além disso, foi avaliado como a constante dielétrica homogênea e não-homogênea influencia na energia de interação minoTc-PLA2. Para tal, através dos dados estruturais do sistema minoTc-PLA2 e dos resultados de Li et al. (2013) (LI *et al.*, 2013) foi modelada a constante dielétrica não-homogênea do sistema para o MFCC. Assim, Com a metodologia MFCC aqui aplicada foram obtidas as energias de interação total do sistema minoTc-PLA2 para cada uma das constantes dielétricas homogênea e não-homogênea em estudo. Além disso, foram obtidas as energias de interação individual (minoTc- A_i) para os aminoácido da enzima PLA2. O perfil de energia foi determinado a partir da variação da energia dos aminoácidos da enzima. O painel BIRD foi obtido e fornece uma análise das interações entre os principais resíduos do sítio de ligação da minoTc na enzima PLA2.

A partir dos dados estruturais do sistema minTc-PLA2 obtivemos a constante dielétrica não-homogênea, $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-}A_i}$, dada pela Eq. 7.7, para a interação minoTc- A_i da PLA2. A média dos valores obtidos para $\bar{\epsilon}_{\text{minoTc-}A_i}$ para os aminoácidos que estão distantes até $r = 8.0 \text{ \AA}$ da minoTc permanece igual 32, que é a mesma média obtida para todos os aminoácidos da enzima PLA2. Através da estratégia MFCC e com o uso da metodologia DFT foi possível determinar a energia de interação de cada aminoácido da enzima PLA2 com a minoTc. A partir dos resultados das energias de interação individuais de cada aminoácido da PLA2 com a minoTc foi possível obter o perfil de energia de interação para as constantes dielétricas homogêneas e não-homogênea. Assim, podemos verificar que as energias de interação dos aminoácidos que estão distantes mais de 4 \AA da minoTc para as constantes dielétricas homogêneas (D10, D20, D30, D40 e D80) e não-homogênea (DF) têm pouco ou nenhuma contribuição para modificar a energia de interação total do complexo minoTc-PLA2. Além disso, o perfil de energia mostra uma maior variação nos valores de energia de interação para as constantes dielétricas homogêneas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo) e e D04 ($\epsilon = 4$) devido as interações de longo alcance pela presença de aminoácidos carregados. Os resultados aqui obtidos reafirmam a importância do uso de constante dielétrica para estudo da interação ligante-proteína e da necessidade de uma constante dielétrica não-homogênea.

10 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos estudos realizados para os diferentes sistemas estudados nesta tese pode-se concluir que:

Dentro do formalismo da teoria do funcional da densidade (DFT) usando a aproximação de densidade local (LDA) para o funcional de troca e correlação com parametrização PWC e método de correção de dispersão (DFT-D) OBS foi possível determinar as energias de interação dos aminoácidos individuais de cada complexo estudado: LPR-sACE, LST-sACE e minoTc-PLA2. A determinação da energia de interação e a obtenção de uma constante dielétrica não-homogênea com base nos dados estruturais da interação ligante-macromolécula é um dos aspectos mais importantes desta tese. Os cálculos de energia de interação ligante-proteína podem contribuir para a compreensão da natureza molecular da inibição. Assim sendo, o formalismo DFT aqui utilizado foi importante para: (a) possibilitar o tratamento dos sistemas complexos em estudo, que se tornam computacionalmente inviáveis para métodos mais precisos; (b) possibilitar que diferentes funcionais de densidade e estratégias de implementá-los possam ser testadas, comparadas e entendidas. Adicionalmente, este é o primeiro trabalho *in silico* que demonstra que o LST pode interagir com a enzima sACE, um novo mecanismo de ação, além de atuar no receptor AT1. Assim, conseguimos descrever como a interação LST-sACE ocorre em nível molecular. Assim, o valor absoluto da energia total de interação LST-sACE sugere que o LST é uma potente molécula inibidora da sACE, apesar de o LPR ser um inibidor da sACE mais eficaz.

Na terceira parte desta tese, foi estudada a interação da minoTc com a enzima PLA2, a qual tem a vantagem de conter apenas 119 aminoácidos e, assim, poder aplicar diversas metodologias com redução do custo computacional. A partir do trabalho de Li et al. (2013) (LI *et al.*, 2013) conseguimos aplicar a metodologia apresentada para obtenção das constantes dielétricas não-homogêneas do sistema minoTc-A_i na enzima PLA2, para uso no cálculo MFCC. Esses resultados reafirmam a importância do uso de constante dielétrica para estudo da interação minoTc-PLA2.

A presente tese reforça o papel das simulações computacionais em nível quântico como uma ferramenta valiosa para o entendimento e desenvolvimento de novos fármacos. Para conciliar a produção de medicamentos mais eficientes e a necessidade de diminuir seu custo de desenvolvimento, o uso de simulações computacionais relativamente baratas é bastante promissor.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, P.; PODGORNIK, R.; JAWAD, B.; CHING, W.-Y. First-principles simulation of dielectric function in biomolecules. **Materials**, v. 14, p. 5774, 10 2021. ISSN 1996-1944.
- ALBUQUERQUE, E.; FULCO, U. L.; CAETANO, E.; FREIRE, V. **Quantum Chemistry Simulation of Biological Molecules**. Cambridge University Press, 2020. 434 p. ISBN 9781108774956. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifiier/9781108774956/type/book>.
- ALBUQUERQUE, E. L.; FULCO, U. L.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N. **Quantum Chemistry Simulation of Biological Molecules**. [S. l.]: Cambridge University Press, 2021.
- ALVARENGA, E. C. de; FONSECA, M. d. C.; CARVALHO, C. C.; FLORENTINO, R. M.; FRANÇA, A.; MATIAS, E.; GUIMARÃES, P. B.; BATISTA, C.; FREIRE, V.; CARMONA, A. K.; PESQUERO, J. B.; PAULA, A. M. de; FOUREAUX, G.; LEITE, M. d. F. Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration. **PLoS one**, v. 11, n. 12, p. e0165371, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165371>{\%}0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27992.
- AMIN, M.; KÜPPER, J. Variations in proteins dielectric constants. **ChemistryOpen**, v. 9, p. 691–694, 6 2020. ISSN 2191-1363.
- ANDERSEN, S.; TARNOW, L.; CAMBIEN, F.; ROSSING, P.; JUHL, T. R.; DEINUM, J.; PARVING, H.-H. Renoprotective effects of losartan in diabetic nephropathy: Interaction with ACE insertion/deletion genotype? **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 192–198, jul 2002. ISSN 00852538. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815485369>.
- ARNI, R.; WARD, R. Phospholipase a2—a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827–841, 1996. ISSN 00410101.
- BARROS, V. N. The heart cycle: review. **Women’s Health**, MedCrave Group, LLC, v. 8, p. 66–69, 2019.
- BARROSO-NETO, I. L.; MARQUES, J. P. C.; COSTA, R. F. da; CAETANO, E. W. S.; CAVADA, B. S.; GOTTFRIED, C.; FREIRE, V. N. Inactivation of Ovine Cyclooxygenase-1 by Bromoaspirin and Aspirin: A Quantum Chemistry Description. **The journal of physical chemistry. B**, v. 116, n. 10, p. 3270–9, mar 2012. ISSN 1520-6106. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320344><https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp206397z>.
- BASSETT, M. H.; WHITE, P. C.; RAINEY, W. E. The regulation of aldosterone synthase expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 217, p. 67–74, 3 2004. ISSN 03037207.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, jan 2000. ISSN 13624962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592235><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC102472><https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.1.235>.
- BIOVIA, D. S. **Discovery studio modeling environment, Version 19.1**. San Diego, CA, USA: [S. n.], 2019. Disponível em: <http://www.accelrys.com>.

BLAKE, C. C. F.; KOENIG, D. F.; MAIR, G. A.; NORTH, A. C. T.; PHILLIPS, D. C.; SARMA, V. R. Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 resolution. **Nature**, v. 206, p. 757–761, 5 1965. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/206757a0>.

BROWN, A. C.; FRASER, T. R. On the connection between chemical constitution and physiological action; with special reference to the physiological action of the salts of the ammonium bases derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia, and nicotia. **Journal of anatomy and physiology**, v. 2, p. 224–42, 1868.

BURGER, A. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 26 th. ed. [S. l.: s. n.], 1998. v. 1. 1-946 p.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase a2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, p. 49–59, 2009. ISSN 0920-3206. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10557-008-6132-9>.

CHAN-DEWAR, F. The cardiac cycle. **Anaesthesia Intensive Care Medicine**, v. 13, p. 391–396, 8 2012. ISSN 14720299.

CHEN, X. H.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugated caps density matrix with pairwise interaction correction for protein energy calculation. **Journal of Chemical Physics**, v. 125, n. 4, p. 1–7, 2006. ISSN 00219606.

COREY, R. B.; PAULING, L. Fundamental dimensions of polypeptide chains. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)**, v. 141, p. 10–20, 3 1953. ISSN 0080-4649. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13047262>.

CORRADI, H. R.; SCHWAGER, S. L.; NCHINDA, A. T.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal Structure of the N Domain of Human Somatic Angiotensin I-converting Enzyme Provides a Structural Basis for Domain-specific Inhibitor Design. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 3, p. 964–974, mar 2006. ISSN 00222836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476442><https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606000775>.

CORZANA, F.; BUSTO, J. H.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; De Luis, M. G.; ASENSIO, J. L.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; PEREGRINA, J. M.; AVENOZA, A. Serine versus threonine glycosylation: The methyl group causes a drastic alteration on the carbohydrate orientation and on the surrounding water shell. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 30, p. 9458–9467, 2007. ISSN 00027863.

COSSIO, P.; TROVATO, A.; PIETRUCCHI, F.; SENO, F.; MARITAN, A.; LAIO, A. Exploring the universe of protein structures beyond the protein data bank. **PLoS computational biology**, v. 6, p. e1000957, 1 2010. ISSN 1553-7358. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2973819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

COSTA, R. F. da; FREIRE, V. N.; BEZERRA, E. M.; CAVADA, B. S.; CAETANO, E. W. S.; de Lima Filho, J. L.; ALBUQUERQUE, E. L. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 14, n. 4, p. 1389–1398, jan 2012. ISSN 1463-9076. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159045><http://xlink.rsc.org/?DOI=C1CP22824B>.

CULLEN, P. J.; LOCKYER, P. J. Integration of calcium and Ras signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 5, p. 339–48, may 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988768>.

DALM, D.; PALM, G. J.; ALEKSANDROV, A.; SIMONSON, T.; HINRICHS, W. Nonantibiotic properties of tetracyclines: Structural basis for inhibition of secretory phospholipase a2. **Journal of Molecular Biology**, Elsevier Ltd, v. 398, p. 83–96, 2010. ISSN 00222836. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.049>.

DANTAS, D. S.; OLIVEIRA, J. I. N.; Lima Neto, J. X.; COSTA, R. F. da; BEZERRA, E. M.; FREIRE, V. N.; CAETANO, E. W. S.; FULCO, U. L.; ALBUQUERQUE, E. L. Quantum molecular modelling of ibuprofen bound to human serum albumin. **RSC Advances**, v. 5, n. 61, p. 49439–49450, 2015. ISSN 2046-2069. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA04395F>.

DAUBER-OSGUTHORPE, P.; ROBERTS, V. A.; OSGUTHORPE, D. J.; WOLFF, J.; GENEST, M.; HAGLER, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 4, n.1, p. 31–47, 1988. ISSN 0887-3585. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3054871><http://doi.wiley.com/10.1002/prot.340040106>.

DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 1, p. 508–517, jan 1990. ISSN 0021-9606. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.458452>.

DELLEY, B. From molecules to solids with the DMol3 approach. **The Journal of Chemical Physics**, v. 113, n. 18, p. 7756–7764, nov 2000. ISSN 0021-9606. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1316015>.

ESMAIL, Z. N.; LOEWEN, P. S. Losartan as an Alternative to ACE Inhibitors in Patients with Renal Dysfunction. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, n. 10, p. 1096–1098, oct 1998. ISSN 1060-0280. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1345/aph.18014>.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. a; DENNIS, E. a; XUONG, N. H. Crystal structure of phospholipase a2 from indian cobra reveals a trimeric association. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 342–346, 1993. ISSN 0027-8424.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. Comparison of end-point continuum-solvation methods for the calculation of protein-ligand binding free energies. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 5, p. 1326–1342, 2012. ISSN 08873585.

GORDON, M. S.; FEDOROV, D. G.; PRUITT, S. R.; SLIPCHENKO, L. V. Fragmentation methods: A route to accurate calculations on large systems. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 1, p. 632–672, 2012. ISSN 00092665.

GUIMARÃES, P. B.; ALVARENGA, É. C.; SIQUEIRA, P. D.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SABATINI, R. A.; MORAIS, R. L.; REIS, R. I.; SANTOS, E. L.; TEIXEIRA, L. G.; CASARINI, D. E.; MARTIN, R. P.; SHIMUTA, S. I.; CARMONA, A. K.; NAKAIE, C. R.; JASIULIONIS, M. G.; FERREIRA, A. T.; PESQUERO, J. L.; OLIVEIRA, S. M.; BADER, M.; COSTA-NETO, C. M.; PESQUERO, J. B. Angiotensin II Binding to Angiotensin I-Converting

Enzyme Triggers Calcium Signaling. **Hypertension**, v. 57, n. 5, p. 965–972, may 2011. ISSN 0194-911X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422380><https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167171>.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en américa latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, p. 377–394, 2002. ISSN 00347744.

HODGKIN, D. C. The x-ray analysis of complicated molecules. **Science**, v. 150, p. 979–988, 11 1965. ISSN 0036-8075. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.150.3699.979>.

HUANG, X.; JAIN, P. K.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Plasmonic photothermal therapy (popt) using gold nanoparticles. **Lasers in medical science**, v. 23, p. 217–28, 7 2008. ISSN 0268-8921. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674122>.

KENDREW, J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H.; PHILLIPS, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**, v. 181, p. 662–666, 3 1958. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/181662a0>.

KUKIĆ, P.; NIELSEN, J. E. Electrostatics in proteins and protein–ligand complexes. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 647–666, 2010. ISSN 1756-8919. Disponível em: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.10.6>.

LENSINK, M.; MENDEZ, R. Recognition-induced conformational changes in protein-protein docking. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, p. 77–86, 4 2008. ISSN 13892010.

LI, L.; LI, C.; ZHANG, Z.; ALEXOV, E. On the dielectric “constant” of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in delphi. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, p. 2126–2136, 4 2013. ISSN 1549-9618.

Lima Neto, J. X.; FULCO, U. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; CORSO, G.; BEZERRA, E. M.; CAETANO, E. W. S.; COSTA, R. F. da; FREIRE, V. N. A quantum biochemistry investigation of willardiine partial agonism in AMPA receptors. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 17, n. 19, p. 13092–103, may 2015. ISSN 1463-9084. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915595>.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1pii of original article: S0169-409x(96)00423-1. the article was originally published in advanced drug delivery reviews 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 3 2001. ISSN 0169409X.

Lättig, J.; Böhl, M.; Fischer, P.; Tischer, S.; Tietböhl, C.; Menschikowski, M.; Gutzeit, H. O.; Metz, P.; Pisabarro, M. T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase a2 by flavonoids: Rationale for lead design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, p. 473–483, 2007. ISSN 0920654X.

MA, B.; ELKAYAM, T.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Protein–protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5772–5777, 5 2003. ISSN 0027-8424.

MARON, B. A.; LEOPOLD, J. A. Mineralocorticoid receptor antagonists and endothelial function. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 9, p. 963–9, 9 2008. ISSN 1472-4472.

MCKEEN, L. W. **Introduction to the Properties of Plastic and Elastomer Films**. [S. l.]: Elsevier, 2012. 19-55 p.

MEYER, T.; KIESERITZKY, G.; KNAPP, E. W. Electrostatic pK a computations in proteins: Role of internal cavities. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 79, n. 12, p. 3320–3332, 2011. ISSN 08873585.

MORAIS, P. A.; MAIA, F. F.; SOLIS-CALERO, C.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N.; CARVALHO, H. F. The urokinase plasminogen activator binding to its receptor: a quantum biochemistry description within an in/homogeneous dielectric function framework with application to upa–upar peptide inhibitors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, p. 3570–3583, 2020. ISSN 1463-9076.

MOREIRA, O. C.; OLIVEIRA, R. A. R. de; NETO, F. A.; AMORIM, W.; OLIVEIRA, C. E. P.; DOIMO, L. A.; AMORIM, P. R. dos S.; LATERZA, M. C.; MONTEIRO, W. D.; MARINS, J. C. B. **Associação entre risco cardiovascular e hipertensão arterial em professores universitários**. 397-406 p.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–91, dec 2009. ISSN 1096-987X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399780><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2760638>.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. **Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach**. 3. ed. USA: Oxford University Press, 2005. 672 p. ISBN 0195104560.

ORTMANN, F.; BECHSTEDT, F.; SCHMIDT, W. G. Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures. **Physical Review B**, v. 73, n. 20, p. 205101, may 2006. ISSN 1098-0121. Disponível em: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.73.205101>.

PAL, S.; BALASUBRAMANIAN, S.; BAGCHI, B. Anomalous dielectric relaxation of water molecules at the surface of an aqueous micelle. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 4, p. 1912–1920, 2004. ISSN 0021-9606. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1635803>.

PAN, Y. H.; YU, B. Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K.; BAHNSON, B. J. Crystal structure of phospholipase a2 complex with the hydrolysis products of platelet activating factor: Equilibrium binding of fatty acid and lysophospholipid-ether at the active site may be mutually exclusive. **Biochemistry**, v. 41, p. 14790–14800, 2002. ISSN 00062960.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 6 edition. ed. United Kingdom: OUP Oxford, 2017. 912 p. ISBN 978-018749691.

PERDEW, J. P.; WANG, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Physical Review B**, v. 45, p. 13244–13249, 6 1992. ISSN 0163-1829. Disponível em: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.45.13244>.

PERUTZ, M. F. New x-ray evidence on the configuration of polypeptide chains: Polypeptide chains in poly--benzyl-l-glutamate, keratin and hæmoglobin. **Nature**, v. 167, p. 1053–1054, 6 1951. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/1671053a0>.

PERUTZ, M. F. Electrostatic effects in proteins. **Science**, v. 201, p. 1187–1191, 9 1978. ISSN 0036-8075.

PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A. F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. T. Structure of hæmoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5- resolution, obtained by x-ray analysis. **Nature**, v. 185, p. 416–422, 2 1960. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/185416a0>.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, oct 2004. ISSN 0192-8651. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254><http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.20084>.

RAJEEV, G.; SONEIL, G. Strategies for initial management of hypertension. (Special Section: Cardiovascular disease research.). **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 5, p. 531–542, 2010. Disponível em: https://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=cagh&AN=20123009933\%0Ahttps://discover.lsh.ac.uk/openurl/44HYG/44HYG_services_page?sid=OVID:caghdb&id=doi:&id=pmid&issn=0971-5916&isbn=&volume=132&issue=5&spage=531&pages=531-542&date.

SANGER, F. Sequences, sequences, and sequences. **Annual review of biochemistry**, v. 57, p. 1–28, 1 1988. ISSN 0066-4154. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460023>.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of molecular graphics modelling**, v. 17, p. 57–61, 2 1999. ISSN 1093-3263. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660911>.

Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. 2015.

SCHUTZ, C. N.; WARSHEL, A. What are the dielectric "constants" of proteins and how to validate electrostatic models? **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 44, n. 4, p. 400–417, 2001. ISSN 08873585.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase a2. **Science**, v. 250, p. 1541–1546, 1990. ISSN 00368075.

SEGELKE, B. W.; NGUYEN, D.; CHEE, R.; XUONG, N. H.; DENNIS, E. a. Structures of two novel crystal forms of naja naja naja phospholipase a2 lacking ca2+ reveal trimeric packing. **Journal of molecular biology**, v. 279, p. 223–232, 1998. ISSN 0022-2836.

SHARP, K. A.; HONIG, B. ELECTROSTATIC MACROMOLECULES : Theory and Applications. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 19, p. 301–332, 1990.

- SILVA, S. L. da; CALGAROTTO, A. K.; MASO, V.; DAMICO, D. C. S.; BALDASSO, P.; VEBER, C. L.; VILLAR, J. A. F. P.; OLIVEIRA, A. R. M.; COMAR, M.; OLIVEIRA, K. M. T.; MARANGONI, S. Molecular modeling and inhibition of phospholipase a₂ by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Elsevier Masson SAS, v. 44, p. 312–321, 2009. ISSN 02235234. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.043>.
- SIMONSON, T. Electrostatics and dynamics of proteins. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, n. 5, p. 737–787, 2003. ISSN 00344885.
- SIMONSON, T.; PERAHIAB, D.; PERAHIA, D. Polar fluctuations in proteins: molecular-dynamic studies of cytochrome c in aqueous solution. **Faraday Discussions**, v. 103, p. 71–90, 1996. ISSN 1359-6640. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9136636>.
- STERPONE, F.; STIRNEMANN, G.; LAAGE, D. Magnitude and molecular origin of water slowdown next to a protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 9, p. 4116–4119, 2012. ISSN 00027863.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, jan 2013. ISSN 1610-2940. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- SYSTÈMES, B. D. **Biovia Materials Studio package**. <https://3ds.com/products-services/biovia/products>: [S. n.], 2017.
- TAKEZAKO, T.; UNAL, H.; KARNIK, S. S.; NODE, K. Structure-Function Basis of Attenuated Inverse Agonism of Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers for Active-State Angiotensin II Type 1 Receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 488–501, sep 2015. ISSN 0026-895X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121982><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4551048><http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.115.099176>.
- TALLEY, K.; NG, C.; SHOPPELL, M.; KUNDROTAS, P.; ALEXOV, E. On the electrostatic component of protein-protein binding free energy. **PMC biophysics**, v. 1, n. 1, p. 2, 2008. ISSN 1757-5036.
- TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases a₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947–962, 2003. ISSN 00410101.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA–NA, jan 2009. ISSN 01928651. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499576><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3041641><http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21334>.
- VAITHEESWARAN, S.; YIN, H.; RASAIHAH, J. C.; HUMMER, G. Water clusters in nonpolar cavities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17002–17005, 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407968101>.

VELLA, F. Molecular biology of the cell (third edition). **Biochemical Education**, v. 22, p. 164, 7 1994. ISSN 03074412.

VICATOS, S.; ROCA, M.; WARSHEL, A. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 670–684, 2009. ISSN 08873585.

WARSHEL, A. Electrostatic Basis of Structure-Function Correlation in Proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 9, p. 284–290, 1981. ISSN 15204898.

WARSHEL, A.; PAPAZYAN, A. Electrostatic effects in macromolecules: fundamental concepts and practical modeling Arieh Warshel* and Arno Papazyant. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 211–217, 1998.

WARSHEL, A.; RUSSELL, S. T.; CHURG, A. K. Macroscopic models for studies of electrostatic interactions in proteins: limitations and applicability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 15, p. 4785–4789, 1984. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.81.15.4785>.

WARSHEL, A.; SHARMA, P. K.; KATO, M.; PARSON, W. W. Modeling electrostatic effects in proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1764, p. 1647–1676, 11 2006. ISSN 15709639.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 4 1953. ISSN 0028-0836.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. The structure of dna. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 123–131, 1 1953. ISSN 0091-7451.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002–8, may 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1851160>.

WHIRL-CARRILLO, M.; HUDDART, R.; GONG, L.; SANGKUHL, K.; THORN, C. F.; WHALEY, R.; KLEIN, T. E. An evidence-based framework for evaluating pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 110, p. 563–572, 9 2021. ISSN 0009-9236.

WHITE, S.; SCOTT, D.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M.; SIGLER, P. Crystal structure of cobra-venom phospholipase a2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v. 250, p. 1560–1563, 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/250/4987/1560.abstract>.

WHO. **World Health Organization**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.

WILSON, C. O.; GISVOLD, O. **Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. 12th edition. ed. [S. l.: s. n.], 2011. v. 1. 1-1022 p.

ZANATTA, G.; BARROSO-NETO, I. L.; JUNIOR, V. B.; DUTRA, M. F.; BEZERRA, E. M.; COSTA, R. F. da; CAETANO, E. W. S.; CAVADA, B. S.; FREIRE, V. N.; GOTTFRIED, C. Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex

with the Selective Antagonist Eticlopride. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 05, n. 07, 2012. ISSN 0974276X. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/quantum-biochemistry-description-of-the-human-dopamine-d3-receptor-in-complex-with-1000229.php?aid=7520>.

ZHANG, D. W.; CHEN, X. H.; ZHANG, J. Z. H. Molecular caps for full quantum mechanical computation of peptide-water interaction energy. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 15, p. 1846–1852, nov 2003. ISSN 0192-8651. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515367><http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.10346>.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 41, p. 157–67, 2 2008. ISSN 0001-4842. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516178><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18186612>.

ZHOU, H. X.; PANG, X. Poisson-Boltzmann calculations: Van der Waals or molecular surface? **Communications in Computational Physics**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2013. ISSN 18152406.

APÊNDICE A – TABELAS

Tabela 9 – Energia de interação de todos os aminoácidos da sACE com LPR e LST. LPR = lisinopril; LST = losartan; A_i = aminoácidos; sACE = átomo do aminoácido A_i que interage com o ligante; aLPR = átomo do LPR que interage com o aminoácido; aLST = átomo do LST que interage com o aminoácido; r_{LPR} (r_{LST}) é a distância dada em (Å) entre os átomo da sACE e o átomo do LPR (LST); $E_i(\text{LPR})$ ($E_i(\text{LST})$) é a energia de interação obtida através da estratégia MFCC do aminoácido A_i da sACE com o ligante LPR (LST).

sACE A_i	LPR				LST			
	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i
Leu1	C19-H	iii	21.7	1.82	C14-H3	iv	34.0	2.79
Asp2	C19-H	iii	23.6	-4.03	C14-H3	iv	35.9	-4.66
Pro3	C19-H	iii	27.3	0.21	C14-H3	iv	39.3	0.27
Gly4	C19-H	iii	25.7	0.31	C14-H3	iv	36.9	-0.04
Leu5	C19-H	iii	20.9	0.18	C14-H3	iv	32.8	0.16
Gln6	C19-H	iii	24.7	0.01	C14-H3	iv	36.0	-0.03
Pro7	C19-H	iii	25.0	-0.26	C14-H3	iv	35.7	0.01
Gly8	C19-H	iii	29.0	-0.20	C14-H3	iv	39.4	-0.19
Asn9	C20-H	iii	31.7	-0.51	C14-H3	iv	41.6	-0.17
Phe10	C20-H	iii	28.0	-0.49	C14-H3	iv	37.7	0.20
Ser11	C20-H	iii	32.8	-0.12	C14-H3	iv	41.3	-0.14
Ala12	C20-H	iii	33.4	0.08	C14-H3	iv	41.9	0.01
Asp13	C20-H	iii	32.9	-1.33	C14-H3	iv	40.7	-2.26
Glu14	C20-H	iii	31.7	-1.57	C14-H3	iv	38.4	-2.59
Ala15	C20-H	iii	33.5	0.09	C14-H3	iv	40.5	0.07
Gly16	C20-H	iii	31.1	0.10	C14-H3	iv	39.5	-0.33
Ala17	C20-H	iii	27.6	0.04	C14-H3	iv	35.5	-0.36
Gln18	C20-H	iii	27.8	-0.11	C14-H3	iv	35.3	-0.46
Leu19	C20-H	iii	28.8	-0.10	C14-H3	iv	37.4	-0.47
Phe20	C20-H	iii	23.2	0.03	C14-H3	iv	32.7	-0.36
Ala21	C20-H	iii	23.3	-0.13	C14-H3	iv	31.4	-0.50
Gln22	C20-H	iii	25.1	0.04	C14-H3	iv	33.3	-0.46
Ser23	C19-H	iii	23.9	-0.06	C14-H3	iv	33.3	-0.54
Tyr24	C19-H	iii	20.7	0.15	C14-H3	iv	30.3	-0.84
Asn25	C20-H	iii	20.0	-0.05	C14-H3	iv	28.3	-0.26
Ser26	C19-H	iii	21.6	-0.04	C14-H3	iv	31.3	-0.22
Ser27	C19-H	iii	19.5	0.05	C14-H3	iv	30.3	-0.54

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Ala28	C19-H	iii	16.3	0.22	C14-H3	iv	26.8	0.04
Glu29	C19-H	iii	16.1	-3.93	C14-H3	iv	26.0	-2.63
Gln30	C19-H	iii	16.6	-0.12	C14-H3	iv	27.8	-0.07
Val31	C19-H	iii	14.2	0.09	C14-H3	iv	26.1	-0.60
Leu32	C19-H	iii	11.1	-0.21	C14-H3	iv	21.9	-0.37
Phe33	C19-H	iii	13.3	-0.07	C14-H3	iv	23.6	-0.27
Gln34	C19-H	iii	12.9	-0.17	N6	vi	24.2	-0.41
Ser35	C19-H	iii	9.3	0.00	N6	vi	21.4	-0.66
Val36	C19-H	iii	8.2	-0.26	N6	vi	18.7	-0.62
Ala37	C19-H	iii	11.4	-0.10	N6	vi	21.4	-0.26
Ala38	C18-H	iii	11.1	-0.09	N6	vi	21.2	-0.63
Ser39	C18-H	iii	6.6	-0.12	N6	vi	17.2	-0.54
Trp40	C18-H	iii	8.1	-0.46	N6	vi	14.9	-0.46
Ala41	C18-H	iii	10.9	-0.24	C19-H	vi	19.5	-0.27
His42	C18-H	iii	9.2	0.13	C19-H	vi	16.7	0.25
Asp43	C18-H	iii	4.5	-5.89	N6	vi	13.6	-0.79
Thr44	C18-H	iii	9.7	0.03	C19-H	vi	15.4	0.16
Asn45	C18-H	iii	11.4	-0.12	C19-H	vi	17.4	-0.26
Ile46	C18-H	iii	10.1	0.02	C19-H	vi	14.2	-0.16
Thr47	C18-H	iii	14.1	0.01	C19-H	vi	19.8	-0.21
Ala48	C18-H	iii	17.2	0.16	C19-H	vi	22.8	-0.01
Glu49	C18-H	iii	17.4	0.09	C19-H	vi	24.8	-0.23
Asn50	C18-H	iii	13.5	0.19	C19-H	vi	20.9	-0.24
Ala51	C18-H	iii	13.0	0.08	C19-H	vi	20.8	-0.25
Arg52	C18-H	iii	16.2	1.96	C19-H	vi	24.5	5.84
Arg53	C19-H	iii	15.1	2.04	C19-H	vi	25.0	4.88
Gln54	C19-H	iii	8.8	0.43	N6	vi	19.5	0.06
Glu55	C19-H	iii	13.1	-3.76	C20-H	vi	23.1	-1.83
Glu56	C19-H	iii	15.5	0.13	C20-H	vi	26.5	-0.02
Ala57	C19-H	iii	12.8	0.17	N6	vi	24.5	-0.36
Ala58	C19-H	iii	11.3	0.18	N5	vi	23.2	-0.16
Leu59	C19-H	iii	15.1	0.12	N5	vi	27.0	-0.07
Leu60	C19-H	iii	16.4	-0.13	N5	vi	28.6	-0.40
Ser61	C19-H	iii	13.1	0.02	C14-H3	iv	25.1	-0.15
Gln62	C19-H	iii	13.7	-0.04	N5	vi	25.4	-0.16

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Glu63	C19-H	iii	17.8	-4.27	C14-H3	iv	29.9	-2.48
Phe64	C19-H	iii	17.2	-0.08	C14-H3	iv	28.9	-0.14
Ala65	C19-H	iii	15.5	0.21	C14-H3	iv	26.6	0.09
Glu66	C19-H	iii	19.1	-3.90	C14-H3	iv	30.4	-2.39
Ala67	C19-H	iii	21.3	-0.02	C14-H3	iv	32.5	-0.06
Trp68	C20-H	iii	20.9	-0.04	C14-H3	iv	31.1	-0.20
Gly69	C20-H	iii	20.7	0.03	C14-H3	iv	30.6	-0.05
Gln70	C20-H	iii	22.8	0.22	C14-H3	iv	33.1	-0.13
Lys71	C20-H	iii	24.6	-0.01	C14-H3	iv	34.6	-0.32
Ala72	C20-H	iii	23.2	0.07	C14-H3	iv	32.4	0.01
Lys73	C20-H	iii	22.5	0.15	C14-H3	iv	31.7	3.72
Glu74	C20-H	iii	27.3	0.05	C14-H3	iv	36.7	0.00
Leu75	C20-H	iii	29.1	0.13	C14-H3	iv	38.3	0.17
Tyr76	C20-H	iii	26.8	0.22	C14-H3	iv	35.3	0.09
Glu77	C20-H	iii	25.9	-3.52	C14-H3	iv	33.7	-2.61
Pro78	C20-H	iii	30.6	0.04	C14-H3	iv	38.2	0.07
Ile79	C20-H	iii	30.9	0.22	C14-H3	iv	37.9	0.00
Trp80	C20-H	iii	26.7	0.06	C14-H3	iv	33.5	-0.14
Gln81	C20-H	iii	27.8	-0.07	C14-H3	iv	33.2	-0.07
Asn82	C20-H	iii	30.5	0.09	C14-H3	iv	36.2	0.16
Phe83	C20-H	iii	28.1	0.06	C14-H3	iv	34.4	-0.41
Thr84	C20-H	iii	30.7	0.26	C14-H3	iv	35.1	0.08
Asp85	C20-H	iii	27.2	-3.57	C14-H3	iv	32.5	-2.89
Pro86	C20-H	iii	24.2	0.15	C14-H3	iv	29.3	0.06
Gln87	C20-H	iii	22.9	0.11	C14-H3	iv	27.5	0.05
Leu88	C20-H	iii	23.7	-0.10	C14-H3	iv	29.9	-0.55
Arg89	C20-H	iii	23.3	0.03	C14-H3	iv	29.7	-0.47
Arg90	C20-H	iii	19.2	0.12	C14-H3	iv	25.4	-0.40
Ile91	C20-H	iii	19.2	0.15	C14-H3	iv	26.3	-0.50
Ile92	C20-H	iii	21.4	-0.30	C14-H3	iv	29.3	-0.25
Gly93	C20-H	iii	18.9	-0.07	C14-H3	iv	26.5	-0.29
Ala94	C20-H	iii	15.6	0.11	C14-H3	iv	23.6	-0.11
Val95	C20-H	iii	17.9	-0.08	C14-H3	iv	27.0	-0.30
Arg96	C20-H	iii	19.8	-0.33	C14-H3	iv	28.1	2.56
Thr97	C20-H	iii	15.0	-0.94	C14-H3	iv	23.7	-0.96

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Leu98	C20-H	iii	14.4	-0.01	C14-H3	iv	24.6	-0.36
Gly99	C20-H	iii	14.1	0.16	C14-H3	iv	23.8	0.00
Ser100	C20-H	iii	12.9	-0.07	C14-H3	iv	23.4	-0.78
Ala101	C20-H	iii	15.5	0.32	C14-H3	iv	26.2	-0.35
Asn102	C20-H	iii	18.1	-0.10	C14-H3	iv	28.0	-0.10
Leu103	C19-H	iii	16.6	-0.17	N5	vi	26.3	-0.38
Pro104	C19-H	iii	21.2	-0.03	N5	vi	31.7	-0.22
Leu105	C19-H	iii	20.7	0.07	N5	vi	31.4	-0.43
Ala106	C19-H	iii	20.6	0.07	C20-H	vi	30.5	-0.16
Lys107	C19-H	iii	18.0	0.59	N5	vi	27.7	4.14
Arg108	C19-H	iii	15.8	0.52	N5	vi	26.4	3.06
Gln109	C19-H	iii	16.8	-0.04	C20-H	vi	26.3	-0.84
Gln110	C19-H	iii	15.9	-0.20	C20-H	vi	24.5	-0.70
Tyr111	C20-H	iii	10.8	-0.30	N5	vi	20.1	-0.72
Asn112	C19-H	iii	11.8	0.13	C20-H	vi	21.7	-0.41
Ala113	C19-H	iii	13.8	-0.08	C20-H	vi	21.0	-0.54
Leu114	C19-H	iii	12.5	-0.24	C20-H	vi	18.6	-0.73
Leu115	C19-H	iii	8.2	-0.06	C20-H	vi	16.8	-0.81
Ser116	C18-H	iii	10.2	0.18	C20-H	vi	17.2	-0.48
Asn117	C18-H	iii	12.6	-0.14	C20-H	vi	16.4	-0.50
Met118	C19-H	iii	10.6	-0.22	C20-H	vi	13.7	-1.03
Ser119	C18-H	iii	7.2	-0.40	C20-H	vi	12.3	-0.54
Arg120	C18-H	iii	10.9	0.37	C19-H	vi	14.1	2.20
Ile121	C18-H	iii	12.8	-0.82	C19-H	vi	13.2	-1.10
Tyr122	C13-H2	i	7.4	0.14	C20-H	vi	5.2	0.12
Ser123	C17-H	iii	9.1	-0.01	C19-H	vi	8.8	-0.54
Thr124	C18-H	iii	13.5	-0.29	C19-H	vi	12.1	-0.52
Ala125	C13-H2	i	14.0	-0.92	C19-H	vi	11.3	-1.32
Lys126	C13-H2	i	15.1	1.98	C19-H	vi	12.1	3.45
Val127	N3-H3	i	15.2	-0.20	C19-H	vi	12.1	-0.16
Cys128	N3-H3	i	19.8	0.10	C19-H	vi	16.8	0.02
Leu129	N3-H3	i	20.3	0.09	C19-H	vi	17.7	-0.43
Pro130	N3-H3	i	23.7	-0.22	C19-H	vi	21.0	-0.24
Asn131	N3-H3	i	27.8	-0.12	C19-H	vi	25.1	-0.07
Lys132	N3-H3	i	25.8	0.02	C19-H	vi	23.0	-0.27

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Thr133	N3-H3	i	25.8	0.12	C19-H	vi	23.0	-0.03
Ala134	N3-H3	i	22.7	-0.02	C19-H	vi	20.1	-0.44
Thr135	N3-H3	i	20.2	0.00	C19-H	vi	17.7	-0.20
Cys136	N3-H3	i	17.4	0.09	C19-H	vi	14.8	-0.27
Trp137	N3-H3	i	14.3	0.20	C19-H	vi	11.7	-0.24
Ser138	N3-H3	i	10.9	-0.26	C19-H	vi	8.4	-0.77
Leu139	C13-H2	i	6.8	-0.30	C19-H	vi	3.8	-0.59
Asp140	N3-H3	i	6.0	-9.45	C18-H	vi	4.1	-1.13
Pro141	N3-H3	i	8.0	-0.22	C18-H	vi	5.8	0.12
Asp142	N3-H3	i	10.9	-5.58	C18-H	vi	8.7	-1.66
Leu143	N3-H3	i	9.8	0.20	C19-H	vi	7.1	-0.17
Thr144	N3-H3	i	5.0	-0.62	C18-H	vi	3.3	-2.35
Asn145	N3-H3	i	8.9	-0.54	C18-H	vi	6.9	-0.32
Ile146	N3-H3	i	11.3	0.17	C18-H	vi	9.4	-0.32
Leu147	N3-H3	i	9.6	0.22	C19-H	vi	8.0	-0.30
Ala148	N3-H3	i	8.3	0.29	C17-H	vi	7.4	-0.29
Ser149	N3-H3	i	12.2	0.11	C18-H	vi	11.0	0.03
Ser150	N3-H3	i	14.2	-0.11	C18-H	vi	13.0	-0.57
Arg151	N3-H3	i	15.0	1.29	C7-H	v	12.9	2.89
Ser152	N3-H3	i	19.0	-0.10	C18-H	vi	17.7	-0.77
Tyr153	N3-H3	i	20.3	-0.04	C19-H	vi	18.6	-0.38
Ala154	N3-H3	i	20.7	0.24	C19-H	vi	18.7	-0.43
Met155	N3-H3	i	17.3	-0.03	C18-H	vi	15.5	-0.59
Leu156	N3-H3	i	14.5	-0.01	C6-H	v	13.3	-0.61
Leu157	N3-H3	i	18.5	0.15	C19-H	vi	16.4	-0.42
Phe158	N3-H3	i	18.0	0.13	C19-H	vi	15.3	-0.31
Ala159	N3-H3	i	13.6	0.09	C19-H	vi	11.2	-0.43
Trp160	C9-O4-O5	i	13.0	0.15	C19-H	vi	11.7	0.18
Glu161	N3-H3	i	17.3	-3.65	C19-H	vi	14.7	-1.91
Gly162	N3-H3	i	16.8	0.10	C19-H	vi	13.6	-0.05
Trp163	C13-H2	i	10.0	-0.54	C20-H	vi	7.6	-0.98
His164	C9-O4-O5	i	12.1	0.63	C20-H	vi	10.2	-0.24
Asn165	C9-O4-O5	i	17.5	0.33	C19-H	vi	14.8	-0.87
Ala166	C13-H2	i	16.2	-0.11	C19-H	vi	13.2	-0.43
Ala167	C9-O4-O5	i	13.2	-0.07	C19-H	vi	10.8	-0.42

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Gly168	C9-O4-O5	i	15.2	0.06	C20-H	vi	13.9	-0.45
Ile169	C9-O4-O5	i	18.2	0.33	C20-H	vi	16.6	-0.89
Pro170	C18-H	iii	18.1	0.04	C20-H	vi	16.3	-0.21
Leu171	C15-H2	iii	13.1	-0.02	C20-H	vi	12.5	-0.31
Lys172	C9-O4-O5	i	18.4	-0.42	C20-H	vi	18.0	3.20
Pro173	C19-H	iii	19.7	0.02	C20-H	vi	20.2	-0.46
Leu174	C19-H	iii	15.2	-0.13	C20-H	vi	18.8	-0.79
Tyr175	C20-H	iii	11.7	0.46	N5	vi	15.2	0.23
Glu176	C20-H	iii	18.2	-1.59	C20-H	vi	21.0	-2.11
Asp177	C19-H	iii	17.8	-1.81	C20-H	vi	23.0	-2.22
Phe178	C20-H	iii	10.3	0.14	N5	vi	17.8	0.01
Thr179	C20-H	iii	15.2	0.13	N5	vi	19.9	-0.08
Ala180	C20-H	iii	18.2	0.17	N5	vi	24.1	-0.12
Leu181	C19-H	iii	16.6	-0.10	N5	vi	24.4	-0.37
Ser182	C20-H	iii	12.6	0.31	C14-H3	iv	20.6	-0.20
Asn183	C20-H	iii	16.5	0.35	C14-H3	iv	23.4	0.12
Glu184	C20-H	iii	19.0	-3.57	C14-H3	iv	26.8	-2.12
Ala185	C20-H	iii	15.6	-0.16	C14-H3	iv	24.9	-0.07
Tyr186	C20-H	iii	11.3	0.12	C14-H3	iv	20.5	0.00
Lys187	C20-H	iii	19.3	-0.46	C14-H3	iv	27.3	3.53
Gln188	C20-H	iii	20.3	0.13	C14-H3	iv	28.5	0.05
Asp189	C20-H	iii	17.2	-3.34	C14-H3	iv	26.2	-2.30
Gly190	C20-H	iii	21.6	0.08	C14-H3	iv	28.3	0.01
Phe191	C20-H	iii	16.2	-0.46	C14-H3	iv	23.6	-0.03
Thr192	C20-H	iii	20.0	0.36	C14-H3	iv	25.3	0.52
Asp193	C20-H	iii	17.0	-3.16	C14-H3	iv	22.1	-2.30
Thr194	C20-H	iii	11.7	0.71	C14-H3	iv	18.3	0.56
Gly195	C20-H	iii	14.5	0.18	C14-H3	iv	18.2	-0.57
Ala196	C20-H	iii	16.6	0.13	C14-H3	iv	20.7	-0.33
Tyr197	C20-H	iii	10.6	0.05	C14-H3	iv	18.6	-0.15
Trp198	C20-H	iii	8.9	0.34	C14-H3	iv	13.6	-0.28
Arg199	C21-H	iii	14.4	-2.07	C14-H3	iv	16.7	2.20
Ser200	C20-H	iii	15.4	-0.08	C14-H3	iv	19.2	-0.34
Trp201	C20-H	iii	7.7	-0.11	C14-H3	iv	13.2	-0.40
Tyr202	C21-H	iii	11.0	0.04	C14-H3	iv	11.6	-0.19

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Asn203	C21-H	iii	17.8	0.05	C14-H3	iv	20.2	-0.29
Ser204	C21-H	iii	20.3	0.15	C14-H3	iv	20.5	-0.18
Pro205	C21-H	iii	23.4	0.35	C14-H3	iv	24.3	-0.55
Thr206	C6-H2	i	22.1	0.03	C14-H3	iv	22.1	-0.33
Phe207	C6-H2	i	14.3	0.45	C14-H3	iv	14.0	-0.02
Glu208	C6-H2	i	18.5	-1.13	C14-H3	iv	18.6	-2.26
Asp209	C6-H2	i	21.0	-0.27	C13-H2	iv	21.2	-2.56
Asp210	C6-H2	i	19.0	-1.41	C13-H2	iv	19.0	-2.60
Leu211	C6-H2	i	14.2	0.18	C13-H2	iv	14.4	0.21
Glu212	C6-H2	i	18.4	-3.03	C13-H2	iv	18.7	-2.73
His213	C6-H2	i	20.1	0.14	C13-H2	iv	20.0	0.14
Leu214	C6-H2	i	15.6	0.08	C13-H2	iv	15.1	-0.96
Tyr215	C6-H2	i	13.5	0.01	C11-H2	iv	12.9	-0.37
Gln216	C6-H2	i	19.3	-0.09	C11-H2	iv	18.9	-0.70
Gln217	C6-H2	i	19.6	-0.03	C11-H2	iv	18.6	-0.48
Leu218	C6-H2	i	13.9	0.16	C11-H2	iv	12.9	0.01
Glu219	C6-H2	i	17.3	-3.10	C11-H2	iv	16.2	-2.85
Pro220	C6-H2	i	20.1	-0.18	C11-H2	iv	18.4	-0.10
Leu221	C6-H2	i	16.3	-0.06	C11-H2	iv	14.3	-0.44
Tyr222	C6-H2	i	13.2	-0.03	C11-H2	iv	11.8	-0.47
Leu223	C6-H2	i	18.5	0.09	C11-H2	iv	16.8	-0.56
Asn224	C6-H2	i	19.9	-0.12	C1-H2	v	17.7	-0.30
Leu225	C6-H2	i	14.0	-0.08	C1-H2	v	10.8	-0.41
His226	C6-H2	i	17.0	0.14	C1-H2	v	15.3	-0.18
Ala227	C6-H2	i	20.6	0.02	C1-H2	v	18.5	-0.79
Phe228	C6-H2	i	20.1	-0.16	C1-H2	v	16.3	-0.25
Val229	C6-H2	i	16.6	-0.06	C1-H2	v	13.0	-0.34
Arg230	C6-H2	i	20.4	0.54	C1-H2	v	17.6	4.49
Arg231	C6-H2	i	22.7	0.30	C1-H2	v	19.7	3.19
Ala232	C6-H2	i	21.4	-0.33	C1-H2	v	17.6	-0.88
Leu233	C6-H2	i	18.0	-0.05	C7-H	v	14.8	-0.43
His234	C6-H2	i	24.0	0.11	C7-H	v	20.9	-0.23
Arg235	C6-H2	i	25.2	0.92	C1-H2	v	21.0	3.92
Arg236	N3-H3	i	21.5	0.93	C1-H2	v	19.2	3.01
Tyr237	N3-H3	i	19.0	-0.28	C7-H	v	17.1	-0.63

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Gly238	N3-H3	i	27.0	0.34	C7-H	v	24.1	0.17
Asp239	C6-H2	i	29.7	-4.14	C7-H	v	26.8	-2.53
Arg240	C9-O4-O5	i	28.6	0.08	C6-H	v	26.2	0.04
Tyr241	N3-H3	i	24.4	0.10	C6-H	v	22.0	0.04
Ile242	C6-H2	i	22.1	0.05	C7-H	v	19.3	-0.22
Asn243	C6-H2	i	25.0	-0.06	C7-H	v	22.7	-0.46
Leu244	C6-H2	i	26.1	0.04	C7-H	v	23.4	-0.27
Arg245	C6-H2	i	26.8	-0.23	C7-H	v	25.2	2.95
Gly246	C6-H2	i	23.2	-0.21	C7-H	v	21.6	-0.64
Pro247	C9-O4-O5	i	20.0	-0.40	C7-H	v	19.2	0.05
Ile248	C6-H2	i	17.3	-0.07	C7-H	v	15.2	-0.16
Pro249	C9-O4-O5	i	17.5	-0.06	C6-H	v	15.3	-0.16
Ala250	C9-O4-O5	i	13.9	0.28	C6-H	v	11.9	-0.22
His251	N3-H3	i	14.5	-0.18	C6-H	v	12.3	-0.23
Leu252	N3-H3	i	15.8	-0.20	C7-H	v	13.0	-0.31
Leu253	N3-H3	i	12.5	0.01	C7-H	v	8.9	-0.25
Gly254	N3-H3	i	9.5	-0.19	C6-H	v	7.7	-0.22
Asp255	C9-O4-O5	i	6.4	1.76	C6-H	v	3.3	3.24
Met256	N3-H3	i	8.1	-0.01	C20-H	vi	5.9	-1.18
Trp257	C13-H2	i	4.8	2.10	C20-H	vi	2.6	-5.18
Ala258	C9-O4-O5	i	9.3	-0.55	C6-H	v	7.3	-2.04
Gln259	C6-H2	i	2.2	-1.92	N4-H	vi	2.1	-8.83
Ser260	C6-H2	i	5.5	-0.51	C7-H	v	2.3	-5.27
Trp261	C6-H2	i	10.1	-0.11	C1-H2	v	6.5	0.02
Glu262	C7-H2	i	7.3	-5.00	C1-H2	v	2.5	-16.25
Asn263	N3-H3	i	8.1	0.20	C7-H	v	6.2	-0.04
Ile264	N3-H3	i	13.7	-0.03	C1-H2	v	9.6	0.07
Tyr265	N3-H3	i	14.8	0.45	C15-H2	iv	10.1	0.59
Asp266	N3-H3	i	16.8	-4.24	C1-H2	v	13.0	-2.76
Met267	N3-H3	i	18.7	0.14	C1-H2	v	14.8	0.36
Val268	C6-H2	i	17.7	0.08	C1-H2	v	13.3	-0.04
Val269	N3-H3	i	20.6	0.32	C15-H2	iv	15.3	0.01
Pro270	C7-H2	i	21.3	-0.32	C15-H2	iv	16.0	0.04
Phe271	C7-H2	i	24.5	0.18	C15-H2	iv	19.0	-0.07
Pro272	N3-H3	i	24.9	-0.30	C15-H2	iv	19.3	-0.22

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Asp273	N3-H3	i	26.4	-0.02	C15-H2	iv	21.2	-0.12
Lys274	N3-H3	i	25.1	1.33	C15-H2	iv	19.4	3.89
Pro275	N3-H3	i	23.3	-0.03	C15-H2	iv	17.1	-0.59
Asn276	N3-H3	i	20.0	-0.14	C15-H2	iv	14.6	-0.28
Leu277	N3-H3	i	16.5	-0.04	C15-H2	iv	10.3	-0.20
Asp278	N3-H3	i	15.3	0.06	C15-H2	iv	10.2	0.04
Val279	N3-H3	i	14.3	-0.07	O-H	iv	10.3	-0.02
Thr280	N3-H3	i	12.6	-0.17	O-H	iv	9.3	0.11
Ser281	N3-H3	i	15.9	-0.36	O-H	iv	12.9	0.02
Thr282	N3-H3	i	17.6	0.12	O-H	iv	14.2	-0.08
Met283	N3-H3	i	12.1	0.02	O-H	iv	8.8	-0.04
Leu284	N3-H3	i	13.8	0.06	C17-H	vi	13.4	-0.09
Gln285	N3-H3	i	18.9	0.00	O-H	iv	17.0	-0.05
Gln286	N3-H3	i	20.0	-0.08	O-H	iv	17.4	0.25
Gly287	N3-H3	i	19.5	0.11	O-H	iv	18.2	0.00
Trp288	N3-H3	i	14.6	-0.32	O-H	iv	12.0	-0.10
Asn289	N3-H3	i	14.8	-0.15	O-H	iv	14.8	-0.54
Ala290	N3-H3	i	11.5	-0.09	C17-H	vi	12.6	-0.05
Thr291	N3-H3	i	14.7	-0.05	C4-H	v	15.5	-0.15
His292	N3-H3	i	15.9	0.16	O-H	iv	14.6	-0.02
Met293	N3-H3	i	8.5	0.17	O-H	iv	7.9	-0.13
Phe294	C11-H2	i	8.5	0.24	C4-H	v	10.0	0.17
Arg295	C12-H2	i	15.6	2.47	O-H	iv	14.8	2.80
Val296	C12-H2	i	15.7	0.13	O-H	iv	12.9	-0.40
Ala297	C11-H2	i	12.5	0.35	O-H	iv	10.6	0.15
Glu298	C11-H2	i	15.5	-1.35	C9-Cl	iv	14.3	-2.24
Glu299	C11-H2	i	18.4	-1.45	C15-H2	iv	16.6	-2.65
Phe300	C8-H2	i	16.6	0.01	C9-Cl	iv	12.5	-0.03
Phe301	C3-O3-O2	iii	11.5	0.16	C9-Cl	iv	10.7	0.01
Thr302	C3-O3-O2	iii	19.0	0.02	C9-Cl	iv	17.1	-0.09
Ser303	C3-O3-O2	iii	21.4	0.26	C9-Cl	iv	17.7	-0.02
Leu304	C3-O3-O2	iii	17.6	-0.01	C9-Cl	iv	14.2	-0.34
Glu305	C3-O3-O2	iii	21.9	0.49	C9-Cl	iv	20.0	-0.60
Leu306	C3-O3-O2	iii	16.6	-0.07	C9-Cl	iv	15.8	-0.05
Ser307	C3-O3-O2	iii	17.4	0.11	C9-Cl	iv	18.5	0.07

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Pro308	C3-O3-O2	iii	17.9	-0.06	C9-C1	iv	18.9	-0.04
Met309	C3-O3-O2	iii	13.4	-0.02	C9-C1	iv	15.4	-0.06
Pro310	C3-O3-O2	iii	16.1	-0.20	C14-H3	iv	20.1	-0.14
Pro311	C14-H2	iii	20.0	0.06	C4-H	v	23.6	0.43
Glu312	C14-H2	iii	17.6	-4.09	C4-H	v	22.2	-2.45
Phe313	C3-O3-O2	iii	11.1	-0.17	C4-H	v	14.7	0.00
Trp314	C11-H2	i	16.8	-0.27	C4-H	v	19.4	-0.13
Glu315	C18-H	iii	17.6	-0.21	C4-H	v	21.5	-0.16
Gly316	C18-H	iii	13.7	-0.03	C4-H	v	19.3	-0.21
Ser317	C17-H	iii	13.2	0.27	C4-H	v	16.2	0.16
Met318	C17-H	iii	10.0	-0.31	C18-H	vi	11.7	0.19
Leu319	C12-H2	i	10.6	-0.29	C18-H	vi	12.2	-0.08
Glu320	N3-H3	i	11.0	-5.56	C18-H	vi	11.6	-2.77
Lys321	C13-H2	i	10.3	0.00	C18-H	vi	9.9	-0.37
Pro322	C13-H2	i	12.3	-0.24	C18-H	vi	13.1	-0.12
Ala323	C13-H2	i	17.4	0.05	C18-H	vi	17.3	-0.10
Asp324	C13-H2	i	19.1	0.15	C18-H	vi	19.2	-0.44
Gly325	C13-H2	i	17.9	0.12	C18-H	vi	17.4	-0.18
Arg326	C18-H	iii	14.5	2.88	C19-H	vi	15.6	1.51
Glu327	C18-H	iii	13.2	-0.11	C19-H	vi	14.3	-1.72
Val328	C18-H	iii	9.7	0.08	C19-H	vi	10.7	-0.48
Val329	C18-H	iii	5.1	-0.81	C19-H	vi	9.3	-0.37
Cys330	C13-H2	i	5.1	-1.46	C18-H	vi	6.3	-0.76
His331	C11-H2	i	2.6	-5.57	N6	vi	2.5	-9.35
Ala332	C10-H2	i	1.7	-28.67	N6	vi	5.1	1.00
Ser333	C17-H	iii	2.2	-16.29	C14-H3	iv	8.1	1.12
Ala334	C14-H2	iii	3.8	-1.22	C14-H3	iv	10.1	0.26
Trp335	C18-H	iii	4.4	0.44	N6	vi	12.3	0.21
Asp336	C19-H	iii	8.5	-3.57	C14-H3	iv	15.9	-2.30
Phe337	C18-H	iii	11.1	0.13	C14-H3	iv	18.8	0.12
Tyr338	C19-H	iii	9.6	0.34	C14-H3	iv	18.2	-0.16
Asn339	C19-H	iii	15.5	0.00	C14-H3	iv	23.0	-0.37
Arg340	C19-H	iii	17.1	0.39	C14-H3	iv	23.5	-0.24
Lys341	C19-H	iii	17.9	0.17	C14-H3	iv	23.7	0.10
Asp342	C18-H	iii	14.2	-4.28	C14-H3	iv	20.4	-2.36

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Phe343	C14-H2	iii	12.6	-0.26	C14-H3	iv	17.4	-0.15
Arg344	C14-H2	iii	9.1	0.25	C14-H3	iv	14.6	0.04
Ile345	C11-H2	i	7.1	0.32	C4-H	v	10.9	0.40
Lys346	C17-H	iii	4.8	5.78	N6	vi	10.0	1.28
Gln347	C12-H2	i	4.6	0.86	C4-H	v	6.8	-0.35
Cys348	C13-H2	i	6.1	-0.37	C18-H	vi	6.9	-0.03
Thr349	N3-H3	i	6.8	1.22	C17-H	vi	7.9	0.30
Arg350	N3-H3	i	6.9	4.54	C17-H	vi	7.5	2.52
Val351	N3-H3	i	9.8	0.26	O-H	iv	9.9	-0.09
Thr352	N3-H3	i	7.3	-0.41	O-H	iv	6.2	0.17
Met353	N3-H3	i	9.1	-0.54	O-H	iv	4.3	0.18
Asp354	N3-H3	i	5.7	-7.38	O-H	iv	1.8	-18.46
Gln355	N3-H3	i	2.1	-2.02	C17-H	vi	3.2	-3.30
Leu356	N3-H3	i	8.1	-0.27	O-H	iv	5.0	0.16
Ser357	C8-H2	i	7.2	1.41	C15-H2	iv	2.3	-3.53
Thr358	C12-H2	i	2.2	-6.32	C3-H	v	2.4	-9.32
Val359	C12-H2	i	6.8	0.05	O-H	iv	5.8	-1.75
His360	C8-H2	i	8.7	-0.43	C9-Cl	iv	5.9	-1.95
His361	C2-H	i	3.1	1.62	C14-H3	iv	3.8	-10.55
Glu362	C11-H2	i	2.7	-2.15	C14-H3	iv	5.9	-0.41
Met363	C3-O3-O2	iii	7.9	0.60	C9-Cl	iv	9.8	-0.18
Gly364	C3-O3-O2	iii	8.3	0.39	C9-Cl	iv	9.4	0.03
His365	C3-O3-O2	iii	3.5	5.07	C14-H3	iv	6.9	-3.87
Ile366	C3-O3-O2	iii	8.3	0.37	C14-H3	iv	12.0	0.11
Gln367	C3-O3-O2	iii	10.8	0.26	C9-Cl	iv	13.9	0.15
Tyr368	C3-O3-O2	iii	10.4	-0.90	C14-H3	iv	12.7	0.27
Tyr369	C14-H2	iii	6.8	-0.28	C14-H3	iv	12.1	0.30
Leu370	C3-O3-O2	iii	13.8	0.09	C14-H3	iv	17.7	-0.15
Gln371	C3-O3-O2	iii	15.5	-0.01	C9-Cl	iv	18.5	0.03
Tyr372	C20-H	iii	11.6	0.10	C14-H3	iv	15.9	-0.11
Lys373	C20-H	iii	17.4	1.71	C14-H3	iv	21.5	2.75
Asp374	C3-O3-O2	iii	20.4	-3.29	C14-H3	iv	24.2	-3.91
Leu375	C20-H	iii	19.1	-0.22	C14-H3	iv	24.2	-0.14
Pro376	C20-H	iii	17.6	-0.46	C14-H3	iv	24.6	-0.20
Val377	C20-H	iii	14.6	0.03	C14-H3	iv	22.5	-0.24

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Ser378	C20-H	iii	14.8	0.38	C14-H3	iv	22.6	0.11
Leu379	C20-H	iii	15.0	0.05	C14-H3	iv	21.0	-0.33
Arg380	C20-H	iii	12.3	0.16	C14-H3	iv	17.6	0.01
Arg381	C20-H	iii	10.3	-1.23	C14-H3	iv	16.2	2.87
Gly382	C21-H	iii	11.6	-0.31	C14-H3	iv	15.2	-0.93
Ala383	C3-O3-O2	iii	14.7	-0.09	C14-H3	iv	16.6	-0.02
Asn384	C3-O3-O2	iii	11.2	0.22	C14-H3	iv	12.8	-0.75
Pro385	C21-H	iii	7.8	1.09	C14-H3	iv	9.6	-0.77
Gly386	C3-O3-O2	iii	9.4	0.56	C14-H3	iv	9.4	-0.95
Phe387	C3-O3-O2	iii	10.4	0.10	C14-H3	iv	11.4	-0.75
His388	C3-O3-O2	iii	6.9	-0.41	C14-H3	iv	9.0	-0.06
Glu389	C3-O3-O2	iii	3.2	4.38	C14-H3	iv	5.0	-11.20
Ala390	C7-H2	i	8.4	0.28	C9-Cl	iv	7.7	-0.33
Ile391	C3-O3-O2	iii	9.7	-0.21	C9-Cl	iv	9.1	-0.21
Gly392	C8-H2	i	8.6	-0.50	C9-Cl	iv	6.1	0.10
Asp393	C7-H2	i	5.4	-1.69	C9-Cl	iv	3.3	6.83
Val394	C7-H2	i	10.2	-0.36	C9-Cl	iv	7.1	0.04
Leu395	C7-H2	i	12.4	-0.01	C9-Cl	iv	8.2	-0.80
Ala396	C7-H2	i	9.5	-0.16	C9-Cl	iv	4.2	-0.95
Leu397	C7-H2	i	11.4	-0.26	C9-Cl	iv	6.7	-0.62
Ser398	C7-H2	i	14.7	0.06	C9-Cl	iv	9.5	-0.28
Val399	C7-H2	i	13.7	0.03	C15-H2	iv	7.9	-0.69
Ser400	C7-H2	i	12.3	-0.04	C15-H2	iv	5.9	-0.37
Thr401	C7-H2	i	16.4	0.10	C15-H2	iv	10.2	-0.52
Pro402	C7-H2	i	19.1	0.07	C15-H2	iv	12.7	-0.57
Glu403	C7-H2	i	21.5	-0.02	C15-H2	iv	15.0	-0.08
His404	C7-H2	i	18.0	-0.01	C15-H2	iv	11.9	0.01
Leu405	C7-H2	i	16.4	0.08	C15-H2	iv	9.8	-0.27
His406	C7-H2	i	22.4	-0.07	C15-H2	iv	15.7	-0.15
Lys407	C7-H2	i	23.4	0.14	C15-H2	iv	16.9	-0.02
Ile408	N3-H3	i	18.1	-0.01	C15-H2	iv	12.8	0.03
Gly409	N3-H3	i	22.0	0.09	C15-H2	iv	17.2	-0.02
Leu410	N3-H3	i	18.5	0.02	C15-H2	iv	13.4	-0.06
Leu411	N3-H3	i	20.3	-0.01	C15-H2	iv	13.9	-0.22
Asp412	N3-H3	i	23.8	0.06	C15-H2	iv	18.5	-0.02

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Arg413	N3-H3	i	25.9	0.00	C15-H2	iv	19.8	0.28
Val414	C7-H2	i	27.3	-0.12	C15-H2	iv	20.6	0.49
Thr415	C7-H2	i	27.3	-0.02	C15-H2	iv	20.8	0.08
Asn416	C7-H2	i	27.4	0.18	C15-H2	iv	21.1	0.15
Asp417	C7-H2	i	27.2	-4.25	C15-H2	iv	21.3	-2.54
Thr418	C7-H2	i	26.0	0.03	C15-H2	iv	20.6	0.24
Glu419	C7-H2	i	25.0	-4.03	C15-H2	iv	19.3	-3.17
Ser420	C7-H2	i	22.7	0.03	C15-H2	iv	16.9	0.08
Asp421	C7-H2	i	21.7	-4.14	C15-H2	iv	16.4	-2.99
Ile422	C7-H2	i	20.7	-0.07	C15-H2	iv	15.6	-0.08
Asn423	C7-H2	i	18.8	0.16	C15-H2	iv	13.3	-0.48
Tyr424	C7-H2	i	15.8	-0.09	C15-H2	iv	9.6	-0.49
Leu425	C7-H2	i	16.7	0.01	C15-H2	iv	12.3	-0.30
Leu426	C7-H2	i	15.5	0.19	C15-H2	iv	11.1	-0.44
Lys427	C7-H2	i	12.2	2.52	C15-H2	iv	5.8	3.98
Met428	C7-H2	i	11.6	-0.27	C9-C1	iv	6.7	-0.89
Ala429	C6-H2	i	12.5	0.15	C1-H2	v	9.4	-0.52
Leu430	C6-H2	i	10.3	0.59	C1-H2	v	6.7	-0.01
Glu431	C7-H2	i	6.8	-2.55	C15-H2	iv	2.6	-8.86
Lys432	C7-H2	i	6.2	2.09	C9-C1	iv	2.7	-11.99
Ile433	C6-H2	i	11.3	0.18	C11-H2	iv	8.7	-0.07
Ala434	C6-H2	i	9.9	0.15	C1-H2	v	7.7	-0.12
Phe435	C6-H2	i	3.4	-1.86	C13-H2	iv	3.3	-2.52
Leu436	C6-H2	i	9.2	0.76	C11-H2	iv	7.8	0.57
Pro437	C6-H2	i	11.0	-0.29	C11-H2	iv	9.8	-0.36
Phe438	C9-O4-O5	i	4.5	-0.20	N3	vi	5.9	-0.48
Gly439	C6-H2	i	6.9	0.51	C13-H2	iv	7.1	-0.82
Tyr440	C6-H2	i	9.9	0.49	C13-H2	iv	10.1	-0.22
Leu441	C9-O4-O5	i	10.1	-0.53	C13-H2	iv	11.1	-0.79
Val442	C9-O4-O5	i	7.0	-0.04	C13-H2	iv	8.8	0.13
Asp443	C5-H	i	10.3	-0.58	C14-H3	iv	11.2	-1.10
Gln444	C9-O4-O5	i	13.0	-0.25	C13-H2	iv	13.8	-0.08
Trp445	C9-O4-O5	i	12.8	-0.10	N5	vi	14.9	-0.51
Arg446	C21-H	iii	8.0	-5.35	C14-H3	iv	10.3	0.61
Trp447	C21-H	iii	13.2	-0.07	C14-H3	iv	14.5	-0.90

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Gly448	C9-O4-O5	i	17.7	-0.01	C14-H3	iv	19.0	-0.28
Val449	C9-O4-O5	i	16.7	-0.12	N5	vi	18.7	-0.20
Phe450	C20-H	iii	11.7	-0.04	C14-H3	iv	16.4	-0.30
Ser451	C20-H	iii	19.3	-0.04	C14-H3	iv	22.1	-0.29
Gly452	C20-H	iii	21.2	-0.02	C14-H3	iv	24.1	-0.29
Arg453	C9-O4-O5	i	18.7	-2.14	C13-H2	iv	19.9	2.39
Thr454	C9-O4-O5	i	19.2	-0.03	N3	vi	21.0	-0.50
Pro455	C9-O4-O5	i	22.6	0.05	N3	vi	24.4	-0.51
Pro456	C20-H	iii	21.7	0.00	C20-H	vi	23.0	-0.33
Ser457	C9-O4-O5	i	24.4	0.05	C20-H	vi	25.8	-0.06
Arg458	C9-O4-O5	i	20.8	-1.45	N3	vi	22.3	1.73
Tyr459	C9-O4-O5	i	17.8	0.23	N3	vi	19.2	-0.20
Asn460	C9-O4-O5	i	17.2	0.47	C20-H	vi	17.6	0.02
Phe461	C9-O4-O5	i	20.6	0.25	N3	vi	21.8	0.20
Asp462	C9-O4-O5	i	17.8	-3.17	N3	vi	19.3	-1.97
Trp463	C9-O4-O5	i	9.1	0.32	N3	vi	10.6	0.01
Trp464	C9-O4-O5	i	15.1	0.09	C20-H	vi	15.1	-0.06
Tyr465	C9-O4-O5	i	18.7	-0.08	C13-H2	iv	19.8	-0.53
Leu466	C9-O4-O5	i	15.2	0.04	C13-H2	iv	16.2	-0.02
Arg467	C9-O4-O5	i	9.2	-3.91	N3	vi	9.5	2.26
Thr468	C9-O4-O5	i	17.2	0.03	N3	vi	17.9	-0.34
Lys469	C9-O4-O5	i	18.6	-1.45	C13-H2	iv	18.5	3.46
Tyr470	C6-H2	i	14.7	-0.34	C13-H2	iv	14.5	-0.39
Gln471	C6-H2	i	10.2	0.10	C7-H	v	9.7	-0.30
Gly472	C9-O4-O5	i	17.2	0.05	C7-H	v	16.8	0.05
Ile473	C9-O4-O5	i	13.0	-0.16	C7-H	v	12.6	0.11
Cys474	C9-O4-O5	i	18.3	-0.02	C6-H	v	17.5	0.00
Pro475	C9-O4-O5	i	17.8	0.09	C6-H	v	17.3	-0.44
Pro476	C9-O4-O5	i	17.8	-0.11	C19-H	vi	16.6	0.27
Val477	C9-O4-O5	i	20.4	-0.10	C20-H	vi	18.8	0.14
Thr478	C9-O4-O5	i	22.8	0.05	C20-H	vi	21.7	-0.33
Arg479	C9-O4-O5	i	17.7	-1.41	C20-H	vi	16.6	2.15
Asn480	C9-O4-O5	i	22.0	0.05	C20-H	vi	21.8	-0.41
Glu481	C9-O4-O5	i	22.0	-3.36	C20-H	vi	22.7	-1.98
Thr482	C9-O4-O5	i	21.9	0.17	C20-H	vi	21.0	0.10

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
His483	C9-O4-O5	i	18.9	-0.24	C20-H	vi	18.2	0.09
Phe484	C9-O4-O5	i	14.8	0.71	C20-H	vi	14.4	0.56
Asp485	C9-O4-O5	i	11.7	-2.69	C20-H	vi	11.8	-2.18
Ala486	C9-O4-O5	i	10.3	0.94	C20-H	vi	11.2	0.42
Gly487	C9-O4-O5	i	11.4	0.09	C20-H	vi	10.7	-0.89
Ala488	C9-O4-O5	i	9.1	-0.77	C20-H	vi	7.4	0.08
Lys489	C9-O4-O5	i	1.7	-55.10	N3	vi	2.2	-35.52
Phe490	C15-H2	iii	2.9	-7.73	C20-H	vi	4.6	-3.81
His491	C1-O1	i	2.1	-8.09	N5	vi	2.8	-4.46
Val492	C9-O4-O5	i	8.1	0.41	C20-H	vi	9.5	1.02
Pro493	C15-H2	iii	8.6	-0.77	C20-H	vi	9.5	-0.08
Asn494	C18-H	iii	4.8	-1.25	C20-H	vi	9.7	-0.02
Val495	C20-H	iii	5.4	-1.15	N5	vi	12.5	-0.74
Thr496	C20-H	iii	2.7	-3.79	C14-H3	iv	7.4	0.07
Pro497	C21-H	iii	4.9	0.39	C14-H3	iv	8.2	0.29
Tyr498	C9-O4-O5	i	2.9	-2.37	C13-H2	iv	3.4	-1.63
Ile499	C5-H	i	9.3	-0.97	C14-H3	iv	9.6	-2.36
Arg500	C21-H	iii	3.4	-11.18	C14-H3	iv	7.0	0.92
Tyr501	C4-H	iii	2.7	-5.75	C14-H3	iv	2.8	-5.98
Phe502	C6-H2	i	7.6	-0.24	C13-H2	iv	7.7	-0.64
Val503	C6-H2	i	10.1	-0.06	C13-H2	iv	10.0	-0.74
Ser504	C7-H2	i	6.1	-1.17	C13-H2	iv	5.9	0.84
Phe505	C7-H2	i	3.6	-1.10	C11-H2	iv	2.2	-6.68
Val506	C6-H2	i	10.7	-0.14	C13-H2	iv	9.9	-0.33
Leu507	C7-H2	i	12.2	-0.04	C13-H2	iv	11.6	-0.21
Gln508	C7-H2	i	6.7	-0.44	C9-Cl	iv	5.5	0.57
Phe509	C7-H2	i	11.0	-0.08	C9-Cl	iv	8.6	-0.14
Gln510	C7-H2	i	15.2	0.11	C9-Cl	iv	13.4	-0.08
Phe511	C7-H2	i	13.9	-0.11	C9-Cl	iv	11.9	-0.27
His512	C7-H2	i	14.7	0.18	C9-Cl	iv	10.9	0.10
Glu513	C7-H2	i	17.9	-3.82	C9-Cl	iv	14.7	-3.05
Ala514	C7-H2	i	19.8	0.12	C9-Cl	iv	16.8	0.10
Leu515	C7-H2	i	18.8	0.02	C9-Cl	iv	15.0	-0.31
Cys516	C7-H2	i	20.1	0.07	C9-Cl	iv	15.6	-0.12
Lys517	C7-H2	i	22.9	1.26	C9-Cl	iv	19.0	3.15

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Glu518	C7-H2	i	24.3	-3.29	C9-C1	iv	20.5	-3.49
Ala519	C7-H2	i	23.4	-0.09	C9-C1	iv	19.0	-0.05
Gly520	C7-H2	i	26.3	-0.01	C9-C1	iv	21.9	0.02
Tyr521	C7-H2	i	24.1	0.05	C9-C1	iv	19.1	0.00
Glu522	C7-H2	i	27.3	-4.01	C9-C1	iv	22.6	-2.62
Gly523	C7-H2	i	26.1	-0.24	C9-C1	iv	21.4	0.04
Pro524	C7-H2	i	22.6	-0.34	C9-C1	iv	17.7	-0.18
Leu525	C7-H2	i	18.8	-0.11	C9-C1	iv	14.7	-0.26
His526	C7-H2	i	18.4	0.02	C9-C1	iv	13.7	-0.22
Gln527	C7-H2	i	20.9	-0.10	C15-H2	iv	15.4	-0.22
Cys528	C7-H2	i	19.4	0.34	C9-C1	iv	14.0	0.28
Asp529	C7-H2	i	19.3	-4.19	C9-C1	iv	14.0	-2.85
Ile530	C7-H2	i	18.6	0.29	C9-C1	iv	14.1	0.34
Tyr531	C8-H2	i	20.8	0.00	C9-C1	iv	15.9	-0.17
Arg532	C8-H2	i	22.3	1.30	C9-C1	iv	17.7	2.83
Ser533	C7-H2	i	23.1	0.04	C9-C1	iv	18.5	-0.27
Thr534	C3-O3-O2	iii	24.6	-0.07	C9-C1	iv	21.4	-0.28
Lys535	C3-O3-O2	iii	25.5	1.23	C9-C1	iv	21.9	4.25
Ala536	C7-H2	i	21.6	0.09	C9-C1	iv	17.6	-0.25
Gly537	C3-O3-O2	iii	20.3	0.26	C9-C1	iv	17.5	-0.54
Ala538	C3-O3-O2	iii	22.9	0.09	C9-C1	iv	20.7	-0.20
Lys539	C3-O3-O2	iii	21.4	0.25	C9-C1	iv	19.1	3.62
Leu540	C3-O3-O2	iii	15.1	-0.23	C9-C1	iv	13.2	-0.77
Arg541	C3-O3-O2	iii	18.3	0.72	C9-C1	iv	18.6	2.58
Lys542	C3-O3-O2	iii	20.7	-0.15	C9-C1	iv	20.7	-0.79
Val543	C3-O3-O2	iii	16.1	0.06	C9-C1	iv	16.3	-0.35
Leu544	C3-O3-O2	iii	13.5	0.18	C9-C1	iv	14.6	-0.24
Gln545	C3-O3-O2	iii	18.6	0.05	C9-C1	iv	20.9	-0.29
Ala546	C3-O3-O2	iii	18.3	0.04	C14-H3	iv	20.7	-0.22
Gly547	C3-O3-O2	iii	15.7	0.40	C14-H3	iv	18.9	-0.12
Ser548	C20-H	iii	15.3	0.21	C14-H3	iv	19.6	-0.38
Ser549	C20-H	iii	19.2	0.01	C14-H3	iv	22.5	-0.24
Arg550	C3-O3-O2	iii	20.3	-0.04	C14-H3	iv	22.4	2.77
Pro551	C21-H	iii	20.5	-0.47	C14-H3	iv	22.1	-1.07
Trp552	C3-O3-O2	iii	16.9	-0.16	C14-H3	iv	17.9	-0.43

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
	A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)
Gln553	C3-O3-O2	iii	20.5	0.16	C14-H3	iv	21.1	0.07
Glu554	C3-O3-O2	iii	22.1	-3.43	C14-H3	iv	23.0	-2.41
Val555	C3-O3-O2	iii	18.8	0.15	C14-H3	iv	20.4	0.07
Leu556	C7-H2	i	18.0	0.02	C9-Cl	iv	17.7	-0.11
Lys557	C3-O3-O2	iii	22.9	1.28	C9-Cl	iv	22.8	3.36
Asp558	C3-O3-O2	iii	24.0	-2.56	C9-Cl	iv	23.3	-3.19
Met559	C7-H2	i	17.2	0.14	C9-Cl	iv	15.1	0.16
Val560	C7-H2	i	18.8	0.04	C9-Cl	iv	17.3	0.00
Gly561	C7-H2	i	23.9	0.17	C9-Cl	iv	22.6	0.06
Leu562	C7-H2	i	22.2	0.39	C9-Cl	iv	21.3	0.20
Asp563	C6-H2	i	23.2	-3.50	C13-H2	iv	22.7	-2.67
Ala564	C6-H2	i	20.3	-0.17	C13-H2	iv	19.7	0.00
Leu565	C6-H2	i	14.5	0.20	C13-H2	iv	14.0	0.16
Asp566	C7-H2	i	17.7	-3.43	C13-H2	iv	16.9	-2.63
Ala567	C6-H2	i	17.2	0.11	N2	iv	16.1	0.08
Gln568	C7-H2	i	20.2	0.18	C9-Cl	iv	18.6	-0.11
Pro569	C7-H2	i	17.7	-0.02	C9-Cl	iv	15.5	-0.40
Leu570	C7-H2	i	13.5	0.05	N2	iv	11.7	-0.18
Leu571	C6-H2	i	18.8	0.03	C9-Cl	iv	16.7	-0.31
Lys572	C7-H2	i	20.4	0.28	C9-Cl	iv	17.5	3.66
Tyr573	C7-H2	i	15.5	-0.30	C9-Cl	iv	10.6	-0.75
Phe574	C7-H2	i	12.8	0.14	N2	iv	9.8	-0.28
Gln575	C7-H2	i	20.9	0.23	C9-Cl	iv	17.7	-0.76
Pro576	C7-H2	i	21.9	-0.10	C15-H2	iv	18.1	-0.15
Val577	C7-H2	i	18.8	0.07	C15-H2	iv	15.0	-0.40
Thr578	C7-H2	i	20.3	0.24	N2	iv	17.6	-0.29
Gln579	C7-H2	i	24.4	-0.01	C15-H2	iv	21.3	-0.39
Trp580	C6-H2	i	22.9	-0.29	C1-H2	v	18.9	-0.21
Leu581	C6-H2	i	19.2	-0.04	C1-H2	v	15.8	-0.40
Gln582	C6-H2	i	24.3	0.23	C1-H2	v	21.4	0.06
Glu583	C6-H2	i	27.3	-3.92	C1-H2	v	24.2	-2.68
Gln584	C6-H2	i	26.1	0.05	C1-H2	v	22.6	0.06
Asn585	C6-H2	i	22.9	-0.02	C1-H2	v	20.2	-0.37
Gln586	C6-H2	i	28.7	-0.12	C1-H2	v	25.9	-0.75
Gln587	C6-H2	i	31.1	0.05	C1-H2	v	27.7	-0.01

Continua na próxima página

Tabela 9 – Continuação da página anterior

sACE	LPR				LST			
A_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i	Átomos	Região	r (Å)	E_i
Asn588	C6-H2	i	29.3	0.15	C1-H2	v	26.0	-0.24
Gly589	C6-H2	i	30.9	0.18	C1-H2	v	28.3	0.03
Glu590	C6-H2	i	25.4	-3.83	C1-H2	v	22.8	-2.82
Val591	C6-H2	i	25.4	-0.10	C1-H2	v	23.8	-0.01
Leu592	C6-H2	i	23.4	-0.22	C11-H2	iv	21.6	-0.06
Gly593	C6-H2	i	22.3	0.10	C11-H2	iv	21.3	0.16
Trp594	C6-H2	i	18.5	-0.19	C11-H2	iv	17.6	0.03
Pro595	C6-H2	i	26.8	0.12	C7-H	v	25.7	0.10
Glu596	C9-O4-O5	i	26.7	-3.76	C7-H	v	25.9	-2.82
Tyr597	C9-O4-O5	i	24.6	-0.35	C7-H	v	24.5	-0.20
Gln598	C9-O4-O5	i	24.8	0.14	C7-H	v	25.0	-0.04
Trp599	C9-O4-O5	i	23.5	-0.08	C7-H	v	21.7	-0.63
His600	C9-O4-O5	i	22.6	0.32	C6-H	v	22.2	0.05
Pro601	C9-O4-O5	i	22.5	0.24	C6-H	v	20.8	-0.14
Pro602	N3-H3	i	26.8	-0.22	C6-H	v	24.8	0.00
Leu603	N3-H3	i	25.5	-0.10	C19-H	vi	23.2	-0.12
Pro604	N3-H3	i	24.4	-0.01	C19-H	vi	22.4	0.17
Asp605	N3-H3	i	28.9	-3.93	C19-H	vi	27.0	-2.31
Asn606	N3-H3	i	29.4	-0.02	C19-H	vi	27.1	0.13
Tyr607	N3-H3	i	21.3	0.24	C19-H	vi	19.0	0.10
Pro608	N3-H3	i	24.7	-0.01	C19-H	vi	22.1	0.18
Glu609	N3-H3	i	27.8	-0.03	C19-H	vi	25.3	0.08
Gly610	N3-H3	i	26.0	-0.11	C19-H	vi	24.0	0.02
Ile611	N3-H3	i	23.4	-0.05	C18-H	vi	21.5	0.31
Asp612	N3-H3	i	21.0	-0.42	C19-H	vi	18.8	0.68

Tabela 10 – Energia de interação de todos os aminoácidos da PLA2 com a minoTc para as constantes dielétricas D01 ($\epsilon = 1$, vácuo), D04 ($\epsilon = 4$), D10 ($\epsilon = 10$), D20 ($\epsilon = 20$), D30 ($\epsilon = 30$), D40 ($\epsilon = 40$), D80 ($\epsilon = 80$, água) e DF ($\epsilon = \bar{\epsilon}$ dado pela Eq. 7.7); r_i é a distância dada em (Å) entre os átomo do aminoácido i PLA2 e o átomo da minoTc; $\bar{\epsilon}$ é o valor da constante dielétrica obtida pela Eq. 7.7.

PLA2			Energia de interação E_i (kcal mol ⁻¹) minoTc-PLA2							
A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}$	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
Asn1	6.19	30.26	29.12	8.81	3.45	1.54	0.88	0.55	0.05	0.79
Leu2	2.55	30.30	-15.61	-14.27	-13.65	-13.39	-13.29	-13.24	-13.17	-13.28
Tyr3	7.46	34.01	-2.00	-1.24	-0.78	-0.58	-0.51	-0.48	-0.42	-0.49
Gln4	9.36	27.28	-0.36	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07
Phe5	3.80	28.21	-0.83	-0.85	-0.91	-0.95	-0.97	-0.98	-0.99	-0.97
Lys6	6.35	33.66	27.53	8.98	3.65	1.69	1.02	0.68	0.16	0.82
Asn7	9.82	31.34	-0.96	-0.33	-0.17	-0.11	-0.08	-0.07	-0.05	-0.08
Met8	10.22	23.95	0.02	0.29	0.14	0.06	0.03	0.02	-0.01	0.04
Ile9	5.56	25.92	1.05	0.36	0.07	-0.05	-0.09	-0.11	-0.14	-0.08
Lys10	10.77	30.15	21.42	6.52	2.71	1.32	0.84	0.59	0.23	0.73
Cys11	13.03	27.64	0.48	0.28	0.14	0.07	0.05	0.03	0.01	0.04
Thr12	12.57	24.61	0.70	0.15	0.06	0.03	0.02	0.01	0.00	0.02
Val13	11.55	28.89	0.71	-0.10	-0.09	-0.05	-0.04	-0.03	-0.02	-0.04
Pro14	14.47	31.06	-0.12	-0.40	-0.23	-0.14	-0.11	-0.09	-0.06	-0.10
Ser15	14.64	35.54	0.58	0.26	0.11	0.06	0.03	0.02	0.01	0.02
Arg16	10.75	32.17	22.35	7.58	3.25	1.62	1.05	0.76	0.32	0.89
Ser17	8.22	33.70	1.73	0.62	0.26	0.13	0.09	0.07	0.04	0.08
Trp18	1.81	30.01	-18.36	-14.46	-13.14	-12.63	-12.45	-12.36	-12.22	-12.44
Trp19	4.10	41.17	-2.82	-3.09	-2.64	-2.29	-2.14	-2.06	-1.93	-2.04
Asp20	6.95	30.82	-46.46	-11.91	-4.52	-2.26	-1.52	-1.15	-0.59	-1.39
Phe21	3.96	28.41	-2.29	-0.97	-0.12	0.19	0.29	0.34	0.42	0.29
Ala22	2.00	28.37	-29.95	-25.61	-23.42	-22.39	-22.01	-21.82	-21.52	-22.01
Asp23	3.34	32.17	-52.38	-17.68	-9.16	-6.27	-5.29	-4.80	-4.07	-5.04
Tyr24	5.52	29.10	-2.37	-1.57	-0.99	-0.74	-0.65	-0.60	-0.53	-0.64
Gly25	8.29	30.09	-2.34	-1.35	-0.68	-0.38	-0.27	-0.22	-0.13	-0.25
Cys26	8.02	30.55	-0.32	-0.27	-0.16	-0.11	-0.09	-0.09	-0.07	-0.09
Tyr27	5.52	30.05	-2.08	-1.14	-0.67	-0.46	-0.38	-0.34	-0.28	-0.36
Cys28	3.97	26.17	1.05	2.04	2.32	2.42	2.45	2.47	2.49	2.45
Gly29	1.68	28.25	-25.95	-26.61	-26.50	-26.40	-26.36	-26.34	-26.30	-26.36
Arg30	2.27	37.45	17.37	-3.23	-9.23	-11.43	-12.18	-12.57	-13.15	-12.61

Continua na próxima página

Tabela 10 – Continuação da página anterior

PLA2			Energia de interação E_i (kcal mol ⁻¹) minoTc-PLA2							
A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}$	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
Gly31	6.72	39.08	-2.46	-1.36	-0.77	-0.53	-0.44	-0.40	-0.33	-0.38
Gly32	9.99	44.31	-3.65	-1.34	-0.59	-0.34	-0.26	-0.22	-0.15	-0.20
Ser33	11.31	42.16	-1.76	-0.70	-0.33	-0.19	-0.14	-0.11	-0.07	-0.10
Gly34	13.71	34.65	-0.56	-0.38	-0.19	-0.11	-0.08	-0.07	-0.04	-0.07
Thr35	14.88	31.99	0.81	0.00	-0.05	-0.04	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03
Pro36	13.39	28.05	0.46	0.47	0.22	0.11	0.07	0.04	0.01	0.06
Val37	12.41	29.06	3.59	1.15	0.36	0.15	0.09	0.07	0.02	0.08
Asp38	13.41	26.98	-41.78	-10.74	-3.67	-1.71	-1.08	-0.78	-0.31	-1.06
Asp39	13.71	26.38	-37.29	-8.11	-2.46	-1.09	-0.66	-0.45	-0.13	-0.65
Leu40	9.27	27.59	1.48	0.21	-0.14	-0.14	-0.13	-0.11	-0.09	-0.12
Asp41	9.65	25.24	-35.60	-11.79	-4.78	-2.39	-1.58	-1.17	-0.55	-1.65
Arg42	12.11	29.23	30.23	7.47	2.74	1.26	0.77	0.53	0.16	0.63
Cys43	9.96	28.49	0.70	0.37	0.17	0.07	0.04	0.02	-0.01	0.02
Cys44	6.46	30.80	-1.15	-0.84	-0.51	-0.38	-0.32	-0.30	-0.26	-0.30
Gln45	9.54	30.77	-1.56	-0.56	-0.28	-0.17	-0.13	-0.11	-0.08	-0.12
Val46	11.19	26.33	0.41	0.24	0.11	0.05	0.02	0.01	-0.01	0.02
His47	5.64	29.49	4.00	1.66	0.52	0.11	-0.03	-0.10	-0.20	-0.08
Asp48	6.14	32.28	-49.88	-15.45	-6.50	-3.36	-2.28	-1.74	-0.91	-1.55
Asn49	10.71	35.66	-1.39	-0.63	-0.26	-0.15	-0.12	-0.11	-0.09	-0.11
Cys50	10.82	29.83	0.99	0.48	0.23	0.11	0.07	0.05	0.01	0.05
Tyr51	5.30	29.41	-0.66	-0.54	-0.53	-0.53	-0.54	-0.54	-0.55	-0.54
Asn52	8.19	46.22	2.98	0.41	-0.04	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06
Glu53	11.20	36.37	-33.63	-6.40	-2.29	-1.10	-0.70	-0.50	-0.19	-0.46
Ala54	9.39	35.09	1.37	0.50	0.17	0.06	0.03	0.01	-0.02	0.01
Glu55	5.14	44.99	-28.56	-9.57	-4.08	-2.15	-1.48	-1.14	-0.63	-0.96
Lys56	11.54	43.00	28.03	5.85	2.27	1.08	0.67	0.46	0.15	0.35
Ile57	12.11	36.92	-0.50	-0.22	-0.10	-0.06	-0.04	-0.03	-0.02	-0.03
Ser58	13.37	46.64	-0.31	-0.07	-0.04	-0.03	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03
Lys59	10.72	50.32	0.38	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
Cys60	7.97	40.97	0.94	0.03	-0.04	-0.05	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06
Trp61	5.26	44.31	-0.36	-0.15	-0.29	-0.38	-0.41	-0.42	-0.45	-0.43
Pro62	4.90	31.20	-0.39	-0.25	-0.35	-0.41	-0.43	-0.44	-0.46	-0.44
Phe63	2.69	31.05	-23.72	-21.89	-21.28	-21.06	-20.99	-20.95	-20.90	-20.98
Phe64	2.35	38.62	-10.41	-9.49	-9.15	-9.02	-8.97	-8.95	-8.91	-8.95
Lys65	7.04	32.39	19.93	5.47	2.10	0.95	0.55	0.36	0.06	0.45

Continua na próxima página

Tabela 10 – Continuação da página anterior

PLA2			Energia de interação E_i (kcal mol ⁻¹) minoTc-PLA2							
A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}$	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
Thr66	10.07	32.88	-0.53	-0.23	-0.12	-0.07	-0.05	-0.04	-0.03	-0.05
Tyr67	10.85	28.17	-1.19	-0.28	-0.12	-0.09	-0.08	-0.08	-0.07	-0.08
Ser68	16.22	29.34	-0.14	-0.15	-0.09	-0.06	-0.04	-0.04	-0.03	-0.04
Tyr69	13.74	25.86	0.00	-0.03	-0.03	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
Lys70	18.99	28.12	17.05	4.61	1.85	0.88	0.55	0.38	0.13	0.51
Cys71	16.69	26.42	0.20	0.07	0.02	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00
Ser72	20.47	30.73	-0.75	-0.21	-0.08	-0.05	-0.04	-0.03	-0.02	-0.04
Gln73	21.82	33.57	-0.19	0.13	0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.03	-0.02
Gly74	18.53	28.74	0.15	-0.06	-0.04	-0.03	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
Thr75	19.38	29.85	-0.90	0.00	0.02	0.00	-0.01	-0.02	-0.02	-0.01
Leu76	13.53	21.01	0.01	0.21	0.12	0.07	0.05	0.04	0.03	0.06
Thr77	19.04	27.60	0.43	0.05	0.00	-0.01	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
Cys78	16.90	25.71	0.29	0.06	0.02	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00
Lys79	19.80	31.78	15.74	4.43	1.79	0.85	0.52	0.36	0.11	0.42
Gly80	23.23	34.00	0.09	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
Gly81	20.76	36.84	0.38	0.09	0.02	0.00	-0.01	-0.01	-0.02	-0.01
Asn82	17.19	32.53	-0.17	0.19	0.08	0.04	0.02	0.01	0.00	0.01
Asn83	15.35	34.69	-0.46	-0.11	-0.07	-0.05	-0.04	-0.03	-0.03	-0.03
Ala84	15.82	33.97	0.23	-0.07	-0.04	-0.03	-0.02	-0.02	-0.01	-0.02
Cys85	11.42	31.33	-0.68	-0.46	-0.23	-0.14	-0.10	-0.08	-0.05	-0.09
Ala86	13.52	30.13	-0.70	-0.41	-0.22	-0.13	-0.09	-0.08	-0.05	-0.09
Ala87	16.03	30.60	-0.41	-0.25	-0.13	-0.08	-0.06	-0.05	-0.03	-0.05
Ser88	13.15	28.47	-0.07	-0.16	-0.09	-0.06	-0.05	-0.04	-0.03	-0.04
Val89	9.36	28.31	-0.79	-0.47	-0.26	-0.17	-0.13	-0.11	-0.08	-0.13
Cys90	13.33	25.50	1.61	0.01	-0.20	-0.14	-0.11	-0.09	-0.06	-0.11
Asp91	14.36	23.76	-33.53	-7.22	-2.55	-1.20	-0.76	-0.53	-0.19	-0.81
Cys92	10.81	26.86	1.44	0.29	-0.01	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03
Asp93	8.69	24.86	-33.66	-11.61	-4.82	-2.44	-1.62	-1.20	-0.56	-1.69
Arg94	12.59	22.89	30.18	5.78	2.17	1.01	0.62	0.43	0.14	0.71
Leu95	12.93	22.57	0.25	0.12	0.05	0.03	0.02	0.01	0.00	0.02
Ala96	8.41	27.84	-0.02	-0.01	-0.03	-0.03	-0.03	-0.04	-0.04	-0.03
Ala97	10.15	22.80	0.24	-0.17	-0.13	-0.08	-0.07	-0.06	-0.04	-0.07
Ile98	13.13	21.98	-0.44	-0.11	-0.06	-0.04	-0.03	-0.03	-0.03	-0.04
Cys99	11.90	26.98	0.53	0.18	0.08	0.04	0.02	0.01	-0.01	0.02
Phe100	5.51	26.26	0.04	0.05	-0.05	-0.11	-0.13	-0.14	-0.15	-0.13

Continua na próxima página

Tabela 10 – Continuação da página anterior

PLA2			Energia de interação E_i (kcal mol ⁻¹) minoTc-PLA2							
A_i	r (Å)	$\bar{\epsilon}$	D01	D04	D10	D20	D30	D40	D80	DF
Ala101	13.11	26.73	-0.67	-0.08	-0.04	-0.02	-0.02	-0.02	-0.01	-0.02
Gly102	15.14	26.29	0.00	0.13	0.06	0.02	0.01	0.00	-0.01	0.01
Ala103	13.16	28.77	0.20	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pro104	15.03	34.12	-0.11	-0.27	-0.14	-0.08	-0.06	-0.05	-0.03	-0.05
Tyr105	9.14	29.66	1.39	0.46	0.19	0.07	0.03	0.01	-0.03	0.02
Asn106	14.13	31.41	1.00	0.09	-0.09	-0.09	-0.08	-0.07	-0.06	-0.08
Asp107	14.26	36.09	-39.73	-8.69	-2.95	-1.39	-0.89	-0.63	-0.25	-0.68
Asn108	15.11	34.74	-0.17	-0.19	-0.08	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06
Asn109	10.86	31.56	-0.42	-0.16	-0.09	-0.07	-0.06	-0.05	-0.04	-0.05
Tyr110	6.62	35.91	-0.08	0.07	-0.01	-0.06	-0.08	-0.09	-0.10	-0.08
Asn111	6.49	43.52	-2.68	0.22	0.28	0.13	0.05	0.00	-0.07	-0.01
Ile112	9.86	37.58	-1.91	-0.15	-0.28	-0.22	-0.18	-0.16	-0.13	-0.16
Asp113	12.30	49.17	-43.12	-9.44	-2.92	-1.29	-0.80	-0.56	-0.20	-0.40
Leu114	7.63	39.07	2.11	0.85	0.23	0.07	0.03	0.01	-0.02	0.00
Lys115	13.38	56.70	19.05	5.65	2.30	1.10	0.68	0.47	0.16	0.28
Ala116	15.11	45.96	0.57	0.34	0.17	0.09	0.06	0.05	0.02	0.04
Arg117	13.29	36.66	19.09	6.35	2.69	1.32	0.85	0.60	0.24	0.53
Cys118	11.28	35.80	-0.88	-0.29	-0.17	-0.11	-0.09	-0.07	-0.05	-0.07
Gln119	13.76	44.67	-39.18	-7.95	-2.54	-1.14	-0.71	-0.49	-0.16	-0.39