

ARLAN DA SILVA GONÇALVES

ESTUDO DA REATIVAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE
HUMANA INIBIDA PELO ORGANOFOSFORADO TABUN
ATRAVÉS DE MÉTODOS HÍBRIDOS CLÁSSICOS
QUANTO-MECÂNICOS

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientadores: Dr. PEDRO GERALDO PASCUTTI - IBCCF – UFRJ

Dr. JOSE DANIEL FIGUEROA VILLAR - IME



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Arlan da Silva Gonçalves

ESTUDO DA REATIVAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE HUMANA INIBIDA PELO
ORGANOFOSFORADO TABUN ATRAVÉS DE MÉTODOS HÍBRIDOS CLÁSSICOS
QUANTO-MECÂNICOS

V.I

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Biofísica)

Orientadores:

Dr. Pedro Geraldo Pascutti – IBCCF – UFRJ

Dr. Jose Daniel Figueroa Villar – IME

Rio de Janeiro
2009

Gonçalves, Arlan da Silva.

Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado Tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos / Arlan da Silva Gonçalves. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

xvii, 206 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Pedro Geraldo Pascutti e Jose Daniel Figueroa Villar.

Tese (doutorado) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências (Biofísica), 2009.

Referências bibliográficas: f. 113-121.

1. Acetilcolinesterase. 2. Dinâmica molecular híbrida. 3. Agentes para Guerra Química. 4. Ciências Biológicas (Biofísica) - Tese. I. Pascutti, Pedro Geraldo. II. Villar, Jose Daniel Figueroa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências (Biofísica). IV. Título.

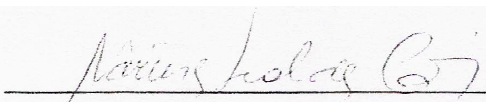
**“ESTUDO DA REATIVAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE HUMANA
INIBIDA PELO ORGANOFOSFORADO TABUN ATRAVÉS DE
MÉTODOS HÍBRIDOS CLÁSSICOS QUANTO-MECÂNICOS.”**

ARLAN DA SILVA GONÇALVES

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

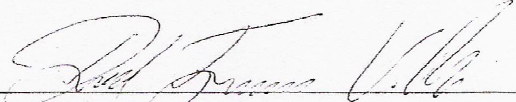
RIO DE JANEIRO, 28 DE AGOSTO DE 2009.



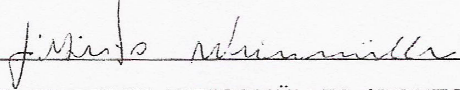
PROF^a. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



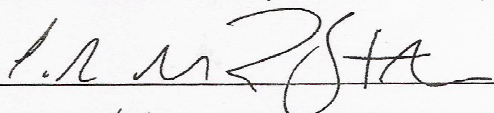
PROF. PEDRO GERALDO PASCUTTI (DOUTOR - UFRJ) – ORIENTADOR



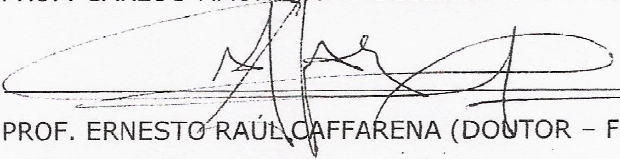
PROF. JOSÉ DANIEL FIGUEROA VILLAR (DOUTOR - IME) – CO-ORIENTADOR



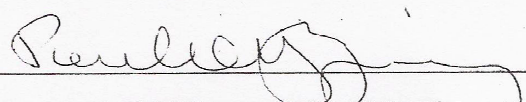
PROF. GILBERTO WEISSMÜLLER (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR



PROF. CARLOS MAURÍCIO RABELLO DE SANT'ANNA (DOUTOR - UFRJ)



PROF. ERNESTO RAÚL CAFFARENA (DOUTOR - FIOCRUZ)



PROF. PAULO MASCARELLO BISCH (DOUTOR - UFRJ)

*A meus pais, Oswaldo e Ailene
Gonçalves, a minha sobrinha Aline
Callado e a minha namorada
Simone Queiroga pelo amor,
carinho, inspiração e ânimo.*

AGRADECIMENTOS

- Ao CNPq, a CAPES, ao PRÓ-DEFESA e a FAPERJ pelo apoio financeiro.
- Aos doutores PEDRO GERALDO PASCUTTI e JOSE DANIEL FIGUEROA VILLAR pela amizade e sábias orientações.
- Aos doutores CARLOS MAURÍCIO RABELLO DE SANT'ANNA, JOSE OSVALDO PREVIATO, PAULO MASCARELLO BISCH, TANOS CELMAR COSTA FRANÇA e ERNESTO RAÚL CAFFARENA, por aceitarem fazer parte da banca de minha tese.
- Ao doutor GILBERTO WEISSMULLER pela sábia revisão de minha tese e por ter aceitado também fazer parte da banca.
- Aos amigos DIEGO ENRY, PAULO RICARDO, TACIO FERNANDES, MAURÍCIO COSTA, GABRIEL LIMAVERDE, SAMUEL PITA, REINALDO OLIVEIRA, RAFAEL BERNARDI, PRISCILA FIGUEIREDO, ROSEMBERG SOARES, PEDRO TORRES, PEDRO LOUREIRO, TÉCIO BENETTI e demais do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular do IBCCF/UFRJ pelo companheirismo, amizade e pela troca de informações instrutivas.
- Ao amigo PEDRO VALIENTE de Cuba, pelo companheirismo e pela troca de informações sobre modelagem e dinâmica molecular.
- Aos amigos JOÃO VIANEZ, DANIEL COSTA, PATRÍCIA BARROS, MANUELA LEAL e demais do Laboratório de Física Biológica do IBCCF/UFRJ.
- Ao FABIO do NPPN/UFRJ, pela amizade e pela troca de informações referentes à mecânica quântica.
- Aos funcionários HELIO e RICARDO da Secretaria da Graduação do IBCCF/UFRJ, pelo companheirismo e por terem me emprestado o Datashow nos momentos que mais precisei.
- Aos amigos HENRIQUE e SILVIO do setor de informática do IBCCF, e respectivas esposas, FERNANDA e TEREZA, antes de qualquer coisa pela grande amizade e por terem me ajudado em questões pessoais muito complicadas.
- Ao amigo MAURÍCIO TECLES do setor de informática do IBCCF, pela amizade e por ter me ajudado em diversas questões de informática.
- À EDNA, DINORÁ e TEREZA, da secretaria do IBCCF, por diversas vezes terem me esclarecido questões referentes a assuntos burocráticos e por terem reservado salas de aula nos momentos que precisei.
- Ao FELIPE do Shopping dos Doces do CCS, por ter me fornecido carboidratos e pela grande amizade.

-À SANDRA BRITO, DIOGO e GABRIELA da Secretaria de Pós-Graduação do IBCCF, pelo carinho, amizade e por terem me ajudado a resolver questões burocráticas.

-À TÂNIA do estacionamento do IBCCF, por ter me concedido uma vaga e aos funcionários, SEVERINO, GENÉSIO e ALEXANDRE, pela amizade e por terem aberto o portão do estacionamento durante várias madrugadas que cheguei ao IBCCF.

-Ao amigo FRANCISCO do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear da UFRJ pelas aulas de RMN.

-Ao amigo RICARDO CUYA da PUC, pela amizade e troca de informações.

-Aos amigos EVANDRO PECLATZ, LEANDRO, TATIANA, MAGDALENA, DELFINO, SIBELLE CUNHA, GUSTAVO ROCHA e demais do Instituto Militar de Engenharia (IME), pela amizade e pela troca de idéias úteis e construtivas.

- Aos meus grandes amigos ROMULO VALADÃO, EDIO SOARES JR e HENRI SANTOS, pelo companheirismo, amizade e por entenderem que a minha ausência se deu por causa do doutorado.

-Aos avós DOMINGOS GONÇALVES, MARIA NANA e ALICE SARDINHA, pelo amor, carinho e ao meu avô JOSÉ TRAVASSOS DA SILVA, por me dar uma mãe e tia-madrinha maravilhosas, além de ter sempre torcido pelo meu nascimento, apesar de não tê-lo conhecido no plano terreno.

- À minha irmã AILANE CALLADO e meu cunhado ANTÔNIO CALLADO, por me darem uma linda sobrinha, ALINE CALLADO, que me traz muito orgulho e felicidade.

-Aos meus tios ALVARO e ROSANI e à minha prima ALOANI FARIA BASTOS, pelo amor, carinho e, por torcerem sempre por mim.

-Aos meus primos PAULO GUSTAVO DA CUNHA e ALVARO JR., pelo companheirismo, amizade e pela troca de informações em informática.

-À SELMEN e ARISTÓTELES por me darem uma linda afilhada chamada ALICE.

-A todos os outros meus familiares por acreditarem em mim e, antes de tudo, pelo amor e carinho que é, sem dúvida, reciprocamente compartilhado.

-À minha sogra DALILA QUEIROGA e família, pelo carinho.

-Ao professor VICTOR MANUEL MORAES ALHO, por sua amizade, carinho e por ter me ensinado química de forma divertida e com uma didática esplêndida.

-Aos amigos e amigas da Loja Rosacruz Ilha do Governador e a EGRÉGORA, pela irmandade, amizade e fraternidade.

-Ao CÓSMICO por me proporcionar saúde e me dar sábias inspirações.

“A mais bela e profunda experiência é a sensação do mistério. Ela é semeadora de toda verdadeira ciência. O homem para quem essa emoção é estranha, que não mais pode se maravilhar e se sentir arrebatado de admiração, está praticamente morto.”

-Albert Einstein

RESUMO

Conhecer vias de reativação da acetilcolinesterase humana (*HuAChE*) inibida por organofosforados é fundamental para o desenvolvimento de antídotos usados contra o envenenamento por pesticidas neurotóxicos e agentes de guerra química, uma vez que o mecanismo da reação de reativação e as características estruturais dos reativadores usados atualmente são pouco compreendidos. Com o objetivo de se entender como a reação de reativação da enzima ocorre, além da dinâmica molecular clássica ter sido empregada para o estudo das interações entre a pralidoxima e aminoácidos do sítio ativo da *HuAChE* inibida pelo agente neurotóxico tabun, foi usada a dinâmica molecular híbrida, conhecida como dinâmica molecular por mecânica quântica/mecânica molecular (*MQ/MM*). O uso desta metodologia teve como objetivo propor mecanismos de reativação da enzima inibida. Os resultados mostraram que a dinâmica molecular clássica manteve a pralidoxima dentro do sítio ativo da enzima, em uma região favorável a ocorrência de possíveis reações de desfosforilação que foram confirmadas com o uso do método *MQ/MM*, o que levou a proposta de um mecanismo de reação de reativação da *HuAChE* inibida, favorável energeticamente, onde a pralidoxima, foi usada como antídoto.

ABSTRACT

In order to understand reactivation routes of human acetylcholinesterase (*HuAChE*) inhibited by organophosphorous is fundamental for development of antidotes used against poisoning by neurotoxic pesticides and chemical warfare agents, since the reactivate reaction's mechanism and the structural characteristics are poorly understood actually. In order to understand as the reaction of reactivation of the enzyme occurs, beyond the classical molecular dynamics have been used for the interaction's study between pralidoxime and active site's amino acids of *HuAChE* inhibited by neurotoxic agent tabun, was used hybrid molecular dynamic, known as quantum mechanic/molecular mechanic (*QM/MM*). The use of this methodology had as objective to propose reactivation mechanisms for the inhibited enzyme. The results shown that the classic molecular dynamic kept the pralidoxime into the enzyme's active site, in a favorable region to the occurrence of possible reactions of dephosphorilation which were confirmed with the use of the *QM/MM* method, leading to a proposed reaction mechanism of reactivation of inhibited *HuAChE*, energetically favorable, where the pralidoxime was used as antidote

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 POSICIONAMENTO E ABORDAGEM DO PROBLEMA	18
1.2 OS AGENTES DE GUERRA QUÍMICA	22
1.2.1 Histórico	22
1.2.2 Principais Propriedades Físicas	25
1.2.3 Propriedades Químicas	26
1.3 A ACETILCOLINESTERASE	27
1.3.1 O Sistema Nervoso Periférico	28
1.3.2 A Acetilcolina	30
1.3.2.1 Interações da Acetilcolina com o Sítio Ativo da Acetilcolinesterase	31
1.3.2.2 Mecanismo de Hidrólise	33
1.3.3 A Acetilcolinesterase Humana	34
1.3.3.1 Inibição, Reativação e Envelhecimento da HuAChE	36
1.4 OBJETIVOS	40
2 METODOLOGIA	41
2.1 MODELAGEM MOLECULAR	41
2.1.1 Mecânica Molecular	44
2.1.1.1 Simulações por Dinâmica Molecular	46
2.1.2 Mecânica Quântica	49
2.1.2.1 O Método Hartree-Fock	49
2.1.2.2 Os Modelos Semi-Empíricos	50
2.1.3 O Método Híbrido MQ/MM	53
2.2 PROCEDIMENTOS DE SIMULAÇÃO	56
2.2.1 Modelagem e Dinâmica Molecular Clássica	56
2.2.2 Aplicação de Métodos Híbridos	58
2.2.2.1 Teste utilizando MQ/MM	58
2.2.2.2 Simulação das Etapas de Reação por MQ/MM	59
2.2.3 Caracterização dos Estados de Transição	62

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1 DINÂMICA MOLECULAR DO COMPLEXO HuAChE/2-PAM/GA	64
3.1.1 Condições Iniciais	64
3.1.2 Energia Total	65
3.1.3 Desvio da Raiz Média Quadrática	66
3.1.4 Distância entre os Centros de Massa do GA e da 2-PAM	72
3.1.5 Distância entre o Oxigênio ácido da 2-PAM e o Fósforo do GA	74
3.1.6 Interações entre a 2-PAM e Resíduos do Sítio Ativo Próximos à 2-PAM	75
3.2 DINÂMICA MOLECULAR HÍBRIDA	80
3.2.1 Testando MQ/MM com o GROMACS/MOPAC	80
3.2.2 Etapas de Reação por MQ/MM	82
3.2.2.1 Etapa 1	82
3.2.2.2 Etapa 2	86
3.2.2.3 Etapa 3	89
3.2.2.4 Etapa 4	92
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE CELA	98
3.3.1 Etapa 1	98
3.3.2 Etapa 2	100
3.3.3 Etapa 3	102
3.3.4 Última etapa	106
4 CONCLUSÕES	111
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
6 APÊNDICES	122
6.1 APÊNDICE A: Parametrização de Moléculas Desconhecidas	123
6.2 APÊNDICE B: Programas do Pacote GROMACS 3.3.1	125
6.3 APÊNDICE C: Compilando o GROMACS 3.3.1 com o MOPAC 7	133
6.4 APÊNDICE D: Modificações feitas nos arquivos TOP e MDP de um peptídeo exemplo.	162
6.5 APÊNDICE E: Resultados adicionais	167
6.6 APÊNDICE F: Publicações geradas durante o doutorado	169

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Principais agentes neurotóxicos, com o esquema geral ao centro, em coloração azul	24
Figura 1.2	Os dois principais neurotransmissores do sistema nervoso periférico	28
Figura 1.3	Nervos motores do sistema nervoso periférico. N, receptores nicotínicos; M, receptores muscarínicos	30
Figura 1.4	Sítio ativo da acetilcolinesterase complexado com a acetilcolina. Nesta região ocorrem as principais interações com inibidores ou substratos	32
Figura 1.5	Mecanismo de hidrólise da acetilcolina	33
Figura 1.6	Modelo da acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico Tabun e com as duas alças completas	35
Figura 1.7	Principais oximas empregadas atualmente	37
Figura 1.8	Cisão de organofosforados	37
Figura 1.9	Reação entre o grupo hidroxilamina da oxima e a serina fosforilada	38
Figura 1.10	Inibição, reativação e envelhecimento da AChE	38
Figura 2.1	Resíduos tratados por Mecânica Quântica com seus respectivos átomos conexão, totalizando 142 átomos quânticos	61
Figura 3.1	Sistema <i>HuAChE/2-PAM/GA</i> com (a) a 2-PAM na entrada do sítio ativo e com (b) a 2-PAM dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	65
Figura 3.2	Variação da energia total para o sistema <i>HuAChE/2-PAM/GA</i> com a 2-PAM na entrada do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	66
Figura 3.3	Variação da energia total para o sistema <i>HuAChE/2-PAM/GA</i> com a 2-PAM dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	66
Figura 3.4	DRMQ temporal para o sistema <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> com a 2-PAM na entrada do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	68
Figura 3.5	DRMQ temporal para o sistema <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> com a 2-PAM dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	69
Figura 3.6	FDRMQ 2D para o sistema <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> com a 2-PAM na entrada do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	70
Figura 3.7	FDRMQ 2D para o sistema <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> com a 2-PAM dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	71
Figura 3.8	FDRMQ 3D para o sistema <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> com (A) a 2-PAM na entrada do sítio ativo e com (B) a 2-PAM dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	71

Figura 3.9	Distâncias entre os centros de massa da <i>2-PAM</i> e do <i>GA</i>	74
Figura 3.10	Distância entre o oxigênio da <i>2-PAM</i> e o fósforo do <i>GA</i>	75
Figura 3.11	Instante 3 ns da simulação por DM do complexo <i>HuAChE/GA/2-PAM</i> , com a oxima dentro do sítio ativo da <i>HuAChE</i>	76
Figura 3.12	(A) Destaque da <i>2-PAM</i> entre a Tyr124 e o Trp86 mais o complexo Ser203- <i>GA</i> . (B) Distâncias entre átomos da Tyr124, <i>2-PAM</i> e do Trp86	77
Figura 3.13	(A) Destaque da <i>2-PAM</i> , Tyr124, a His447 e o complexo Ser203- <i>GA</i> . (B) Distâncias entre átomos da <i>2-PAM</i> , Tyr337 e da His447	78
Figura 3.14	Numero de ligações hidrogênio formadas entre a <i>2-PAM</i> e a Tyr337	79
Figura 3.15	Minimização por MQ/MM usando diferentes métodos semi-empíricos	81
Figura 3.16	Instante 5500ps da simulação clássica, com a <i>2-PAM</i> ancorada no interior do sítio ativo da <i>HuAChE/GA</i>	83
Figura 3.17	Variação das distâncias b_6 - b_5 , b_8 - b_5 e b_1 - b_3 , ao longo do tempo	84
Figura 3.18	Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na primeira etapa de reação	85
Figura 3.19	Condição de partida para a Etapa 2 (Último quadro da Etapa 1)	87
Figura 3.20	Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na segunda etapa de reação. (A) restrição de 3,5 Å; (B) restrição de 3,0 Å e; (C) Sem restrição	88
Figura 3.21	Coordenada de reação proposta para a segunda etapa de reação	88
Figura 3.22	Variação das distâncias b_1 - b_2 , b_1 - b_3 e b_2 - b_4 , ao longo do tempo	89
Figura 3.23	Condição de partida para a Etapa 3 (Ultimo quadro da Etapa 2)	90
Figura 3.24	Geometria bipirâmide trigonal do complexo <i>2-PAM/GA/ Ser203</i>	91
Figura 3.25	Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na terceira etapa de reação	91
Figura 3.26	Distâncias b_1 - b_3 e b_3 - b_7 ao longo dos (A) 50ps finais da terceira etapa de reação. (B) Ampliação dos primeiros 5 os	92
Figura 3.27	Início dos primeiros 5 ps da etapa 4, com restrição em b_4 - b_7 de 5,5 Å	94
Figura 3.28	Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na quarta etapa de reação	95
Figura 3.29	Distâncias b_2 - b_4 e b_2 - b_7 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação	95
Figura 3.30	Distâncias b_1 - b_3 e b_3 - b_7 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação	96

Figura 3.31	Distância b_4 - b_9 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação	96
Figura 3.32	Espectro no infravermelho para a primeira etapa de reação, usando o método RM1	99
Figura 3.33	(A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na primeira etapa de reação	100
Figura 3.34	Espectro no infravermelho para a segunda etapa de reação, usando o método RM1	101
Figura 3.35	(A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na segunda etapa de reação	102
Figura 3.36	Espectro no infravermelho para a terceira etapa de reação, usando o método RM1	104
Figura 3.37	(A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na terceira etapa de reação	105
Figura 3.38	Variação de distâncias entre a <i>2-PAM</i> e o <i>GA</i> e entre o <i>GA</i> e a Ser203, na terceira etapa de reação	105
Figura 3.39	Espectro no infravermelho para a ultima etapa de reação, usando o método RM1	108
Figura 3.40	(A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na ultima etapa de reação	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Propriedades físicas dos agentes neurotóxicos	25
Tabela 1.2	Toxidez estimada dos agentes neurotóxicos ao homem	27
Tabela 2.1	Acurácia do RM1 em relação ao AM1, PM3 e PM5	53
Tabela 3.1	Estado de protonação de alguns aminoácidos da HuAChE em pH 7,4	82
Tabela 3.2	Energias médias da primeira etapa de reação: Protonação do Glu334 pela His447	86

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

2-PAM	Pralidoxima
Å	Angstrom
AC	Átomo Conexão
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ala	Alanina
AM1	Do inglês: “Austin Model 1”
anti-ChE	Anti-colinesterase
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato ou Ácido aspártico, dependendo do pH
BuChE	Butirilcolinesterase
CRI	Coordenada de Reação Intrínseca
DM	Dinâmica Molecular
DQBN	Defesa Química, Biológica e Nuclear
DRMQ	Desvio da Raiz Média Quadrática
ET	Estado de Transição
FDRMQ	Flutuação do Desvio da Raiz Média Quadrática
GA	o-etil-N,N-dimetil-fosforamido-cianidato (Tabun)
GB	o-isopropil-metil-fosfono-fluoridato (Sarin)
GD	o-pinacolil-metil-fosfono-fluoridato (Soman)
GI	Gastro Intestinal
Glu	Glutamato ou Ácido Glutâmico, dependendo do pH
fs	Fentossegundos
HF	Hartree-Fock
His	Histidina
HMO	Método do Orbital Molecular de Hückel
HuAChE	Acetilcolinesterase Humana
MM	Mecânica Molecular
MNDO	Do inglês: “Modified Neglect of Differential Overlap”
MP2	Modelo de correlação eletrônica de segunda ordem Möller-Plesset
MQ	Mecânica Quântica
MQ/MM	Mecânica Quântica / Mecânica Molecular
NA	Noradrenalina
ns	nanossegundos
PM3	Do inglês: “Parametric Method 3”
PM6	Do inglês: “Parametric Method 6”

ps	picossegundos
RM1	Do inglês: "Recife Model 1"
Ser	Serina
SGA	Serina 203 do sítio ativo da HuAChE ligada ao Tabun
SNC	Sistema Nervoso Central
TFD	Teoria do Funcional de Densidade
Thr	Treonina
TMB-4	Trimedoxima
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
VX	o-etil S-[2-(diisopropilamino)etil]-metil-fosfonotioato

1 INTRODUÇÃO

1.1 POSICIONAMENTO E ABORDAGEM DO PROBLEMA

Desde a antiguidade, formas primitivas do emprego de certos compostos químicos como armas, devido a seus efeitos tóxicos no homem, animais ou plantas, têm sido relatadas (WHO, 1970), tendo-se como exemplo, os instrumentos de guerra tática que utilizam misturas incendiárias, fumaças, e gases irritantes, vesicantes, venenosos ou asfixiantes (SMART, 1997). Idéias sugeridas, mas não colocadas em prática, incluem, por exemplo, o uso de munições com cianeto pelos ingleses na Guerra da Criméia e munições com cloro na Guerra Civil Americana. Posteriormente, com o desenvolvimento da indústria química no século XX, a utilização destes agentes tóxicos em guerra química tornou-se mais ampla.

O início da guerra química moderna foi em 1915, na Primeira Guerra Mundial, em que os alemães utilizaram gás cloro contra tropas aliadas em Ypress, Bélgica, levando assim ao surgimento das primeiras máscaras contra gases e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de agentes mais tóxicos (como o fosgênio) ou cujas características físico-químicas dificultassem sua retenção pelas máscaras (como a cloropicrina). Outra conseqüência foi o desenvolvimento de agentes que causam danos à pele (como as mostardas e os vesicantes arsenicais). Ao final da primeira grande guerra, a utilização de agentes químicos por ambos os lados causou aproximadamente 100 mil mortos e 1,3 milhões de feridos (FOA, 1992).

Entre a década de 30 e a II Guerra Mundial, uma nova classe de agentes de guerra foi sintetizada na Alemanha. Esta é uma classe de organofosforados, denominados neurotóxicos, por agirem sobre o sistema nervoso e, que apresentam

uma toxidez muito maior que os agentes de guerra conhecidos anteriormente. Em 1950, novos agentes desta classe foram sintetizados na Inglaterra, os quais possuem uma grande facilidade de síntese. Em virtude disso, a ONU não tem logrado êxito no controle da produção destes agentes químicos de guerra, o que favorece também problemas na área de defesa Civil, pois compostos similares são usados como pesticidas na agricultura.

A pesquisa dos efeitos da exposição a substâncias anti colinesterase (anti-ChE) é associada principalmente à defesa química contra agentes neurotóxicos e ao tratamento da exposição acidental a inseticidas organofosforados, estimada em um milhão de casos por ano, principalmente em países do Terceiro Mundo (WHO, 1990). É estimada também por ano, a exposição direta de aproximadamente 672 milhões de pássaros a pesticidas agrícolas nos Estados Unidos da América e destes, aproximadamente 10% ou 67 milhões morrem imediatamente, causando grande desequilíbrio ecológico (U.S FISH & WILDLIFE SERVICE, 2000).

Em função disso, surgiu um ramo da defesa militar e civil, a chamada DQBN (Defesa Química, Biológica e Nuclear), que tem se preocupado com o desenvolvimento de sistemas de defesa que minimizem os efeitos tóxicos dos agentes químicos, biológicos e nucleares de guerra, na capacidade operacional dos exércitos e na população exposta (RICKETT et al., 1987).

Atualmente, a maior preocupação em relação à guerra química está focalizada nos agentes neurotóxicos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), incluindo inseticidas organofosforados, carbamatos, haletos de sulfonila, proteínas naturais do grupo da fasciculina e outros inibidores sintéticos reversíveis altamente específicos.

A *AChE* é a enzima responsável pela terminação da transmissão dos impulsos nervosos em sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (*ACh*). Esta é uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos que, se inibida, leva rapidamente à morte do organismo e que motivou o desenvolvimento de inibidores enzimáticos, que são moléculas pequenas e que podem apresentar uma alta afinidade pelo sítio catalítico.

A defesa contra um ataque por agentes químicos é realizada em três níveis. O primeiro, e melhor, é evitar o contato ou permanecer em uma área não exposta à contaminação. O segundo é o uso de equipamentos de proteção individual e coletiva para evitar o contato direto com os agentes e a conseqüente intoxicação. Em último caso, vários estágios de tratamento médico especializado (pré-tratamento, antídotos auto-administráveis etc.) buscam minimizar os efeitos da intoxicação.

Diversos processos para a descontaminação química ou enzimática de seres humanos e superfícies contaminadas por agentes neurotóxicos, assim como de outros agentes de guerra química, são conhecidos e podem ser encontrados na literatura (YANG et al., 1992; YANG, 1999; MORALES-ROJAS & MOSS, 2002; SMITH, 2008). Apesar disso, considera-se que, uma das deficiências atuais da defesa química militar reside na limitada eficácia dos antídotos disponíveis contra os agentes dos nervos (classe de inibidores neurotóxicos que possui maior toxidez), tais como o sarin e o tabun.

Como exemplo de antídoto, pode ser citada a pralidoxima (*2-PAM*), que pertence à classe das oximas, sendo um dos antídotos mais usados, que é capaz de reativar a acetilcolinesterase inibida por organofosforados.

Este trabalho faz parte de um projeto maior, entre o IBCCF-UFRJ e o Instituto Militar de Engenharia, financiado pelo programa CAPES/PRODEFESA em conjunto

entre a CAPES e o Ministério da Defesa (FIGUEROA-VILLAR *et al.*, 2006). Este projeto tem como objetivo principal o desenvolvimento de novos e mais eficientes antídotos para a intoxicação com tais agentes de uso militar, os quais terão também uso para a Defesa Civil, possibilitando ações mais eficazes em situações como, por exemplo, no ataque terrorista ao metrô de Tóquio com gás sarin, intoxicação por defensivos agrícolas, entre outros.

Com as facilidades computacionais disponíveis atualmente, tornou-se possível simular o comportamento enzimático da *AChE* e compreender melhor as etapas de inibição e reativação da mesma pela remoção química do inibidor. Novos avanços metodológicos permitem simular mais realisticamente as interações inter e intra-moleculares, além das reações químicas envolvidas, através de quebra e formação de ligações. Isso pode ser feito através do emprego das técnicas de modelagem e dinâmica molecular empregando métodos quânticos, semi-empíricos e, ainda, métodos híbridos, ou seja, métodos que utilizam ao mesmo tempo a abordagem da mecânica quântica, onde o sistema é descrito com o auxílio de funções de onda eletrônicas e, a abordagem da mecânica clássica, onde o sistema é considerado como massas e molas, em que as cargas atômicas são pontuais e são utilizadas as equações do movimento de Newton.

No desenvolvimento deste trabalho, partiu-se de um estudo por modelagem e dinâmica molecular (DM) das interações entre a pralidoxima e a acetilcolinesterase humana (*HuAChE*) inibida pelo agente tabun (GONÇALVES *et al.*, 2006).

Com o acoplamento entre a mecânica clássica e a mecânica quântica, tornou-se possível implementar no laboratório o método híbrido Mecânica Quântica / Mecânica Molecular (MQ/MM), que pôde ser aplicado no desenvolvimento de um modelo para simulação da reação entre oximas e a enzima inibida por

organofosforados, possibilitando estudos por dinâmica molecular híbrida MQ/MM. Nesses estudos tratou-se quanticamente a tríade catalítica da acetilcolinesterase humana, o organofosforado tabun, a pralidoxima e alguns outros aminoácidos pertencentes ao sítio ativo da enzima e, classicamente, o restante da enzima, os átomos do solvente e os íons. Foi então possível propor um mecanismo de reativação da enzima inibida.

A compreensão de todas as etapas de reação de desfosforilação da acetilcolinesterase tornará possível a obtenção de novos potenciais antídotos, buscando-se a síntese e a avaliação biológica dos mais promissores.

1.2 OS AGENTES DE GUERRA QUÍMICA

1.2.1 Histórico

Os agentes de guerra química, são compostos orgânicos que agem principalmente na acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pelo controle dos processos de transmissão dos impulsos nervosos, nas sinapses colinérgicas. Dentre eles, os organofosforados neurotóxicos empregados em guerra química ou em ataques terroristas, são os mais tóxicos deste grupo.

O primeiro agente neurotóxico sintetizado foi o tetraetilpírofosfato (TEPP), em 1854, mas, praticamente, o desenvolvimento de organofosforados, como agentes de guerra, só ocorreu oito décadas depois (SIDELL & BORAK, 1992; MAXWELL *et al.*, 2006). Em contrapartida, os inibidores da AChE são importantes como fármacos no tratamento do mal de Alzheimer.

Na década de 1930, a necessidade de aumentar a produção de alimentos estimulou a pesquisa de novos compostos com ação inseticida. Em particular, o cientista alemão Gerhard Schrader do laboratório I.G. Farben sintetizou em 1936 o o-etil-N,N-dimetil-fosforamido-cianidato (conhecido como tabun ou pelo código GA), que apresentava uma toxidez aos mamíferos, alta demais para permitir o seu emprego comercial como pesticida. O potencial militar do tabun foi reconhecido pelos militares alemães que passaram a produzi-lo em grandes quantidades para o emprego em munições químicas, com a produção chegando a um total estimado de 10.000 a 20.000 toneladas/ano ao final da guerra. Dois anos depois, Schrader sintetizou o o-isopropil-metil-fosfono-fluoridato (conhecido como sarin ou pelo código GB), ainda mais tóxico que o tabun. O interesse pela síntese destes agentes foi tão grande que em 1944 o alemão Richard Kuhn sintetizou o o-pinacolil-metil-fosfono-fluoridato (soman ou GD).

Na década de 50, mais um composto organofosforado foi desenvolvido pelos ingleses para uso como pesticida. Este composto, conhecido como Amilton, revelou-se tóxico demais para emprego comercial. Uma modificação química do Amilton levou à descoberta do primeiro agente da chamada série V, o VX (o-etil-S-[2-(diisopropilamino)etil]-metil-fosfonotioato). Os agentes da série V apresentavam, ao contrário da série G (tabun, sarin e soman), baixa volatilidade e uma toxidez por absorção cutânea quase igual à toxidez por inalação. Sarin e VX eram os agentes neurotóxicos padrões dos EUA, enquanto a União Soviética estocava soman. O tabun foi abandonado pelas principais potências em função de sua menor toxidez, mas sua maior facilidade de produção tornou-o atraente para países que pretendiam iniciar um programa de desenvolvimento de armas químicas.

Hoje em dia, GA, GB, GD e VX (Fig.1.1), são os quatro principais agentes neurotóxicos padronizados para uso em munições químicas e estocados em grandes quantidades por vários países (FRANZ *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; DELFINO *et. al.*, 2009).

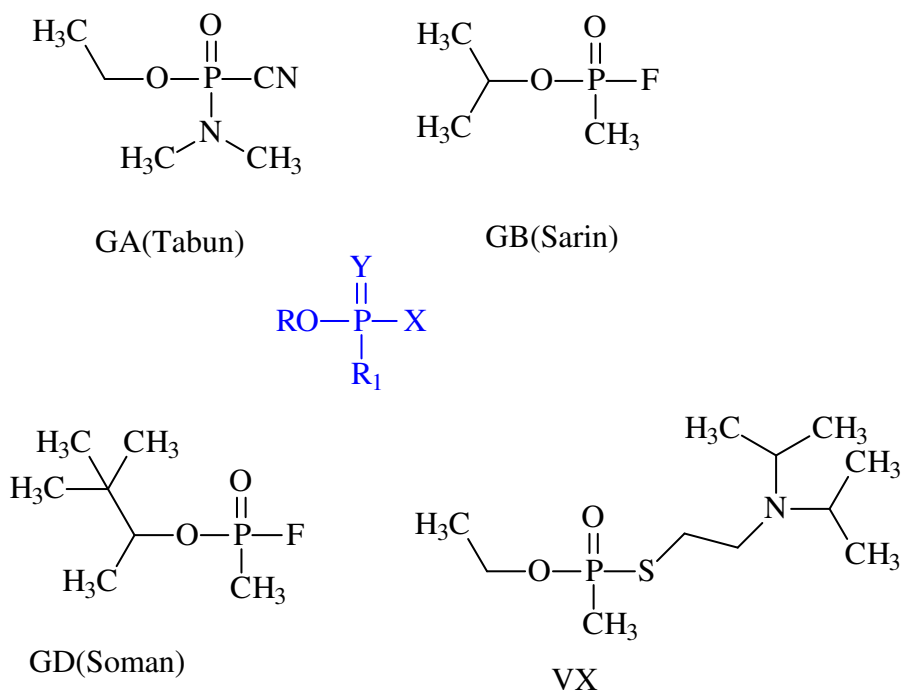


Figura 1.1. Principais agentes neurotóxicos, com o esquema geral ao centro, em coloração azul.

Em geral, estes agentes apresentam um átomo de fósforo quiral, Fig. 1.1, ligado a um grupo de saída X (como o flúor e o cianeto, por exemplo), a um radical R_1 (alquila ou dialquilamino), um radical R [alquila, cicloalquila, H (somente na série V), $(CH_2)_nN^+R_3$ (quando $X=F$)], formando dupla ligação com um grupo Y (oxigênio ou raramente enxofre).

O primeiro uso comprovado destes agentes em conflitos armados foi por volta de 1980, na guerra Irã-Iraque, onde as forças iraquianas empregaram o GA. Durante a primeira Guerra do Golfo, tropas americanas foram expostas ao GB após

destruírem um depósito iraquiano de munições químicas. Em 1994 e 1995, GB foi usado em ataques terroristas no Japão, dos quais o mais grave, no metrô de Tóquio, deixou 12 mortos e 5500 feridos, muitos dos quais permaneceram em coma durante algum tempo (TU, 1998; MASKAWA, 1995).

1.2.2 Principais Propriedades Físicas

Apesar de serem conhecidos como “gases dos nervos” e de serem empregados em forma de vapor, todos estes quatro agentes (GA, GB, GD e VX), apresentam-se sob a forma líquida à temperatura ambiente. O que os torna “gasosos” é meramente a explosão das munições que os contêm ou seu espargimento por *spray* (SIDEELL *et al.*, 1997; BLACK & HARRISON, 1996).

O VX é um agente que possui menor volatilidade e maior ponto de ebulição, o que o torna persistente no meio ambiente, podendo levar semanas para ser disperso. Já a série G (GA, GB e GD) é moderadamente volátil, dispersando no ambiente em poucas horas. Assim, apesar destes quatro agentes serem bastante tóxicos, por todos os meios de absorção, a série G apresenta um maior risco por inalação, enquanto o VX apresenta maior risco por absorção cutânea. As propriedades físicas destes agentes são resumidas na Tab. 1.1.

Tabela 1.1. Propriedades físicas dos agentes neurotóxicos (SIDEELL, 1997; BLACK, 1996).

Propriedade	GA	GB	GD	VX
Ponto de Ebulição(°C)	230	158	198	298
Pressão de Vapor (mm Hg) (20°C)	0,035	2,1	0,34	0,0004
Densidade				
Vapor (ar=1)	5,6	4,86	6,3	9,2
Líquido (g/mL) (20°C)	1,077	1,10	1,01	1,013
Viscosidade (cp) (20°C)	2,77	1,54	-	12,2
Solubilidade em água (%) (20°C)	9,8	Miscível	2,1	3,0

1.2.3 Propriedades Químicas

Os estudos acerca das propriedades químicas dos agentes dos nervos têm-se concentrado nas reações referentes à sua detecção, descontaminação, estabilização e comportamento em sistemas biológicos (BLACK & HARRISON, 1996). No caso do sarin e do soman, a inibição da *HuAChE*, resume-se em um ataque nucleofílico, onde os elétrons livres do oxigênio ácido da Ser203 atacam o fósforo parcialmente positivo e a ligação P-F é rompida, reação esta conhecida como S_N2 (substituição nucleofílica de segunda ordem). Para o tabun e o VX, a ligação a ser quebrada inicialmente varia com os reagentes e condições de reação. Para todos estes quatro agentes o nucleófilo é um resíduo serina presente no interior do poço do sítio ativo da acetilcolinesterase, sendo esta a base de sua toxidez (FRANZ *et al.*, 2004).

Valores letais para a contaminação a partir de organofosforados para várias espécies de seres vivos encontram-se disponíveis na literatura (MARRS *et al.*, 1996). Porém, para os seres humanos estes valores são estimados. Essas estimativas são apresentadas na Tab. 1.2, onde o ácido cianídrico, que inibe a enzima citocromo c oxidase resultando em hipóxia citotóxica (BALLANTYNE *et al.*, 2007), foi tomado como referência e a LD_{50} é a dose capaz de matar 50% da população exposta. No caso de exposição ao vapor, a dose é dada pelo produto $C \times t$ (concentração do agente no ar $\times$ tempo de exposição) (SIDELL, 1997; THE WEDNESDAY REPORT, 2007).

Tabela 1.2. Toxidez estimada dos agentes neurotóxicos ao homem

Agente	LC₅₀ (inalação) (mg.min/m³)	LD₅₀ (pele) (mg)
Tabun (GA)	400	1000
Sarin (GB)	100	1700
Soman (GD)	70	50
VX	50	10
HCN	2500-5000	-

*LD₅₀= dose capaz de matar 50% da população exposta, por absorção cutânea.

*LC₅₀= dose capaz de matar 50% da população exposta, por via respiratória.

1.3 A ACETILCOLINESTERASE

As colinesterases definem uma família de serino hidrolases, dentro da superfamília de α/β hidrolases (OLLIS *et al.*, 1992; NARDINI *et al.*, 1999). As colinesterases são divididas em acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BuChE), que apresentam diferentes especificidades para seus substratos naturais (ésteres de colina) e inibidores (TAYLOR & RADIC, 1994). Tanto a AChE quanto a BuChE são encontradas nos neurônios e nas células gliais do cérebro humano (GIACOBINI, 2004).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela terminação da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através de uma rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). É por esta sua função chave, que ela se torna um dos alvos moleculares em contaminações por agentes neurotóxicos, pesticidas, venenos de cobras e também no tratamento com fármacos anti-Parkinson.

Existe uma grande variedade de neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Dentre eles, os dois mais importantes, e que participam dos processos do sistema nervoso periférico, são a acetilcolina e a noradrenalina, Fig. 1.2, nos nervos motores dentro do SNC motor somático, no SNC motor autônomo e no sistema entérico.

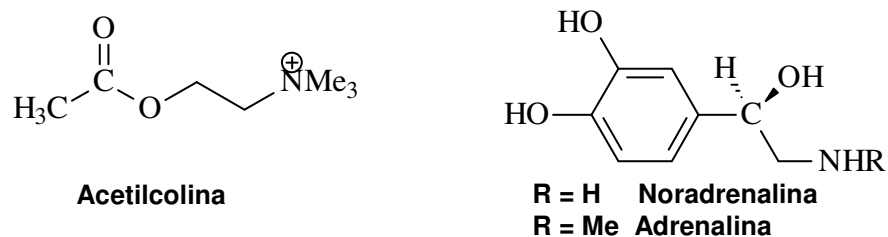


Figura 1.2. Os dois principais neurotransmissores do sistema nervoso periférico.

Ações referentes ao sistema nervoso periférico podem ser divididas em dois sistemas: o somático e o autônomo. O subsistema autônomo pode ser classificado como simpático ou parassimpático. No sistema somático as estimulações se concentram nos músculos esqueléticos. Já no autônomo, tem-se a noradrenalina, pertencente à classificação autônoma simpática, que se concentra nos órgãos e principalmente nos músculos cardíacos, e a acetilcolina, pertencente ao sistema autônomo parassimpático, que, diferente da noradrenalina, interage com receptores específicos (PATRICK, 2002).

1.3.1 O Sistema Nervoso Periférico

Como o nome indica, o sistema nervoso periférico, é uma parte do sistema nervoso que está na periferia do sistema nervoso central (SNC, cérebro e coluna vertebral).

Existem algumas divisões e subdivisões do sistema periférico. As primeiras distinções que se pode fazer são as seguintes:

- Nervos sensoriais (nervos que recebem mensagens no sentido do corpo para o SNC).
- Nervos motores (nervos que levam a mensagem do SNC ao resto do corpo), que se subdividem em:

- a) Sistema nervoso motor somático: não há sinapse e o neurotransmissor nas junções neuromusculares é a acetilcolina. Neste sistema, as mensagens são levadas do SNC para os músculos esqueléticos, onde o resultado final é a contração destes.
- b) Sistema nervoso motor autônomo: neste caso os nervos conduzem os impulsos no sentido do SNC para os músculos lisos, cardíacos e medula. Este sistema pode ser dividido em dois subgrupos (já comentado no primeiro parágrafo após a Fig. 1.2): parassimpático e simpático.
- c) Sistema nervoso entérico: Este terceiro subgrupo do sistema nervoso periférico está localizado nas paredes do intestino. Recebe mensagens tanto dos nervos autônomos simpáticos quanto dos parassimpáticos, além de responder a efeitos locais como reflexos importantes nas funções gastrointestinais (GI).

Na Fig. 1.3, é representado um esquema sintético e explicativo dos três subsistemas do sistema nervoso periférico, sendo que os receptores nicotínicos são aqueles estimulados, por exemplo, pela nicotina (presente no tabaco) e os muscarínicos pela muscarina, encontrada nos cogumelos venenosos.

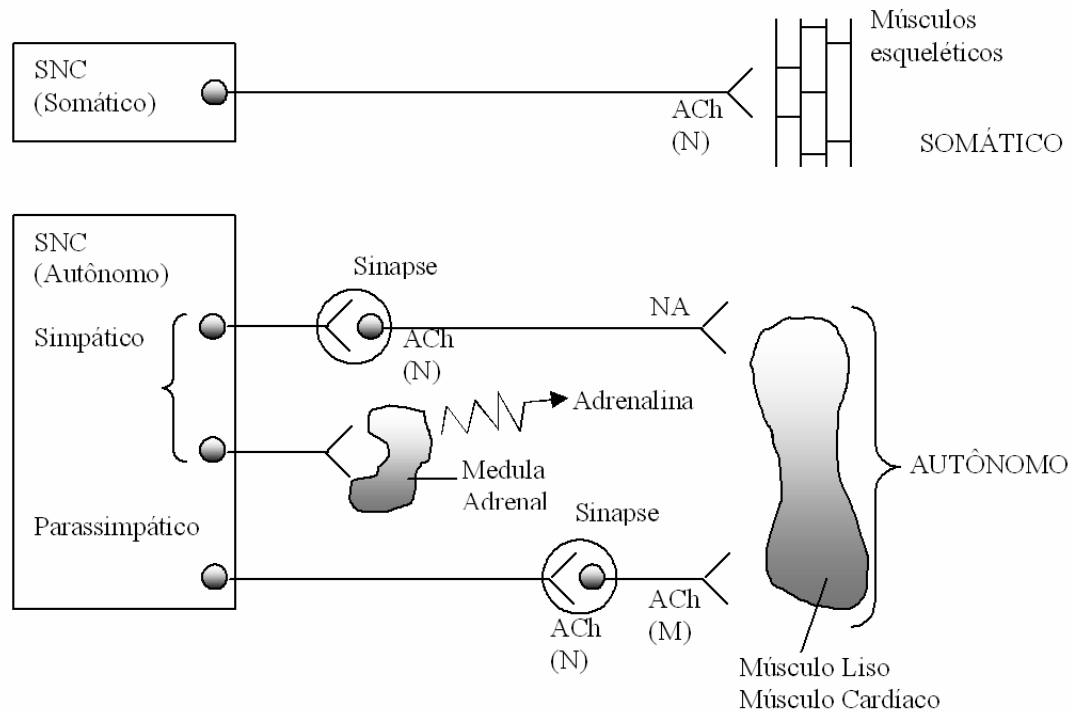


Figura 1.3. Nervos motores do sistema nervoso periférico. N, receptores nicotínicos; M, receptores muscarínicos (PATRICK, 2002).

1.3.2 A Acetilcolina

Como já foi comentado na Seção 1.3, a acetilcolina tem grande importância na transmissão dos impulsos nervosos em todo o sistema nervoso e, se não houver uma pausa da transmissão nervosa em determinados instantes, poder-se-á ter uma super transmissão de impulsos nervosos, gerando consequências drásticas como, batimento cardíaco e respiração irregulares até uma parada respiratória central, levando o indivíduo à morte devido à síndrome colinérgica. Felizmente, a acetilcolinesterase age hidrolisando a acetilcolina, regulando a transmissão dos impulsos nervosos no organismo. Esta reação ocorre no interior do sítio ativo da acetilcolinesterase.

1.3.2.1 Interações da Acetilcolina com o Sítio Ativo da Acetilcolinesterase

Existem duas áreas importantes a serem consideradas no sítio ativo da AChE: a região aniônica e a região catalítica (Fig. 1.4). Nestas regiões, há três domínios. No primeiro, se localizam os resíduos serina e histidina da tríade catalítica (Ser203, His447 e Glu334); o segundo é o próprio subsítio aniônico, localizado a uma distância igual ou superior a 4,7 Å da hidroxila do resíduo serina, carregado negativamente, onde o grupo amônio quaternário da ACh interage, eletrostaticamente, com o Glu334 e; o terceiro é constituído por uma região hidrofóbica importante para a ligação com substratos cíclicos (QUINN, 1987). Existe ainda um quarto domínio na AChE, no qual interagem ligantes catiônicos e alguns outros ligantes neutros como a tacrina. Este domínio se localiza a mais de 20 Å do sítio ativo e é denominado sítio aniônico periférico. A complexação de ligantes com este sítio periférico freqüentemente provoca alterações na conformação do sítio ativo. Estes quatro domínios atuam de forma concertada, originando reações com cinética complexa que caracterizam a AChE (QUINN, 1987; SHAFFERMAN *et al.*, 2005).

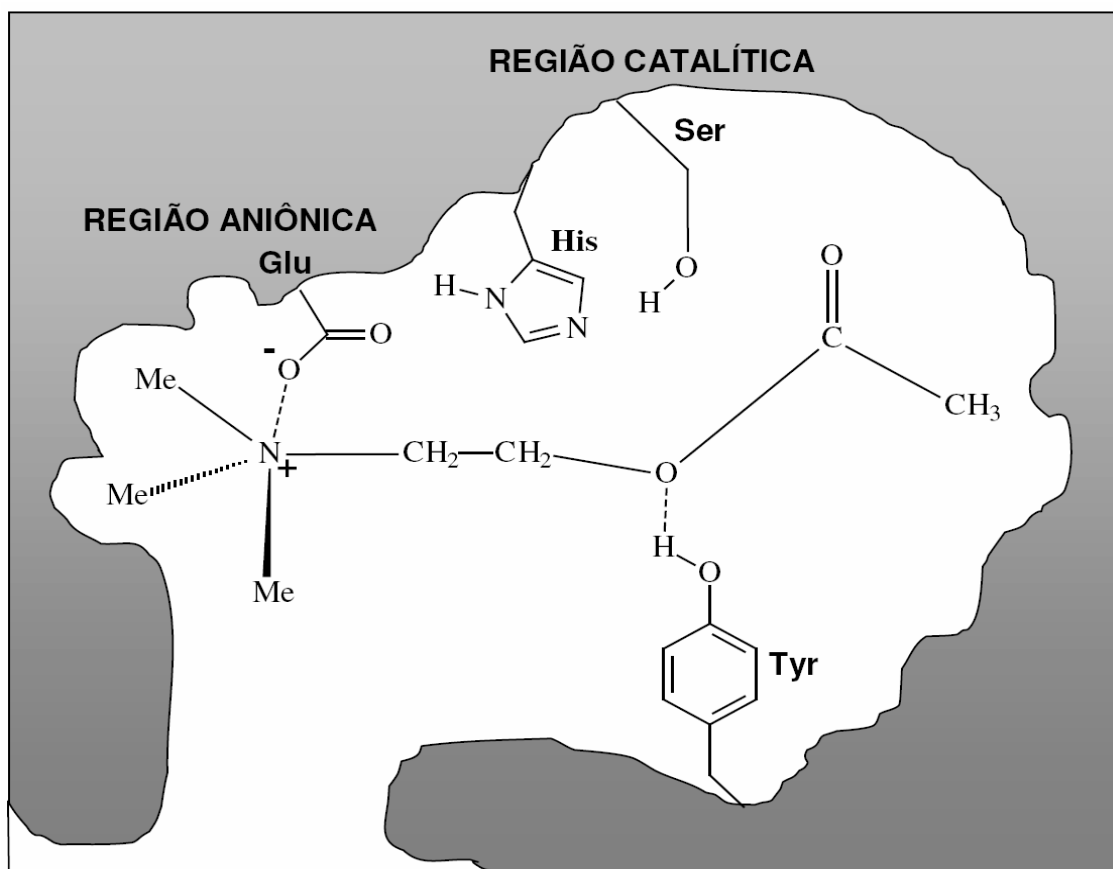


Figura 1.4. Sítio ativo da acetilcolinesterase complexado com a acetilcolina. Nesta região ocorrem as principais interações com inibidores ou substratos (PATRICK, 2002; ORDENTLICH *et al.*, 1998).

A literatura sugere que a acetilcolina interage com a acetilcolinesterase por uma ligação iônica com um glutamato (Glu) e uma ligação hidrogênio com uma tirosina (Tyr). Os resíduos histidina (His) e serina (Ser), no sítio catalítico, participam do mecanismo de hidrólise (DELFINO *et al.*, 2009).

A região aniônica da acetilcolinesterase é muito similar à região aniônica dos receptores colinérgicos. Existe uma cavidade hidrofóbica grande o suficiente para acomodar resíduos nas dimensões de grupos metil. A carga positiva do nitrogênio pode interagir tanto com a carga negativa do Glu como também com aminoácidos aromáticos por interações cátion π .

1.3.2.2 Mecanismo de Hidrólise

Uma das propostas conhecidas para o mecanismo de hidrólise pela *AChE* reside no fato da histidina agir como um catalisador ácido/base durante todo o mecanismo, enquanto a serina funciona como nucleófilo. Este não é o melhor papel da serina, tendo em vista que um álcool alifático é um nucleófilo fraco. De fato, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, porém, com a ajuda do resíduo histidina, isso se torna viável. Além disso, o restante da arquitetura do sítio ativo e da própria enzima, foi impulsionado pela seleção natural para otimizar a reação. O mecanismo se dá por várias etapas, como é mostrado na Fig. 1.5.

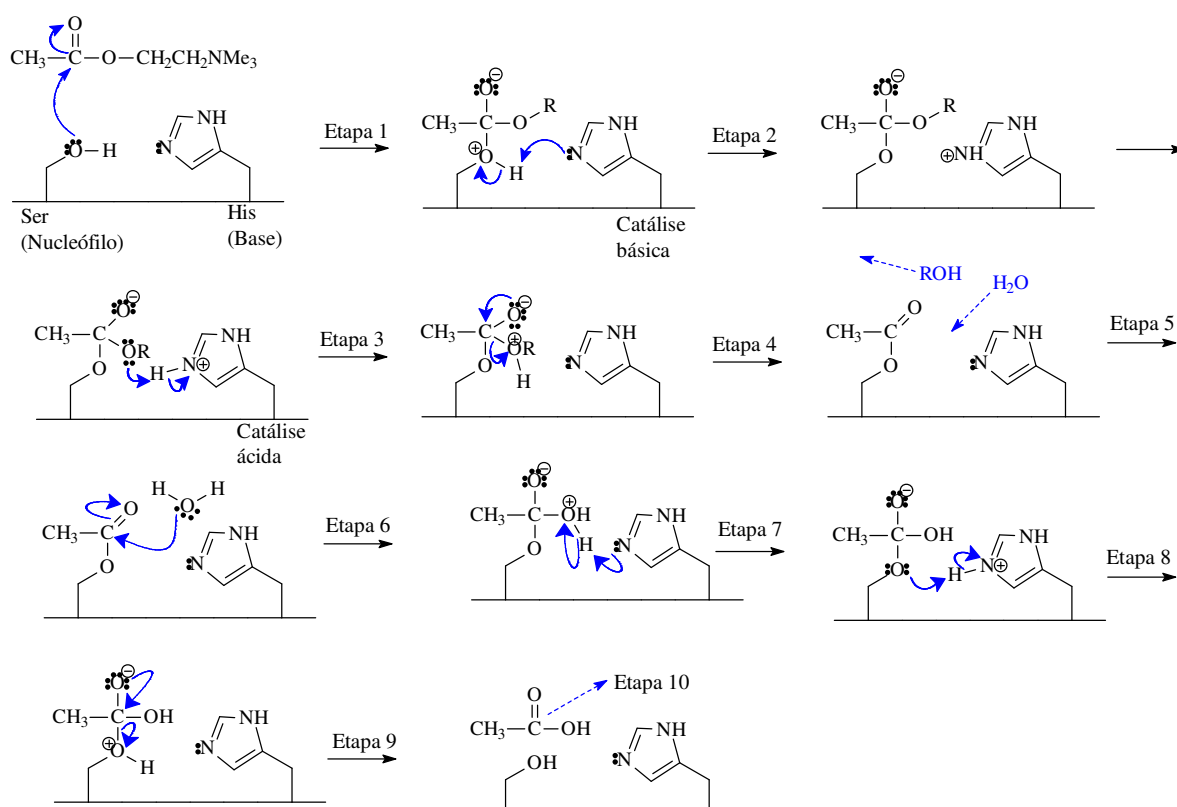


Figura 1.5. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (PATRICK, 2002).

Onde, na:

Etapa 1, a acetilcolina se aproxima, ligando-se à acetilcolinesterase. O resíduo serina age como um nucleófilo, usando um par de elétrons para formar um éster de acetilcolina.

Etapa 2, o resíduo histidina catalisa esta reação, agindo como uma base, removendo um próton. Isto torna a serina mais nucleofílica.

Etapa 3, a histidina agora age como um catalisador ácido e protona o grupamento 'OR', tornando-o um melhor grupo de saída.

Etapa 4, a regeneração do grupo carbonila expelle o grupo álcool do intermediário.

Etapa 5, o grupo acila da acetilcolina é covalentemente ligado ao sítio ativo. A colina deixa o sítio ativo, sendo substituída por água.

Etapa 6, a água age como um nucleófilo e usa um par de elétrons do oxigênio para atacar o grupo acila.

Etapa 7, como a água é normalmente um nucleófilo fraco, a histidina age novamente como um catalisador básico, capturando um próton dela.

Etapa 8, a histidina agora age como um catalisador ácido, protonando o oxigênio da serina.

Etapa 9, o grupo carbonila é reconstituído e o resíduo serina é liberado.

Etapa 10, o ácido etanóico deixa o sítio ativo e o ciclo recomeça.

1.3.3 A Acetilcolinesterase Humana

A partir de estudos de difração de raios-X, obteve-se a forma cristalográfica da acetilcolinesterase humana complexada com fasciculina-II, uma toxina polipeptídica purificada do veneno da cobra mamba verde (SOREQ *et al.*, 1990).

Além dessa estrutura, também foram resolvidas as estruturas de recombinantes de acetilcolinesterases selvagens e da mutante humana E202Q (*HuAChE*) complexadas com fasciculina-II. A estrutura do mutante E202Q foi obtida com 2,7 Å de resolução, adquirindo-se um modelo de acetilcolinesterase humana com duas de suas alças incompletas, a qual se encontra depositada no servidor Protein Data Bank (PDB), sob o código 1B41 (KRYGER *et al.*, 2000). Através de estudos por modelagem comparativa, obteve-se uma proposta para a acetilcolinesterase humana completa, complexada com o agente neurotóxico tabun na configuração S (GONÇALVES *et al.*, 2006), mostrado na Fig. 1.6, construída com o programa PyMOL (DELANO, 2002; DELANO & BROMBERG, 2004).

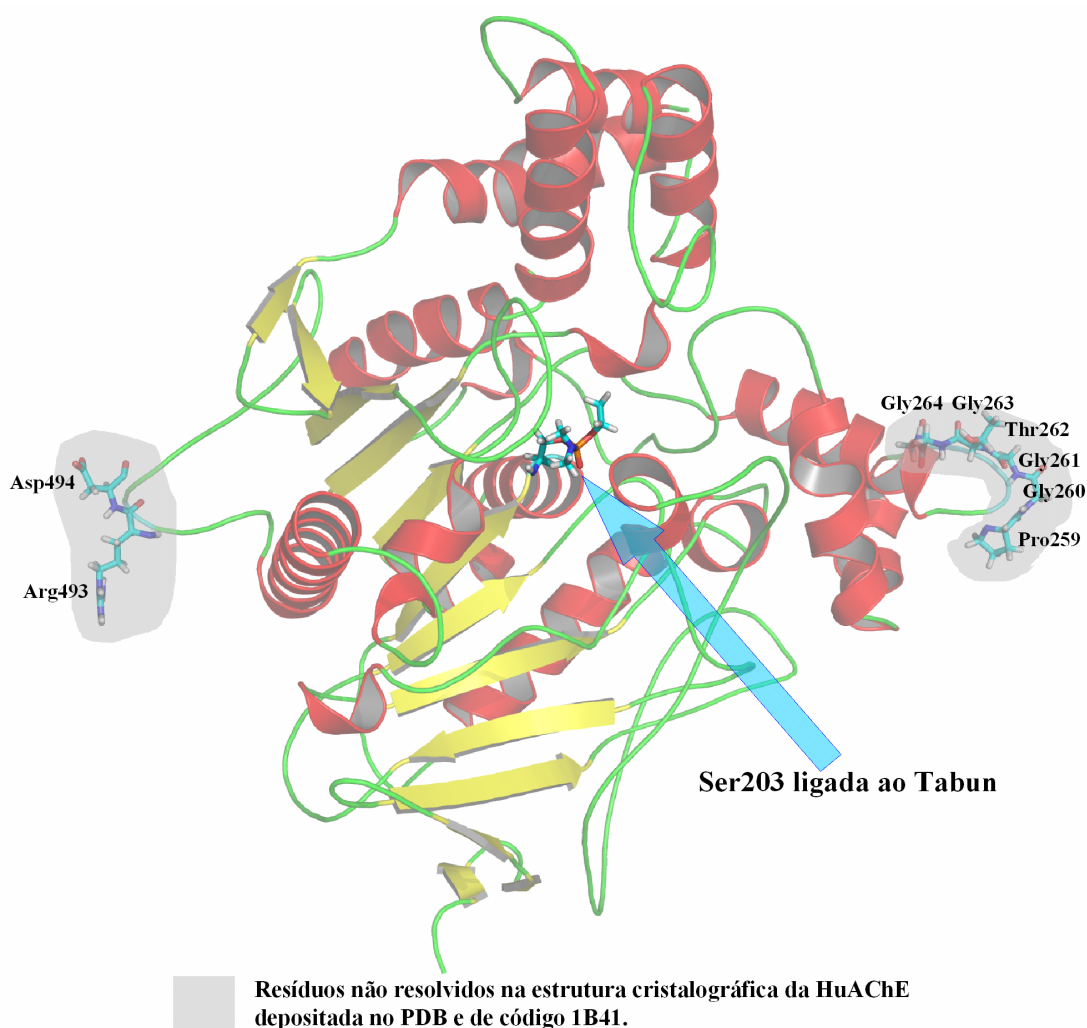


Figura 1.6. Modelo da acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico Tabun e com as duas alças completas.

Atualmente, já existe a estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase humana inibida com outros organofosforados neurotóxicos utilizados em guerra química e com alguns pesticidas agrícolas (HORNBERG *et al.*, 2007).

1.3.3.1 Inibição, Reativação e Envelhecimento da HuAChE

A inibição da acetilcolinesterase ocorre no interior do sítio ativo, próxima à tríade catalítica da enzima, em dois passos. No primeiro passo, o organofosforado interage com a Ser203, no caso da acetilcolinesterase humana, ocorre a ligação entre o átomo de fósforo do tabun e o oxigênio da serina, com conseqüente desprendimento do grupo de saída do organofosforado (ORDENTLICH *et al.*, 1996). O segundo passo, conhecido como etapa de envelhecimento, leva à saída do grupo alquila, com a provável formação de um carbocátion, em que a velocidade do envelhecimento varia de organofosforado para organofosforado, ou seja, para o tabun, o tempo de meia-vida para o envelhecimento da enzima fosforilada é de aproximadamente 19 horas; para o sarin, 3 horas; para o VX, 36,5 horas; e para o soman, cerca de 2 minutos apenas (WOREK *et al.*, 2004; WOREK *et al.*, 2005).

Após o primeiro passo, a reação ainda pode ser revertida. Para reativar a enzima inibida, geralmente se empregam substâncias conhecidas como oximas, Fig.1.7, que conseguem retirar o grupo organofosforado da Ser203. Essa reação somente é possível se ainda não tiver ocorrido o envelhecimento (a desalquilação do organofosforado: saída do grupo R₁, Fig. 1.1). Uma das principais oximas, e a mais utilizada é a pralidoxima (EDDLESTON *et al.*, 2002; KUCA *et al.*, 2004; THE MEDICAL LETTER, 2002). Alguns países europeus utilizam outras oximas, como a

trimedoxima (TMB-4) e a obidoxima (ou toxogonina) (SOMANI *et al.*, 1992; SIDELL, 1997; EYER & WOREK, 2007).

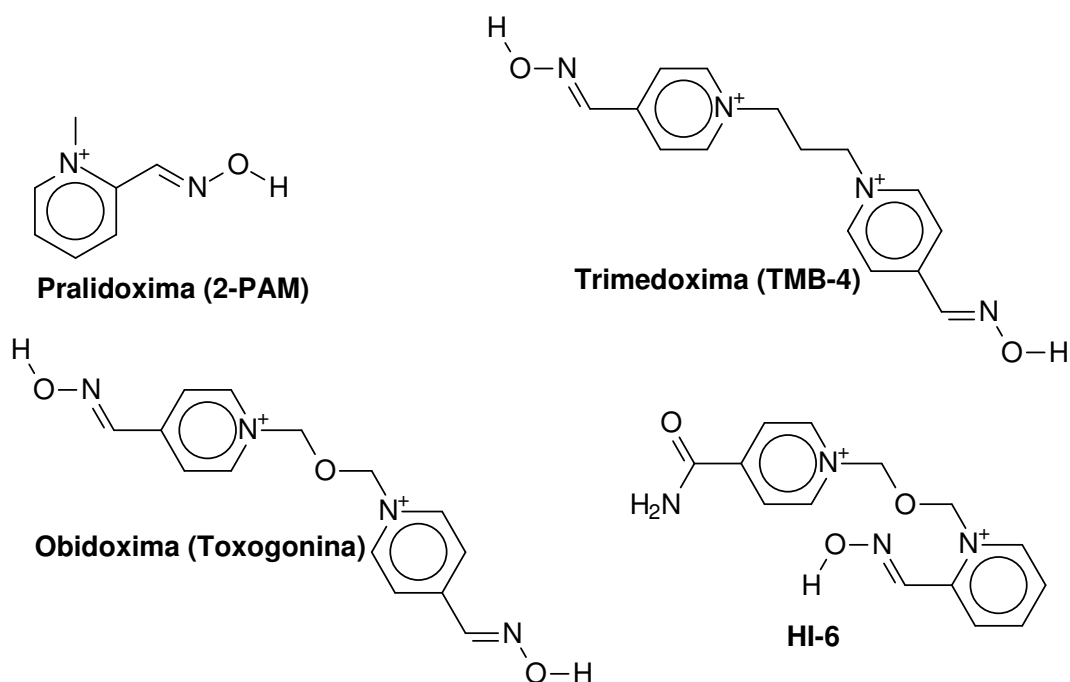


Figura 1.7. Principais oximas empregadas atualmente.

A etapa de reativação requer a cisão da ligação serina-organofosforado, que pode ser feita com o auxílio do grupamento hidroxilamina, Fig. 1.8.

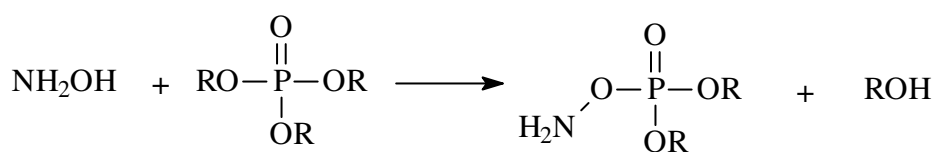


Figura 1.8. Cisão de organofosforados.

A oxima, neste caso a pralidoxima, estando posicionada dentro do sítio ativo, Fig. 1.9, favorecerá a reação entre o grupo hidroxilamina e a serina fosforilada (PATRICK, 2002). É importante mencionar que a eficiência de uma oxima, portanto, é função da nucleofilicidade do oximato e da taxa de decaimento da oxima fosforilada (EYER & WOREK, 2007).

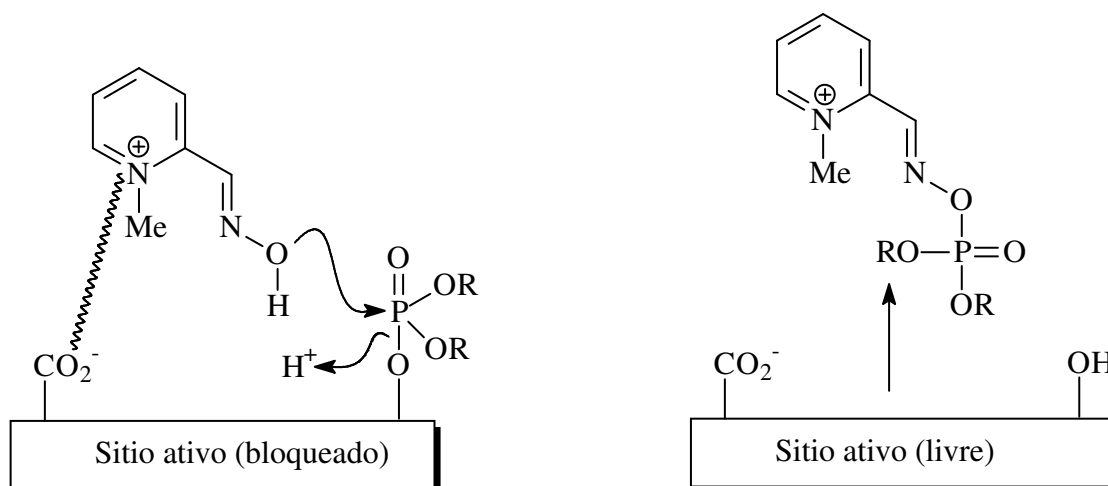


Figura 1.9. Reação entre o grupo hidroxilamina da oxima e a serina fosforilada.

Após a etapa de envelhecimento, a enzima dificilmente pode ser reativada por oximas e, portanto, a janela terapêutica das oximas é determinada pela taxa de envelhecimento. Na Fig. 1.10, é mostrado um esquema resumido de inibição, reativação e envelhecimento da acetilcolinesterase (EDDLESTON *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2006).

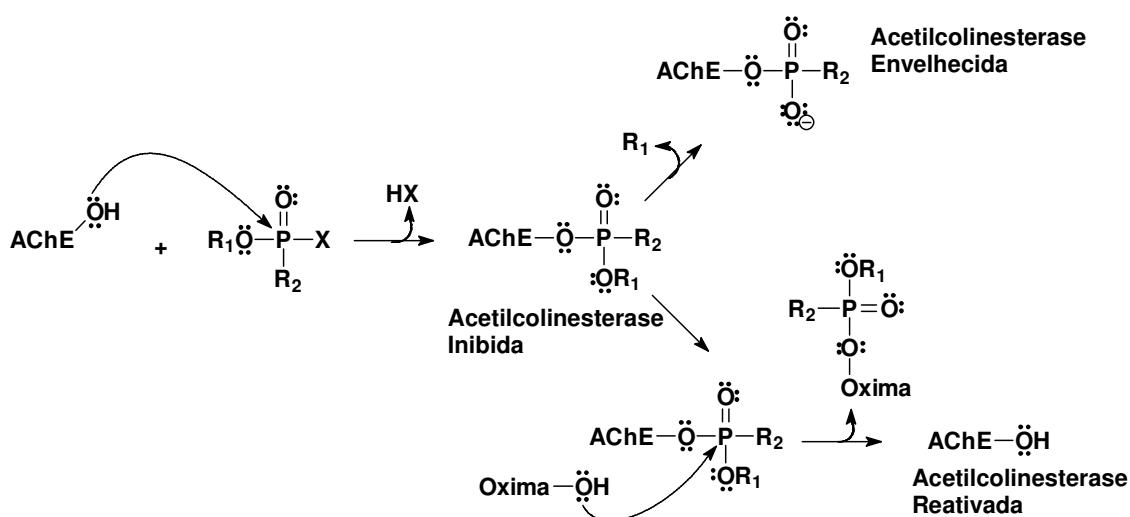


Figura 1.10. Inibição, reativação e envelhecimento da AChE.

Um fenômeno que ocorre com o GA, no complexo entre a AChE de camundongo e o organofosforado ainda não-envelhecido, é o movimento do anel

imidazol do resíduo His447 que desloca os resíduos Tyr337 e a Phe338, reduzindo o diâmetro do poço do sítio ativo, dificultando o acesso de antídotos (EKSTRÖM *et al.*, 2006). Este fenômeno não foi observado com outros agentes neurotóxicos. Esta mudança conformacional é reversível, de modo que os resíduos citados ocupem posições semelhantes no complexo AChE-tabun envelhecido. Acredita-se que este acontecimento, por vezes designado envelhecimento conformacional, dificulte a reativação da AChE inibida por tabun, mesmo antes do envelhecimento propriamente dito (EKSTRÖM *et al.*, 2006a; DELFINO *et al.*, 2009).

1.4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é à descrição em nível molecular das interações entre oximas e a acetilcolinesterase humana, inibida pelo agente neurotóxico tabun. Buscou-se identificar as energias envolvidas entre a pralidoxima e aminoácidos do sítio ativo da acetilcolinesterase humana, e ainda, a mobilidade do fármaco no interior do sítio. Após a acomodação da oxima próxima à tríade catalítica (Ser203, His447 e Glu334), empregou-se técnicas de dinâmica molecular híbrida (MQ/MM), que permitem o estudo de reações químicas, de forma a se chegar a um possível mecanismo de reativação da enzima inibida.

A partir dos objetivos gerais, chegou-se aos seguintes objetivos específicos:

- Utilizar como condições de partida, para as simulações clássicas, coordenadas já propostas por Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES *et al.*, 2006), aumentando o tempo de simulação de 1,0 nanossegundo (ns) para 6,5 ns.
- Compilar um pacote computacional híbrido, etapa crucial e delicada deste trabalho, que envolve algoritmos da mecânica molecular e da mecânica quântica, possibilitando a adição de um maior número de átomos quânticos no sistema e a realização de simulações por dinâmica molecular *quanto-clássico/mecânica* (MQ/MM), tratando parte do sistema quanticamente e o restante classicamente.
- Verificar pelo método MQ/MM a espontaneidade de cada um dos passos da reação de reativação da enzima inibida.
- Calcular por métodos semi-empíricos, as frequências imaginárias, através dos modos vibracionais no infravermelho, para cada etapa de reação de reativação.
- Computar a coordenada de reação intrínseca (CRI), para verificar se há conectividade entre reagentes, estado de transição e produtos, em cada etapa de reação química.

2 METODOLOGIA

2.1 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular tem como principal objetivo reproduzir o comportamento de modelos de moléculas e enzimas em seu ambiente fisiológico. Até relativamente pouco tempo atrás, só se fazia modelagem de moléculas simples, usando modelos mecânicos ou lápis, papel e uma calculadora manual. O surgimento e a evolução das técnicas computacionais, todavia, revolucionaram a área e aumentaram sobremaneira o número e a complexidade dos sistemas que podem ser estudados por esta técnica (HEHRE *et al.*, 1998).

Quando se utiliza Modelagem Molecular, a primeira regra que se deve ter em mente é que nenhum método de cálculo é ideal para todas as aplicações, e que um grande esforço tem sido desenvolvido para achar métodos adequados às diferentes aplicações (HEHRE *et al.*, 1998).

Dentro da química quântica, os modelos Hartree-Fock (HF) são geralmente satisfatórios para uma extensa variedade de comparações termodinâmicas e cinéticas. Eles produzem um excelente resultado para as geometrias de equilíbrio e estados de transição, o que é razoável para as conformações de equilíbrio. Todavia, existem limitações e ressalvas aos modelos Hartree-Fock. Primeiro, as interações eletrônicas instantâneas (correlações) não são consideradas devido à forma como a repulsão eletrônica é tratada. Isto significa que a posição instantânea de um elétron não é afetada pela presença de outro elétron em sua vizinhança. Também modelos HF não encontram muito sucesso na descrição de estruturas de compostos que contêm metais de transição. Finalmente, deve ser levado em conta que os cálculos

HF aumentam em custo computacional muito rapidamente com o aumento do tamanho da molécula. Isso faz com que eles não se tornem aplicáveis apenas às moléculas com ordem de grandeza de 10^2 átomos, dependendo do conjunto de base.

O insucesso dos modelos HF para descrever a geometria dos compostos que contêm metais de transição pode ser consequência da descrição incompleta do acoplamento dos movimentos e interações dos elétrons. Porém, modelos correlatos, que transpõem esta dificuldade têm sido desenvolvidos. Dentre eles, o mais popular é o Möller Plesset 2 (MP2). Eles geralmente produzem excelentes descrições das geometrias do equilíbrio e estados de transição e conformações, além das grandezas cinéticas e termodinâmicas das reações, inclusive daquelas com o surgimento ou quebra de ligações. Esses modelos, todavia, são bem mais caros do ponto de vista computacional que os modelos HF, e seu uso se restringe geralmente a moléculas com poucos átomos pesados.

Uma alternativa aproximada para o problema da correlação eletrônica é encontrada nos conhecidos modelos de Teoria do Funcional de Densidade (TFD) (DFT - *Density Functional Theory*) (BECKE, 1988; BECKE, 1993; MORGON & CUSTODIO, 1995; HOHENBERG & KOHN, 1964; KOHN & SHAM, 1965). Ao invés de aproximar a solução poli-eletrônica por uma composição de soluções unieletrônicas, os modelos TFD explicitam os efeitos multieletrônicos através de um termo de correlação baseado num problema multieletrônico “idealizado”. Comparativamente, o custo computacional envolvendo TFD aumenta menos significativamente com o aumento do número de átomos do que MP2 ou HF. Porém, existem ressalvas no modelo. Diferente dos modelos anteriores, cujas correlações podem ser melhoradas, o modelo TFD só pode ser melhorado trazendo o problema

multieletrônico “idealizado” mais próximo do “real”, porém esta etapa não é tão óbvia. Adicionalmente, os modelos TFD não são tão simples de se trabalhar, pois requerem integrações numéricas que introduzem incertezas nos cálculos, fazendo com que eles devam ser cuidadosamente monitorados e controlados.

Os métodos que utilizam a Mecânica Quântica e que são um pouco menos precisos são métodos semi-empíricos, conhecidos também como Métodos dos Orbitais Moleculares, e nesta lista se incluem os populares MNDO, AM1, PM3, PM5, PM6 e RM1. Os modelos semi-empíricos, que podem ser aplicados a moléculas compreendendo até 500 átomos (em um computador Pentium IV com frequência de 3 GHz e 2 GB de memória RAM), têm tido muito sucesso no cálculo da geometria de equilíbrio, incluindo as geometrias dos compostos que contêm metais de transição e compostos organometálicos, dependendo do método; e moderado sucesso para o cálculo das geometrias dos estados de transição.

Já os métodos da Mecânica Molecular podem facilmente ser aplicados a moléculas contendo mais de 100.000 átomos em sua estrutura, tendo sido recentemente desenvolvido com o uso de campo de forças que produzem descrições quantitativas das estruturas e conformações das moléculas orgânicas. São exemplos o MMFF94 (CLARK *et al.*, 1989), SYBIL (HALGREN, 1996), GROMOS96 (VAN GUSTEREN *et al.*, 1996), CHARMM (BROOKS *et al.*, 1983), TRIPOS 5.2 (SHIH & CHEN, 1995) e o OPLS/AA (JORGENSEN *et al.*, 1996; KAHN & BRUICE, 2001).

2.1.1 Mecânica Molecular

Também conhecidos como métodos de campo de forças, ignoram os movimentos dos elétrons do sistema e a energia é considerada como uma função apenas das posições nucleares. Isto torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos, mas não podem ser aplicados em processos com ruptura e formação de ligações químicas. Em alguns casos, os campos de forças podem levar a respostas acuradas em um tempo computacional menor (HIGGINS & TAYLOR, 2001). A MM, todavia, não pode prever propriedades que dependem da distribuição eletrônica em uma molécula, tais como estados de transição, reações e efeitos de polarização. Para a MM funcionar corretamente é necessário fazer uma série de aproximações. A primeira delas é a aproximação de Born-Oppenheimer, sem a qual seria impossível descrever a energia como uma função de coordenadas nucleares. A MM é baseada num modelo simples das interações dentro de um sistema com contribuições de processos tais como o estiramento de ligações, o abrir e fechar de ângulos e as rotações em torno de ligações simples. Transferibilidade também é um atributo chave de um campo de forças, uma vez que ela permite que um conjunto de parâmetros desenvolvidos e testados em um número relativamente pequeno de casos seja aplicado a uma faixa muito mais ampla de problemas. Além disso, parâmetros desenvolvidos a partir de dados de pequenas moléculas podem ser usados para estudar moléculas muito maiores, como as estruturas poliméricas e proteínas, por exemplo.

A maioria dos campos de forças da MM em uso hoje em dia para sistemas moleculares podem ser interpretados em termos de um simples conjunto de quatro componentes correspondentes às forças intra e intermoleculares dentro do sistema

(VAN DER SPOEL *et al.*, 2002). Penalidades energéticas estão associadas ao desvio de ângulos e ligações de seus valores de referência ou de equilíbrio; há uma função que descreve como a energia varia quando as ligações são giradas e, por fim, o campo de forças contém termos que descrevem a interação entre partes não ligadas do sistema. Campos de forças mais sofisticados podem incluir termos adicionais, mas eles invariavelmente contêm estas quatro componentes. Uma característica atrativa desta representação é que os vários termos podem ser relacionados a variações em coordenadas internas específicas, tais como comprimentos de ligações, rotação de ligações ou movimentos de átomos em relação a outros átomos. Isto torna mais fácil o entendimento de como variações nos parâmetros do campo de forças afetam sua *performance* e também ajudam no processo de parametrização. Uma forma funcional do campo de forças é mostrada na Eq.2.1.

$$v(r^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_l}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.1)$$

Onde $v(r^N)$ é a energia potencial total, que é uma função das posições ($\vec{r}$) de N partículas (normalmente átomos). O primeiro termo é uma soma sobre todas as interações entre pares de átomos ligados diretamente, tratado aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento r_i desvia do valor de referência $r_{i,0}$. O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A-B-C) na molécula, novamente, modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional, de caráter periódico, que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo de interações sem ligações covalentes. Este é calculado entre todos os pares de átomos (i e j) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas

separados por no mínimo 03 ligações (considera-se somente interações intramoleculares 1,n onde $n \geq 4$). Em um campo de forças simples o termo não ligado é usualmente modelado usando um termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard -Jones para as interações e repulsões de van der Waals.

2.1.1.1 Simulações por Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular é uma técnica com a qual se estudam os movimentos em um sistema de partículas por simulação. Ela pode ser empregada tanto em sistemas de elétrons, átomos ou moléculas, como em sistemas macromoleculares (MARK, 2000). Seus elementos essenciais são: o conhecimento do potencial de interação entre as partículas e das equações de movimento que governam a dinâmica dessas partículas. O potencial pode variar do simples, como o gravitacional para interações entre estrelas, ao complexo, composto por vários termos, como o que descreve as interações entre átomos e moléculas. Para muitos sistemas, como os biomoleculares, as equações da dinâmica clássica são adequadas, já para outros, que envolvem reações químicas, são necessárias correções quânticas (KARPLUS & PETSKO, 1990; ISTVAN *et al.*, 2001).

O estado microscópico de um sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das suas partículas. Assim, pode-se escrever a Hamiltoniana H de um sistema molecular clássico como a soma das energias cinética C e potencial V em função das séries de coordenadas generalizadas $\vec{q}_i$ e de momentos generalizados $\vec{p}_i$ de todos os N átomos do sistema (MARK *et al.*, 2000):

$$H(\{\vec{q}_i, \vec{p}_i\}) = C(\{\vec{p}_i\}) + V(\{\vec{q}_i\}) \quad (2.2)$$

Onde $\vec{q}_i = q_1, q_2, \dots, q_{Nat}$ e $\vec{p}_i = p_1, p_2, \dots, p_{Nat}$

A energia potencial $V(\{\vec{q}_i\})$ contém os termos de interação inter e intramoleculares, de curto e longo alcance, e pode ser substituída pela função potencial $V(\{\vec{r}_i\})$ da Eq.2.1., tal que as coordenadas $\vec{q}_i$ sejam as coordenadas cartesianas e $\vec{r}_i$ e $\vec{p}_i$ seus momentos conjugados. A energia cinética assume a forma:

$$C(\{\vec{p}_i\}) = \sum_{i=1}^{Nat} \frac{\vec{p}_i^2}{2m_i} \quad (2.3)$$

Onde m_i é a massa do átomo i .

A partir da H é possível construir as equações de movimento que governam a evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas. Como a energia potencial dada pela Eq.2.1, independe das velocidades e H é igual a energia total do sistema, as equações derivadas da Hamiltoniana,

$$\dot{q}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} \quad (2.4)$$

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \quad (2.5)$$

conduzem às equações do movimento de Newton:

$$\dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} = v_i \quad (2.6)$$

$$\dot{p}_i = m_i \ddot{r}_i = -\frac{\partial V(\{r_i\})}{\partial r_i} = F_i \quad (2.7)$$

em que, $\ddot{r}_i$ é a aceleração do átomo i , enquanto F_i é a força sobre o átomo i (GOLDSTEIN, 1980; BERENDSEN & VAN GUNSTEREN, 1986; ALLEN & TILDESLEY, 1987; PASCUTTI, 2002).

A DM consiste, portanto, na resolução numérica das Equações de movimento de Newton para um sistema de interações de N átomos:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1 \dots N \quad (2.8)$$

em que, as forças são derivadas negativas duma função potencial $v(r_1, r_2, \dots, r_N)$:

$$F_i = -\frac{\partial v}{\partial r_i} \quad (2.9)$$

As equações são resolvidas simultaneamente em pequenos passos de tempo. O sistema é seguido por algum tempo, mantendo-se a temperatura e pressão nos valores requeridos, dependendo do *ensemble* e, as coordenadas são escritas em um arquivo de saída em intervalos regulares. As coordenadas como função de tempo representam a trajetória do sistema. Depois de mudanças iniciais, chega-se usualmente a um estado de equilíbrio dinâmico e, por uma média da trajetória de equilíbrio, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas (VAN DER SPOEL *et al.*, 2002) e diversas análises, como número médio de ligações hidrogênio ao longo do tempo, distância entre dois grupos funcionais, energia total do sistema, mudança estrutural do solvente em condições críticas de pressão, área acessível ao solvente (GONÇALVES *et al.*, 2009a; SILVA *et al.*, 2009), podem ser feitas.

2.1.2 Mecânica Quântica

2.1.2.1 O Método Hartree-Fock

Os métodos de cálculo da estrutura eletrônica da matéria (átomos, moléculas e sólidos) baseiam-se, em geral, na teoria de Hartree-Fock (HF), também chamada teoria dos orbitais. A teoria pressupõe que os elétrons se movem independentemente uns dos outros no campo do(s) núcleo(s), considerado(s) fixo(s) (aproximação de Born-Oppenheimer), e num campo médio, das interações com os outros elétrons. A estrutura eletrônica é descrita em termos de um conjunto de orbitais ocupados e orbitais desocupados, os quais são funções monoelétrônicas. As energias dos orbitais são representadas em diagramas de níveis. Estes podem ser ocupados por um ou dois elétrons, neste caso, de *spins* opostos.

Os métodos quânticos utilizados em modelagem molecular baseiam-se, em geral, na equação fundamental da mecânica quântica, a equação de Schrödinger, que para uma partícula pode ser escrita como na Eq.2.10 (ATKINS & FRIEDMAN, 1997):

$$\left\{ -\frac{\hbar}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(\vec{r}) \right\} \Psi(\vec{r}, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (2.10)$$

onde Ψ é a função de onda que descreve o sistema, sujeito a um potencial externo V . O termo entre chaves é o operador Hamiltoniano H , que fornece a energia do sistema ao ser aplicado a função de onda que o descreve.

Como a equação de Schrödinger pode ser resolvida analiticamente apenas para alguns problemas simples, como o átomo de hidrogênio, para o caso de

sistemas com mais de um átomo, são encontradas soluções aproximadas não relativísticas independentes do tempo, Eq.2.11.

$$H|\phi\rangle = E|\phi\rangle \quad (2.11)$$

em que, aplicando-se o operador Hamiltoniano (H) na função de onda (Φ), a energia (E) é obtida.

Em unidades atômicas, o operador H para N -elétrons e M -núcleos é:

$$\hat{H} = -\frac{h^2}{8\pi^2} \sum_A \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{h^2}{8\pi^2 m} \sum_a \nabla_a^2 - e^2 \sum_A \sum_a \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{A>B} \sum_{A>B} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + e^2 \sum_{a>b} \sum_{a>b} \frac{1}{r_{ab}} \quad (2.12)$$

Os primeiros dois termos descrevem, respectivamente, a energia cinética do núcleo A e a energia cinética do elétron a e, os três últimos termos, descrevem as interações Coulombicas entre as partículas. A massa nuclear é representada por M e, R_{AB} , r_{ab} e r_{Aa} são, respectivamente, as distâncias que separam os núcleos, os elétrons e os elétrons e núcleos.

Como na mecânica molecular não é possível prever quebra nem formação de ligações e os métodos *ab initio* são computacionalmente custosos (em sistemas com mais de cinquenta átomos pesados), nesta tese foram empregados métodos híbridos e semi-empíricos.

2.1.2.2 Os Modelos Semi-Empíricos

Devido à dificuldade de se aplicar métodos *ab initio* em moléculas com um número razoável de átomos (aproximadamente 500 átomos pesados), foram desenvolvidos os métodos semi-empíricos. Os primeiros destes, só tratavam os elétrons π de moléculas conjugadas. O método semi-empírico mais conhecido na década de 1930 para o tratamento dos elétrons π era o método do Orbital Molecular

de Hückel (HMO) (GURNEY, 1937; PENNEY, 1939), onde a Hamiltoniana do elétron π é aproximada para a forma mais simples:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^n H^{eff}(i) \quad (2.13)$$

em que $H^{eff}(i)$ incorpora efeitos de repulsão dos elétrons π de forma simplificada.

Embora a teoria de Hückel possa ser usada para prever as faixas de longo comprimento de onda do espectro eletrônico de hidrocarbonetos aromáticos, seria complicado tentar usar a teoria HMO para prever o espectro completo de um hidrocarboneto aromático, ou seja, a teoria de Hückel, além de negligenciar repulsões entre elétrons, não dá nenhuma separação entre termos de singleto e tripleto que surgem da mesma configuração eletrônica. Um método semi-empírico que leva em conta a repulsão entre elétrons e que melhora o método de Hückel é o método Pariser-Parr-Pople (PPP), desenvolvido em 1953 (McWEENY & PEACOCK, 1956). Neste método, a Hamiltoniana inclui repulsões eletrônicas, e a função de onda do elétron π é escrita como um produto anti-simétrico de orbitais de spin destes elétrons.

Como os métodos de Pople usam muitas aproximações, pode-se esperar que seus resultados, por mais semelhantes que sejam, não sejam tão precisos e confiáveis como os *ab initio*. Assim estes métodos, fazem bem cálculos de geometria molecular, mas, falham no cálculo de cargas e de minimização das energias de ligações. Para contornar este problema, surgiram alguns métodos melhores para cálculos semi-empíricos, dentre eles, o AM1 (*Austin Model 1*), o PM3 (*Parametric Method 3*) e o MNDO (*Modified Neglect of Differential Overlap*).

Em 1985 Dewar e colaboradores publicaram uma versão melhorada do MNDO, chamada AM1. O AM1 foi parametrizado para os elementos químicos: H, B,

Al, C, Si, Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Zn e Hg. A única diferença entre o MNDO e o AM1 está na expressão da energia potencial para o núcleo repulsivo central. Em 1989, Stewart criou o método PM3 (Método Paramétrico 3, onde o 1 seria o MNDO e o 2 o AM1) (STEWART, 1991). No PM3, que difere pouco do AM1, as integrais de repulsão eletrônica são levadas como parâmetros a serem aperfeiçoados (no AM1 estes valores foram obtidos experimentalmente por espectrometria atômica), a função para o núcleo repulsivo contém apenas duas gaussianas por átomo, e os métodos de obtenção dos valores parametrizados são peculiares.

Recentemente, foram criados novos métodos semi-empíricos, tais como, o RM1 (*Recife Model 1*) (ROCHA *et al.*, 2006), que corresponde à uma reparametrização do método AM1 para os átomos H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I e, o PM6 (STEWART, 2007), além de ter sido feita uma otimização de parâmetros atômicos, foi testado em mais de 9000 compostos diferentes. Neste método há parâmetros para 70 átomos como, por exemplo, o Ferro(II) e o Ferro(III), sendo possível otimizar estruturas como a hemina além de outros organometálicos. É importante enfatizar que, com o desenvolvimento do método RM1, os erros médios obtidos no cálculo dos calores de formação de um número considerável de moléculas (Tab. 2.1) ficaram bem reduzidos, em comparação com outros métodos semi-empíricos (ROCHA *et al.*, 2006). Além disso, é mostrado na literatura que os métodos RM1 e PM6 são tão eficientes para a análise conformacional, como também para o encontro de estados de transição de uma mesma conformação (GONÇALVES *et al.*, 2009b), em comparação com a TFD (HOHENBERG & KOHN, 1964; KOHN & SHAM, 1965), método B3LYP (BECKE, 1993; LEE & YANG, 1988) e a base 6-31 +G(d,p).

Tabela 2.1. Acurácia do RM1 em relação ao AM1, PM3 e PM5 (ROCHA *et al.*, 2006).

Tabela 2.11: Acurácia do RM1 em relação ao AM1, PM3 e PM5 (Hosoya et al., 2000).					
Átomos Parametrizados	Erro Médio				Espécies
	AM1	PM3	PM5	RM1	
C, H, N, O					
Calor de Formação (kcal mol ⁻¹)	9,06	5,98	5,41	5,04	986
P, S					
Calor de Formação (kcal mol ⁻¹)	12,60	14,64	9,11	7,40	167
F, Cl, Br, I					
Calor de Formação (kcal mol ⁻¹)	16,71	10,62	6,30	7,12	327

Uma peculiaridade do estudo e na proposta de mecanismos de reações químicas em sistemas biológicos reside no fato desses sistemas possuírem um número consideravelmente grande de átomos (de 10^4 a 10^5), sendo assim, fica inviável fazer este tipo de previsão por métodos quânticos ou até mesmo por métodos semi-empíricos. Uma forma de contornar este problema, foi a partir do uso dos métodos híbridos, conhecidos como MQ/MM (mecânica quântica / mecânica molecular).

2.1.3 O Método Híbrido MQ/MM

Conhecidos também como métodos combinados (híbridos) de mecânica quântica e mecânica molecular (MQ/MM) desde meados da década de 70 (WARSHEL & LEVITT, 1976), os métodos híbridos envolvem aproximações em que o sistema é separado em regiões quânticas e regiões clássicas, onde o potencial molecular é determinado parcialmente pelo cálculo de estrutura eletrônica por MQ e parcialmente pelo campo de forças da MM. Isto se dá em razão de alguns fatores como: tamanho dos fragmentos e natureza dos átomos e/ou moléculas presentes no sistema, tipos de propriedades de interesse, etc. Isto significa dizer

que, em regiões mais difíceis de serem estudadas, onde existem átomos não parametrizados, interações incomuns, ou átomos diretamente participantes do estado de transição (ET) de uma reação química, são aplicados métodos computacionalmente custosos, enquanto que o restante da molécula, constituída por átomos parametrizados, onde as interações são relativamente simples, é tratado por métodos computacionalmente baratos, baseados na MM (GOGONEA, 2002; MORALES *et al.*, 2007).

Existem algumas aproximações para se tentar equacionar e resolver problemas referentes aos métodos híbridos, porém, a idéia inicial é a mesma, ou seja, abre-se a Hamiltoniana da equação do sistema na forma como é mostrado nas equações a seguir:

$$H_{princ} = H_{MQ} + H_{MM} + H_{MQMM} \quad (2.14)$$

$$E = \frac{\langle \Psi | H_{princ} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (2.15)$$

$$E = E_{MQ} + E_{MM} + E_{MQMM} \quad (2.16)$$

As interações eletrostáticas entre os elétrons da região MQ e os átomos MM e entre os núcleos MQ e os átomos MM, são incluídas na Hamiltoniana do subsistema MQ, como é mostrado na equação abaixo:

$$H^{MQ/MM} = H_e^{MQ} - \sum_i^n \sum_j^M \frac{e^2 Q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_A^N \sum_J^M \frac{e^2 Z_A Q_J}{e\pi\epsilon_0 R_{AJ}}, \quad (2.17)$$

onde, n e N representam, respectivamente, os números de elétrons e núcleos da região MQ e M é o número de átomos MM carregados. O primeiro termo da equação 2.17 é o Hamiltoniano do sistema MQ isolado. O primeiro somatório duplo representa a interação eletrostática total entre os elétrons MQ e os átomos MM e, a interação eletrostática total dos núcleos MQ com os átomos MM, é dada pelo segundo somatório duplo. As interações entre os átomos MQ e MM são descritas em

nível clássico através dos campos de forças e as ligações químicas que conectam os dois subsistemas são separadas por um átomo de hidrogênio especial que completa a valência da região MQ (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005) e será melhor descrito na aproximação *ONIOM*.

Assim, nesta Tese foi empregada uma aproximação muito utilizada em MQ/MM, conhecida como *ONIOM* (MASERAS & MOROKUMA, 1995; FROESE & MOROKUMA, 1996; WOO *et al.*, 1999; GOGONEA, 2002; THOM *et al.*, 2003). Neste tipo de abordagem o sistema é dividido em camadas e, a energia e os gradientes, são primeiro calculados para a parte quântica isolada em nível semi-empírico desejado. Posteriormente, a energia e os gradientes de todo o sistema, incluindo a parte tratada por MQ, são calculados por MM e, este valor, é somado a energia anteriormente obtida. Finalmente é aplicada a mecânica clássica para calcular a energia da parte quântica isolada, subtraindo-se o valor da energia obtida, da soma anteriormente efetuada (HESS *et al.*, 2008; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). Assim sendo, a expressão para o cálculo da energia total híbrida ou energia total MQ/MM será:

$$E_{tot} = E_I^{MQ} + E_{I+II}^{MM} - E_I^{MM} \quad (2.18)$$

onde I e II indicam, respectivamente, os subsistemas MQ e MM.

Para o método MQ/MM funcionar no GROMACS híbrido, é necessário:

1. A introdução de átomos conexão (AC), do inglês *link atom* (LA).
2. Especificar quais átomos serão tratados quanticamente.
3. Especificar o nível de cálculo e a base que será usada no subsistema quântico.

O AC é o átomo que separa a parte tratada por MM da parte tratada por MQ. É considerado como hidrogênio para a parte quântica e como um átomo postigo (do

inglês *dummy*) para a parte clássica, ou seja, leva este nome porque faz parte do sistema, mas não interage com os outros átomos (carga e massa nulas), exceto com os átomos quânticos. Na parte quântica os átomos AC fecham os orbitais moleculares.

2.2 PROCEDIMENTOS DE SIMULAÇÃO

2.2.1 Modelagem e Dinâmica Molecular Clássica

Tomou-se o modelo da *HuAChE* ligada covalentemente com *GA* e complexada com a *2-PAM*, dentro e fora do sítio ativo (GONÇALVES *et al.*, 2006), com o propósito de se realizar duas simulações por dinâmica molecular. Para isto, foi utilizado o pacote computacional GROMACS 3.3.1 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005) e o campo de forças OPLS/AA (JORGENSEN *et al.*, 1996; KAHN & BRUICE, 2001).

Como no campo de forças OPLS/AA não há parâmetros para a *2-PAM* e o *GA*, foi necessário parametrizá-los, ou seja, prepará-los para serem reconhecidos pelo GROMACS 3.3.1 através de parâmetros referentes a ligações entre átomos, ângulos, diedros, diedros impróprios, terceiros vizinhos, constantes de mola, etc. Houve também a necessidade de unir o arquivo de topologia do *GA* ao arquivo de topologia da enzima, proporcionando o reconhecimento de uma ligação covalente, pelo programa, entre o oxigênio ácido do resíduo do sítio catalítico, Ser203 e o fósforo do *GA*. Além disso, as cargas foram calculadas pelo método CHELPG (BRENEMANN, 1990) com o programa GAMESS US (SCHMIDT *et al.*, 1993), utilizando-se o método Hartree-Fock e a base 6-31G^{**}. O procedimento para criar

arquivos de topologias de moléculas não contidas no campo de forças OPLS/AA, está descrito no **Apêndice A** e o procedimento para o reconhecimento de uma ligação covalente entre um substrato e uma enzima, pelo GROMACS, está reportado na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2006).

Cada um dos dois sistemas foi colocado dentro de uma caixa cúbica contendo 27.856 moléculas de água do tipo TIP4P (NEUMANN, 1986), com condições periódicas de contorno e contra íons, para neutralizar a carga total, totalizando, assim, 119.711 átomos. Foram realizadas algumas etapas necessárias antes da DM, ou seja, minimização de energia pelo método do máximo declive com restrição de posição dos átomos pesados, máximo declive sem restrição, gradientes conjugados sem restrição e minimização de energia pelo método *Quasi-Newton*, levando os sistemas, respectivamente a forças inferiores a $209,2 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, $104,6 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, $41,84 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$ e $41,84 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, respectivamente.

Os complexos otimizados foram submetidos à dinâmica molecular em duas etapas: Inicialmente 500 ps de dinâmica a 310 K com restrição dos átomos pesados da proteína complexada ao *GA* e de todos os átomos da *2-PAM* para acomodação das moléculas de água no sistema. Após este procedimento, foram executadas duas simulações, sem restrição de posição, por dinâmica molecular de 6,5 ns, cada. Uma para o sistema com a *2-PAM* ancorada dentro do sítio ativo e outra para o sistema com a *2-PAM* na entrada do sítio ativo. As dinâmicas foram simuladas à temperatura de 310 K, 1 bar de pressão, tempo de integração de 2 fs, PME (DARDEN *et al.*, 1993; ESSMANN *et al.*, 1995) para interações eletrostáticas, raio de corte igual a 10 Å no espaço real, e raio de corte de 10 Å para interações de curto alcance.

Os procedimentos para gerar os arquivos de entrada e execução da otimização e dinâmica de proteínas utilizando o pacote GROMACS 3.3.1 encontram-se descritos em detalhes no **Apêndice B**.

2.2.2 Aplicação de Métodos Híbridos

2.2.2.1 Teste utilizando MQ/MM

Antes da utilização do método híbrido MQ/MM, houve a necessidade de compilar o pacote computacional GROMACS/MOPAC, seguindo o procedimento descrito pelo pesquisador Gerrit Groenhof do Instituto Max Planck, disponibilizado em seu endereço eletrônico pessoal (<http://wwwuser.gwdg.de/~ggroenh/>) que, apesar de parecer uma tarefa simples, não foi tão fácil criar os executáveis, tendo em vista que foram testadas várias versões diferentes do compilador FORTRAN, como o ifort, o gfortran, o F77, o G77, dentre outras. Assim, o compilador que melhor funcionou foi o F77 para a plataforma 64 bits. Além disso, os valores das integrais do método AM1, referentes aos átomos **H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I**, foram substituídos pelos valores do método RM1, referentes aos mesmos átomos para possibilitar a aplicação de simulações por dinâmica molecular híbridas, utilizando o método semi-empírico RM1 na parte do sistema tratada quanticamente. Os arquivos necessários foram disponibilizados pelo professor Gerd Bruno da Rocha, da Universidade Federal da Paraíba, um dos criadores do método RM1. Isso permitiu o tratamento de um número mais elevado de átomos quânticos com boa acurácia. Os detalhes dessas modificações para o pacote computacional GROMACS 3.3.1 encontram-se descritos no **Apêndice C**.

Após as modificações citadas, a instalação e a compilação do pacote GROMACS/MOPAC, o programa foi testado, utilizando-se o quadro final da dinâmica do sistema *HuAChE/2-PAM/GA*, com a *2-PAM* ancorada dentro do sítio ativo, após a etapa da dinâmica com restrição de posição dos átomos pesados.

Neste teste, por se tratar de uma avaliação do funcionamento do programa, foram escolhidos como átomos quânticos, somente os dezenove átomos da *2-PAM*. A partir daí, foram feitas otimizações de geometria híbridas utilizando-se, respectivamente, os métodos AM1, PM3 e RM1.

Após a escolha do método semi-empírico a ser utilizado na combinação do GROMACS com o MOPAC, foi possível passar para a etapa posterior, em que, mais aminoácidos e, conseqüentemente, mais átomos pudessem ser incluídos como quânticos.

2.2.2.2 Simulação das Etapas de Reação por MQ/MM

Antes das simulações MQ/MM, foi importante conhecer o estado de protonação de alguns aminoácidos da *HuAChE*, como Asp, Glu, His, Cys, Tyr, Lys e Arg. Isso foi feito utilizando-se o servidor PROPKA (LI *et al.*, 2005; BAS *et al.*, 2008) que utiliza parâmetros empíricos para calcular o pK de resíduos em diferentes micro ambientes. Os parâmetros levados em conta na análise são: ligações hidrogênio, interações por carga e efeitos de desidratação de resíduos tituláveis. Assim, o princípio básico de obtenção do pK pelo servidor PROPKA, é feito baseado nas seguintes equações:

$$pKa = pK_{model} + \Delta pKa \quad (2.19)$$

$$\Delta pKa = \Delta pK_{desid} + \Delta pK_{lig.hid} + \Delta pK_{eletrost} \quad (2.20)$$

onde, o pK_{model} é o pK_a dos resíduos em solução e ΔpK_a a soma dos componentes referentes aos efeitos de desidratação, ligações hidrogênio e efeitos eletrostáticos.

Ainda assim, foi também necessário, selecionar e caracterizar os resíduos quânticos. Isto foi feito, abrindo-se o sistema *HuAChE/2-PAM/GA* com o programa PyMOL (DELANO, 2002; DELANO & BROMBERG, 2004). Foram selecionados os aminoácidos da tríade catalítica da *HuAChE* (Ser203, His447 e Glu334), a *2-PAM* e o organofosforado *GA*, além de alguns outros próximos do *GA* e da tríade catalítica, que favorecessem a ocorrência de possíveis reações químicas, como por exemplo, protonações e desprotonações. Dependendo da preferência do usuário os programas MOLDEN 4.1 (SCHAFTENAAR & NOORDIK, 2000), GHEMICAL (HASSINEN & PERÄKYLÄ, 2001) e VMD (HUMPHREY *et al.*, 1996) podem ser utilizados para o mesmo fim.

Foi utilizada a aproximação *ONIOM*, em que a parte clássica é separada da parte quântica pelo átomo conexão (*AC*), que foi colocado entre os carbonos α e β de cada um dos aminoácidos, tratando-se somente as cadeias laterais desses resíduos, o *GA* e a *2-PAM* como a Mecânica Quântica e o restante da proteína, o solvente e os contra-íons com a Mecânica Clássica. Na ilustração a seguir, Fig. 2.1, é mostrada a cadeia lateral de cada resíduo, incluindo os átomos conexão, totalizando 142 átomos quânticos.

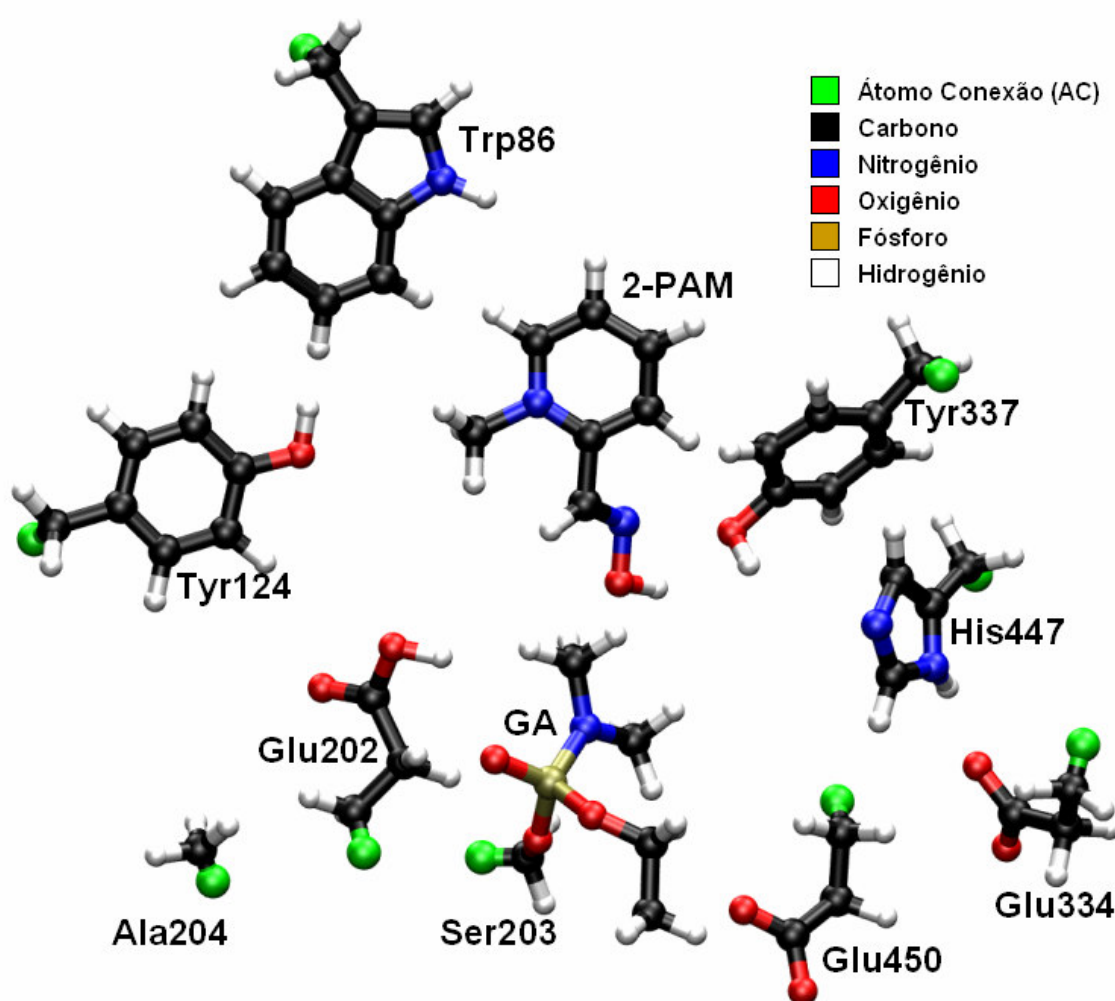


Figura 2.1. Resíduos tratados por Mecânica Quântica com seus respectivos átomos conexão, totalizando 142 átomos quânticos.

A etapa seguinte foi a parametrização dos átomos quânticos, ou seja, o reconhecimento deles pelo pacote computacional híbrido GROMACS-MOPAC. Isso foi feito modificando-se basicamente dois arquivos, o de topologias que possui extensão *top* e o arquivo de protocolos com extensão *mdp*. No **Apêndice D** há um exemplo mostrando onde os arquivos *top* e *mdp*, para o peptídeo His-Ala-Ala-Ser, devem ser modificadas, para que os átomos sejam vistos como quânticos, pelo programa.

Estando o sistema preparado para a execução, tomou-se como condição inicial da simulação híbrida, o quadro da simulação clássica com a *2-PAM* ancorada dentro do sítio ativo, referente ao instante em que a *2-PAM* estivesse mais próxima possível do *GA* e da His447.

As simulações foram feitas em etapas, referentes ao caminho de reação química: quatro de 50 ps sem restrição de distâncias e doze de 5 ps, com restrição de distâncias entre átomos, totalizando 260 ps de simulação por MQ/MM, possibilitando assim a descrição dos caminhos de reação referentes à reativação da enzima. As etapas de execução dos programas do GROMACS híbrido são similares às do GROMACS clássico, já descritas no **Apêndice B**.

Todas as etapas da simulação foram realizadas à temperatura de 310 K, 1 bar de pressão e o tamanho do passo de integração foi a metade do utilizado na simulação clássica, ou seja, 1 fs, de forma que fossem tratadas as vibrações de ligações entre carbono e hidrogênio, imperceptíveis a 2 fs. O restante do protocolo foi o mesmo usado nas simulações clássicas.

2.2.3 Caracterização dos Estados de Transição

Após a dinâmica híbrida, foi necessário caracterizar os estados intermediários de cada etapa da reação como pontos de sela verdadeiros (LEACH, 2001). Esse passo foi feito otimizando-se os possíveis estados de transição (ET), somente das regiões quânticas de cada etapa da reação. Após otimização, calculou-se as frequências no infravermelho, lembrando-se que para caracterização de uma geometria referente ao ET, é necessária a obtenção de uma única frequência negativa no infravermelho, conhecida como frequência imaginária. Para verificar se

havia conexão entre reagentes, estado de transição e produtos de cada etapa do processo, calculou-se a coordenada de reação intrínseca (CRI), do inglês *Intrinsic reaction coordinate* (IRC) (FUKUI, 1981; LEACH, 2001; JENSEN, 2007). Os cálculos de CRI e a caracterização do ET, foram feitos com o programa MOPAC 2007, usando o método RM1 e, para visualizar os resultados, foi utilizado o programa SPARTAN 08 (DEPPMEIER *et al.*, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DINÂMICA MOLECULAR DO COMPLEXO *HuAChE/2-PAM/GA*

3.1.1 Condições Iniciais

Como já descrito em procedimentos de simulação, foram tomadas duas condições de partida, ilustradas na Fig. 3.1, uma com a *2-PAM* na entrada do sítio ativo e outra com a *2-PAM* ancorada no interior do sítio ativo, próxima ao organofosforado *GA*, para as simulações por DM clássicas, como descrito por Gonçalves e colaboradores em um trabalho anterior (GONÇALVES *et al.*, 2006). Após as simulações, puderam ser feitas análises como energia total, desvio da raiz média quadrática e outras.

O motivo de se fazer simulações por dinâmica molecular de sistemas biológicos, como o caso da acetilcolinesterase humana complexada com tabun, dentro de uma caixa com moléculas de água explícitas, contraíons, com acoplamento de temperatura de 310 K e acoplamento de pressão de 1 atm, é simular algo próximo de um meio biológico. Pôde-se monitorar variáveis como energia, desvio de estrutura em relação a estrutura inicial ou média, variação de distâncias atômicas para o estudo de aproximações entre substratos e enzimas, dentre muitas outras análises. Assim, através de ligantes e proteínas cuidadosamente parametrizados, pode-se simular o comportamento destes no ambiente fisiológico, o que foi feito nesta tese.

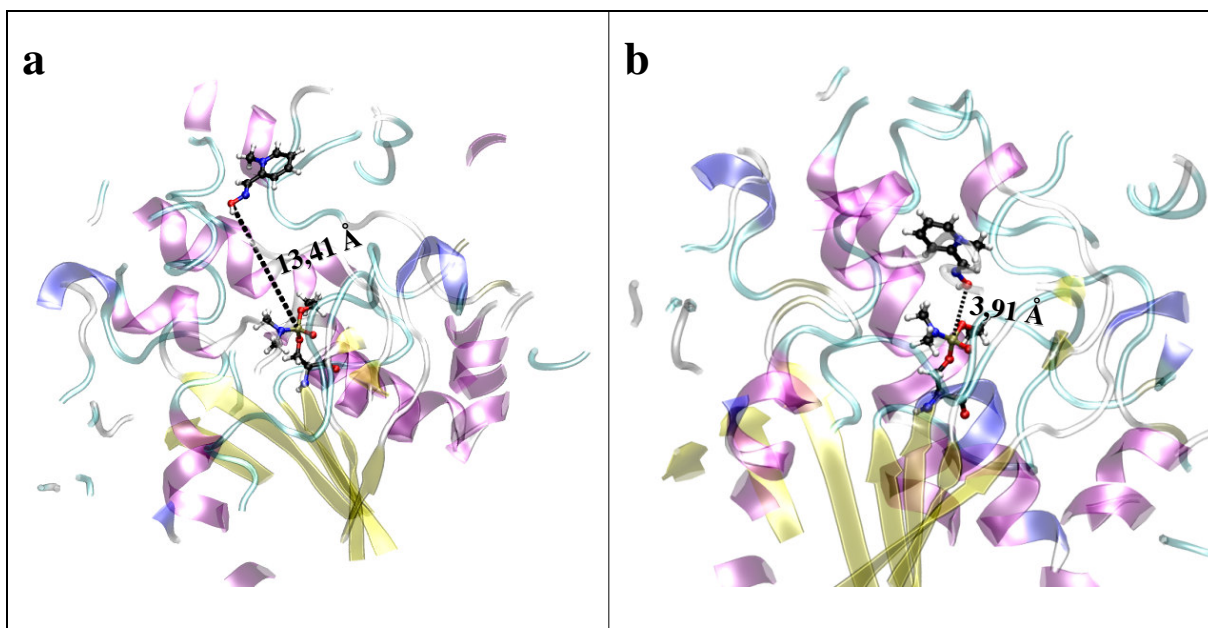


Figura 3.1. Sistema *HuAChE*/2-PAM/GA com (a) a 2-PAM na entrada do sítio ativo e com (b) a 2-PAM dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

3.1.2 Energia Total

Como é mostrado, tanto na Fig. 3.2 como na Fig. 3.3, a energia total dos sistemas tendem a estabilizar-se em torno dos 3000 ps de simulação por DM clássica, sugerindo estabilização estrutural, ao longo dos 3500 ps restantes, totalizando 6500 ps.

Só com resultados referentes à estabilização da energia total ao longo do tempo, numa simulação por DM clássica, não se pode ter certeza se o sistema variou muito ou pouco ao longo do tempo, por isso, além da evolução temporal da energia total, é necessário se fazer outras análises como o caso do desvio estrutural do sistema ao longo do tempo.

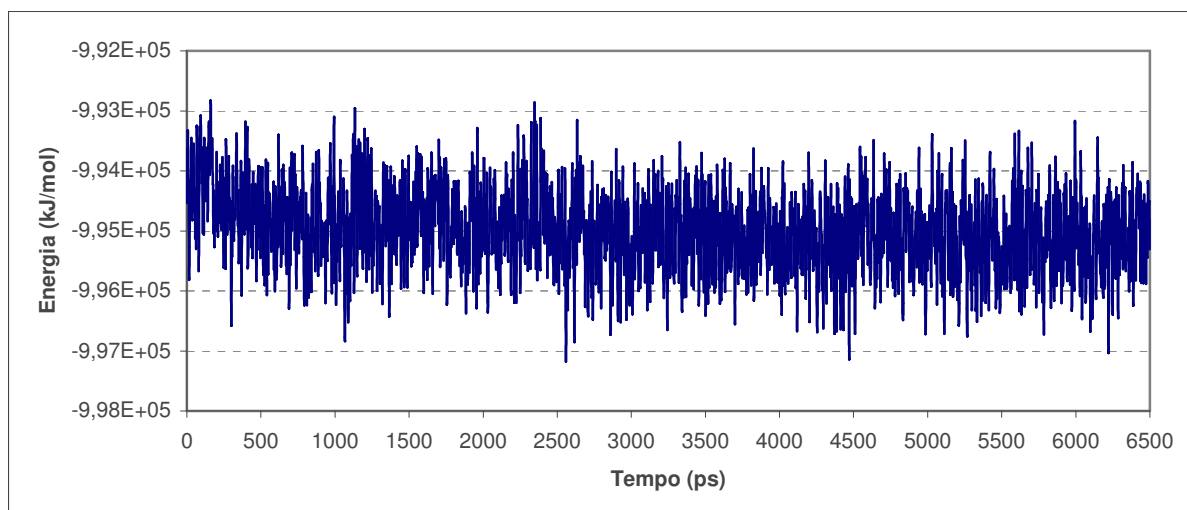


Figura 3.2. Variação da energia total para o sistema *HuAChE/2-PAM/GA* com a *2-PAM* na entrada do sítio ativo da *HuAChE*.

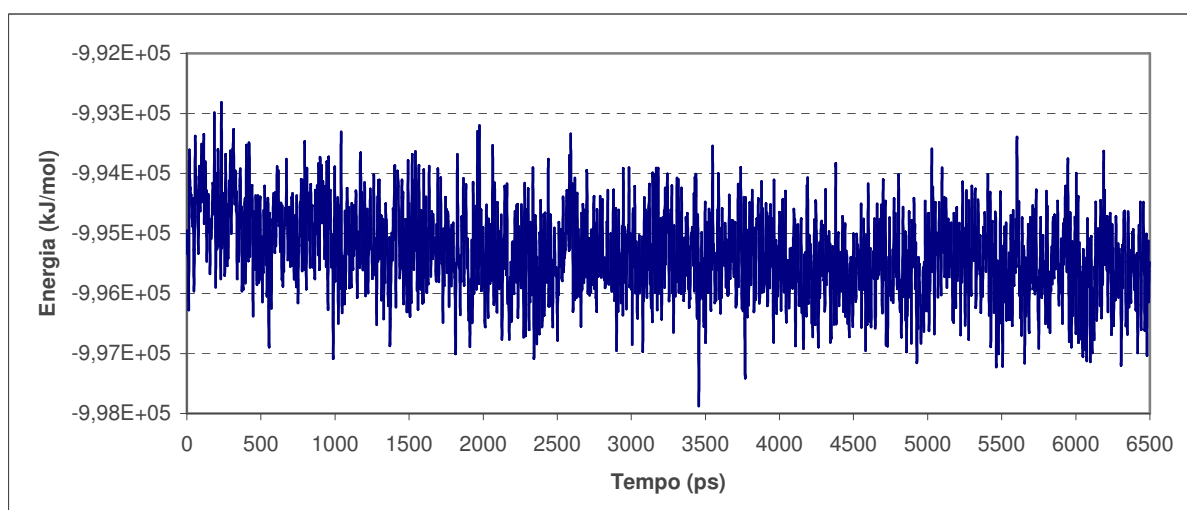


Figura 3.3. Variação da energia total para o sistema *HuAChE/2-PAM/GA* com a *2-PAM* dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

3.1.3 Desvio da Raiz Média Quadrática

Foram feitos cálculos de DRMQ temporal sobre todos os átomos dos complexos para 325 quadros, o posterior sempre em relação ao anterior, um a cada 20 ps, perfazendo assim, um total de 6,5 ns. Isso foi feito, separadamente para dois conjuntos em cada cálculo, um para a *HuAChE/GA* em relação a *HuAChE/GA* e o outro para a *2-PAM* em relação a *2-PAM*. Considerando-se que o complexo poderia

flutuar na caixa, cada quadro foi ajustado pelo método dos mínimos quadrados a seu quadro precedente para efeito de cálculo de desvio padrão. Os resultados podem ser observados na Fig. 3.4 e na Fig. 3.5.

Como se pode observar, para as duas simulações, o DRMQ temporal tende a estabilizar-se logo nos primeiros picossegundos, não passando de 1,1 Å para a proteína em relação à proteína e, não passando de 0,4 Å para a *2-PAM* em relação a *2-PAM*, sugerindo que há uma boa interação entre enzima e o fármaco, ou seja, o fármaco se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos através do cálculo da energia total, descrito anteriormente. O aumento seguido de rápida estabilização do DMRQ nos primeiros picos ou nanossegundos, na dinâmica molecular de sistemas envolvendo biomacromoléculas, está geralmente relacionados a mudanças de ambientes. As estruturas cristalográficas estão sujeitas ao ambiente cristalino, fazendo contatos devido ao empacotamento, com baixa hidratação, baixa temperatura, pH diferente do fisiológico, com a presença as vezes de co-cristalizadores, etc. Quando estas macromoléculas, ou modelos obtidos a partir destas, são submetidas à uma caixa de simulação com hidratação muito maior, pH, força iônica e temperatura fisiológicos, observa-se uma rápida relaxação nesse novo ambiente, registrada pela variação inicial do DRMQ. Para se obter estruturas por Ressonância Magnética Nuclear, apesar da alta hidratação do ambiente experimental, geralmente se reduz o pH e a temperatura para diminuir o número de diferentes populações conformacionais, o que leva também à relaxações quando no ambiente da simulação, mimetizando o fisiológico.

Com a análise do DMRQ, se pode ter noção da variação estrutural ao longo do tempo porém, como se trata de uma medida do quadro no tempo posterior em

relação ao quadro anterior, é necessário ainda uma medida que torne possível a observação da variação de cada resíduo do sistema, de forma que se possa observar, por exemplo, se houve uma maior ou menor variação da periferia da enzima, em relação ao sítio ativo. Com isso, é de grande importância, o cálculo da flutuação do desvio da raiz média quadrática (FDRMQ).

Adicionalmente, **Apêndice E.1**, foram feitas análises do DRMQ no sistema *HuAChE/GA* em relação ao primeiro quadro do sistema *HuAChE/GA*, nas duas simulações, para verificar de forma mais precisa depois de quanto tempo a acetilcolinesterase inibida pelo GA tenderia a estabilização. Resultados mostraram que o desvio tende a parar de subir entre os 2000 ps e 6500 ps, não chegando aos 2,4 Å.

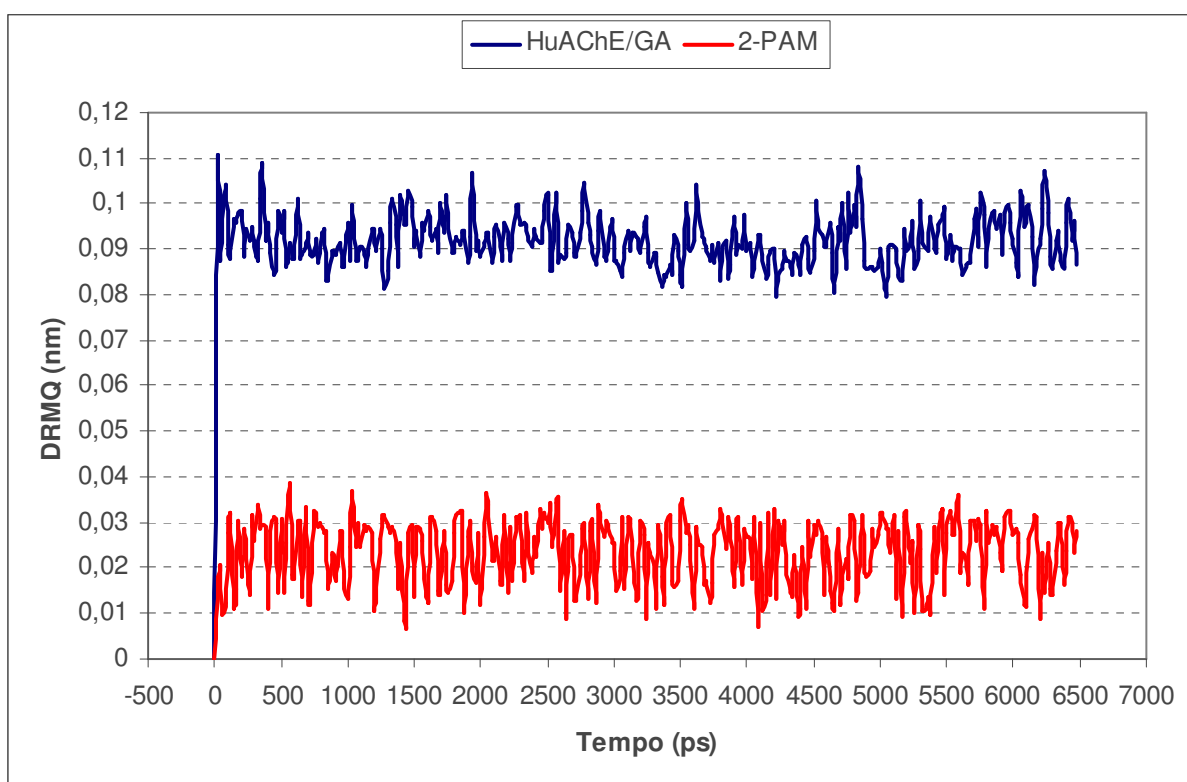


Figura 3.4. DRMQ temporal para o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* com a *2-PAM* na entrada do sítio ativo da *HuAChE*.

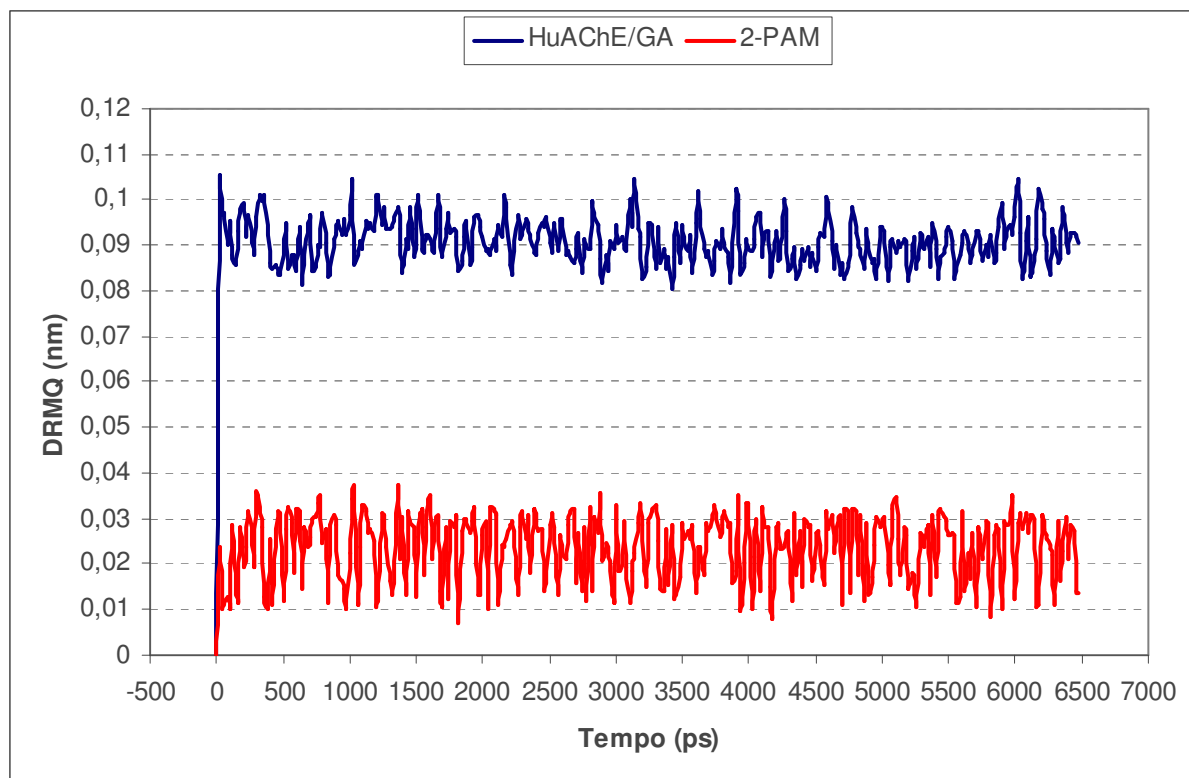


Figura 3.5. DRMQ temporal para o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* com a *2-PAM* dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

Para confirmar a estabilização estrutural no ambiente da simulação, foram calculadas as FDRMQ bidimensional (2D) e tridimensional (3D), em relação à posição média, sobre cada resíduo de aminoácido da *HuAChE*. O FDRMQ 2D foi calculado no intervalo de tempo de 3000 a 6500 ps (intervalo onde ocorre a estabilização energética), de 20 em 20 ps (175 quadros) e, o cálculo do FDRMQ 3D, foi feito no mesmo intervalo de tempo, extraíndo-se também 175 quadros, de 20 em 20 ps.

Para cada FDRMQ 2D, em conjunto tem-se uma FDRMQ 3D, a fim de ter-se uma visão qualitativa e quantitativa de todas as regiões ao longo das dinâmicas. Maiores valores da FDRMQ e maiores espessamentos dos tubos nas imagens indicam os resíduos que sofreram maiores variações. É comum notar que a FDRMQ para os resíduos da região do sítio ativo e, das regiões de alfa hélices e folhas beta, com valores mais baixos, revelam regiões mais estáveis. Poucos são os picos que

excedem os 0,2 nm e mais raros ainda os que ultrapassam os 0,3 nm. Os picos que têm variações maiores são justamente pertencentes às regiões dos resíduos 259-264 e 493-494, alças já modeladas e descritas na literatura por Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES *et al.*, 2006), ou então a qualquer outra alça localizada na periferia da enzima, além das regiões terminais da enzima. Veja Fig. 3.6, Fig. 3.7 e Fig. 3.8. Assim, juntando informações obtidas pelo cálculo da variação da energia total, com resultados obtidos por DRMQ e FDRMQ, pode-se afirmar que o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* ficou estável durante os 3500 ps finais nas duas simulações, ou seja, estas três análises se complementam.

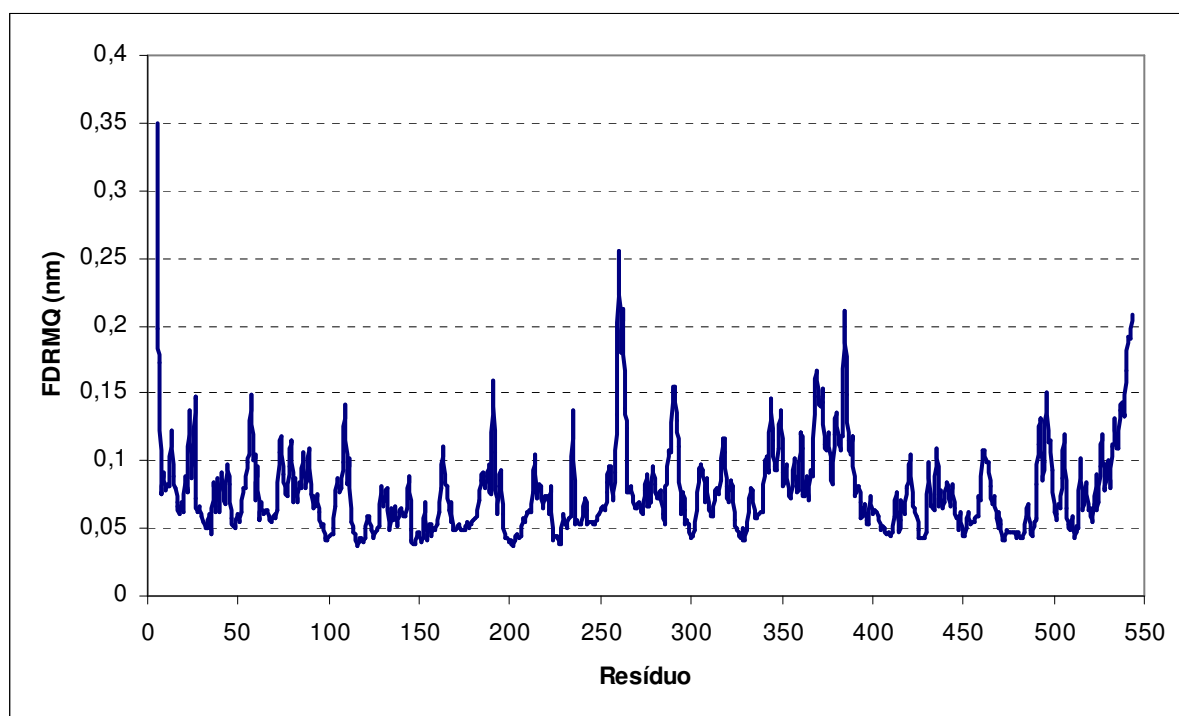


Figura 3.6. FDRMQ 2D para o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* com a 2-PAM na entrada do sítio ativo da *HuAChE*.

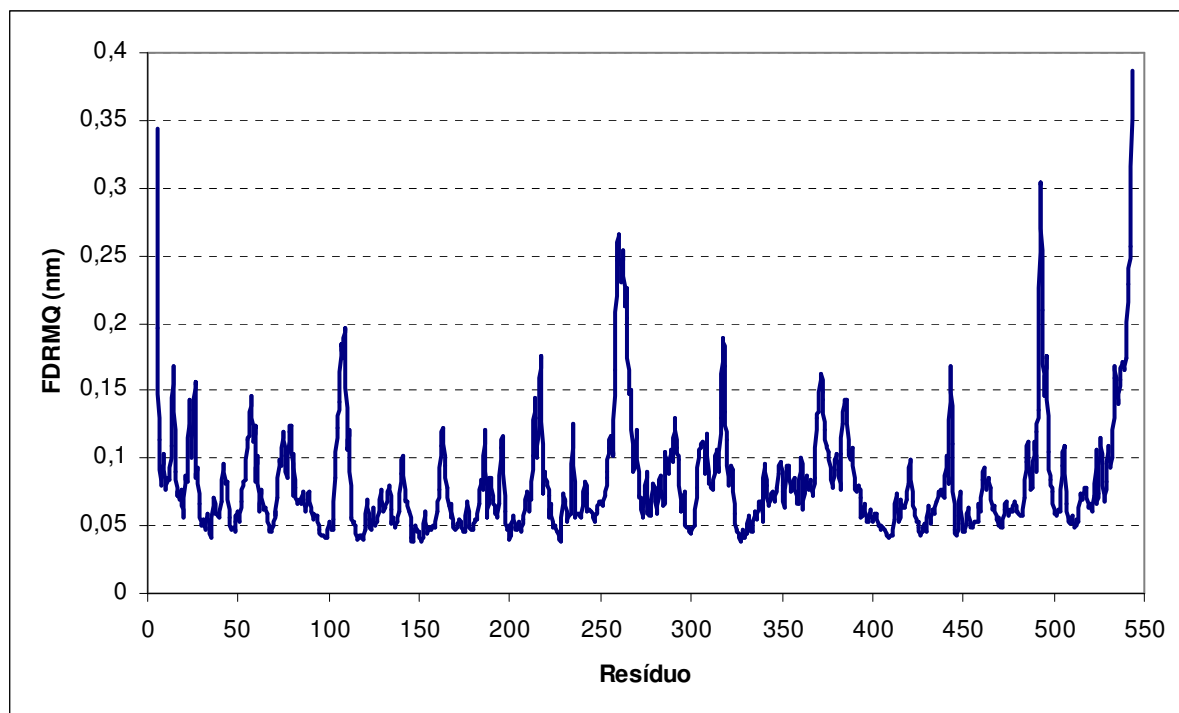


Figura 3.7. FDRMQ 2D para o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* com a 2-PAM dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

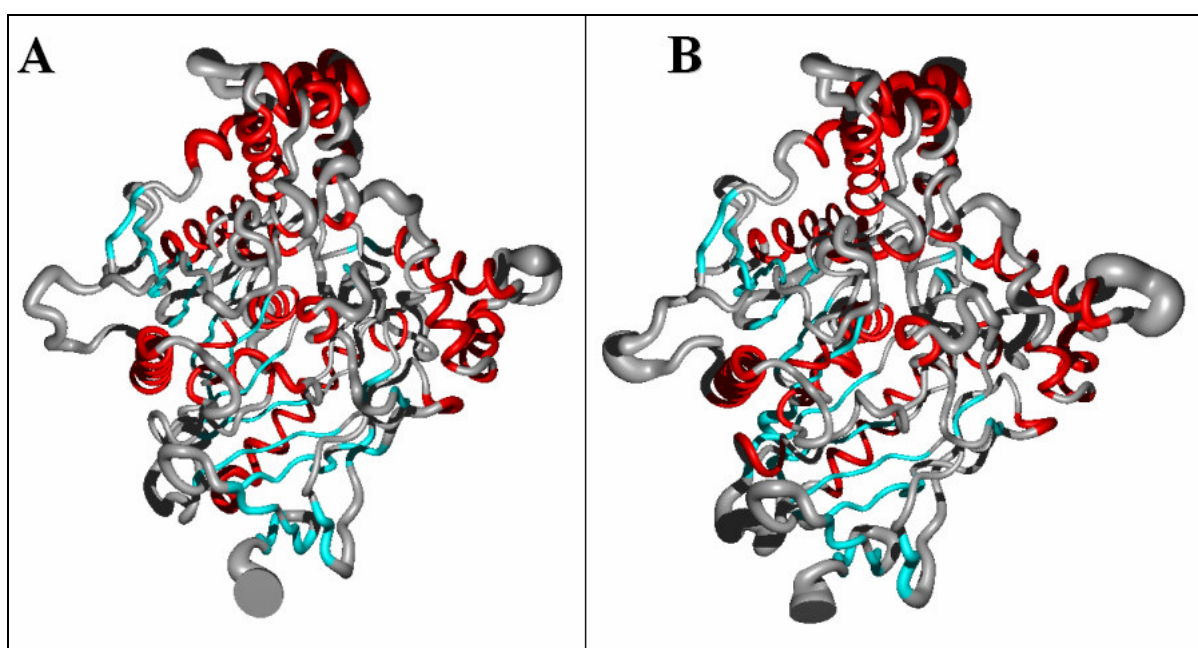


Figura 3.8. FDRMQ 3D para o sistema *HuAChE/GA/2-PAM* com **(A)** a 2-PAM na entrada do sítio ativo e com **(B)** a 2-PAM dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

É importante comentar que a estabilização observada na escala de nanossegundos é importante para os cálculos de MQ/MM, que são realizados a partir de configurações escolhidas dentro desse intervalo. No caso, as dinâmicas envolvendo MQ/MM são da ordem de dezenas de picossegundos, tempo suficiente para monitorar as transferências de cargas envolvidas em cada passo das reações químicas. Por outro lado, há movimentos em macromoléculas biológicas que são observados em escalas de centenas de nanossegundos, microssegundos, ou mais. Esses movimentos podem ser filtrados em simulações de dinâmica de longa duração, pela técnica de Análise de Componentes Principais ou podem ser estimados a partir de cálculos de Modos Normais de Vibração de baixa frequência. A estabilização aqui observada na escala de nanossegundos reflete, portanto, somente a escala de tempo empregada, mas é suficiente para os objetivos do presente trabalho.

Após os cálculos da FDRMQ 2D e 3D, decidiu-se fazer análises das possíveis interações do fármaco (*2-PAM*) com os aminoácidos do sítio ativo da *HuAChE* e com o organofosforado *GA*. Sendo assim, a primeira análise feita foi da distância entre os centros de massa do *GA* e da *2-PAM*.

3.1.4 Distância entre os Centros de Massa do *GA* e da *2-PAM*

Tendo em vista que para haver reativação da enzima a principal interação que deve ocorrer entre as oximas e a acetilcolinesterase inibida por organofosforados neurotóxicos é entre o oxigênio das oximas e o fósforo dos organofosforados, decidiu-se primeiramente, calcular as distâncias entre os centros de massa do inibidor e do fármaco, para cada um dos dois complexos (um com a *2-PAM* na

entrada do sítio ativo e outro com a *2-PAM* dentro do sítio ativo). Resultados desta análise são mostrados na Fig. 3.9.

Resultados mostram que a simulação referente a *2-PAM* ancorada no interior do sítio ativo da *HuAChE*, em azul, permanece próxima a região de atracamento molecular durante todo o tempo, mostrando que foi tomada uma boa condição de partida sugerida por Castro e colaboradores (CASTRO, 2002), ou seja, a Dinâmica Molecular é uma ferramenta capaz de mostrar se a ancoragem molecular foi boa ou ruim e se um substrato atracado, por exemplo, no interior do sítio ativo de uma enzima qualquer, permanece naquela posição ao longo do tempo. Quando acoplada às técnicas de Ancoragem Molecular, a Dinâmica Molecular é uma importante ferramenta para o refinamento da estrutura de complexos. Já com a *2-PAM* posicionada na entrada do sítio ativo da *HuAChE*, em vermelho na Fig. 3.9, o fármaco entrou no sítio ativo da enzima, ficando próximo a região de uma possível reação de reativação da *HuAChE* inibida pelo *GA*, corroborando resultados anteriores (GONÇALVES *et al.*, 2006), onde é mostrado que a carga positiva da oxima, é fundamental para a entrada e permanência desta no interior do sítio ativo.

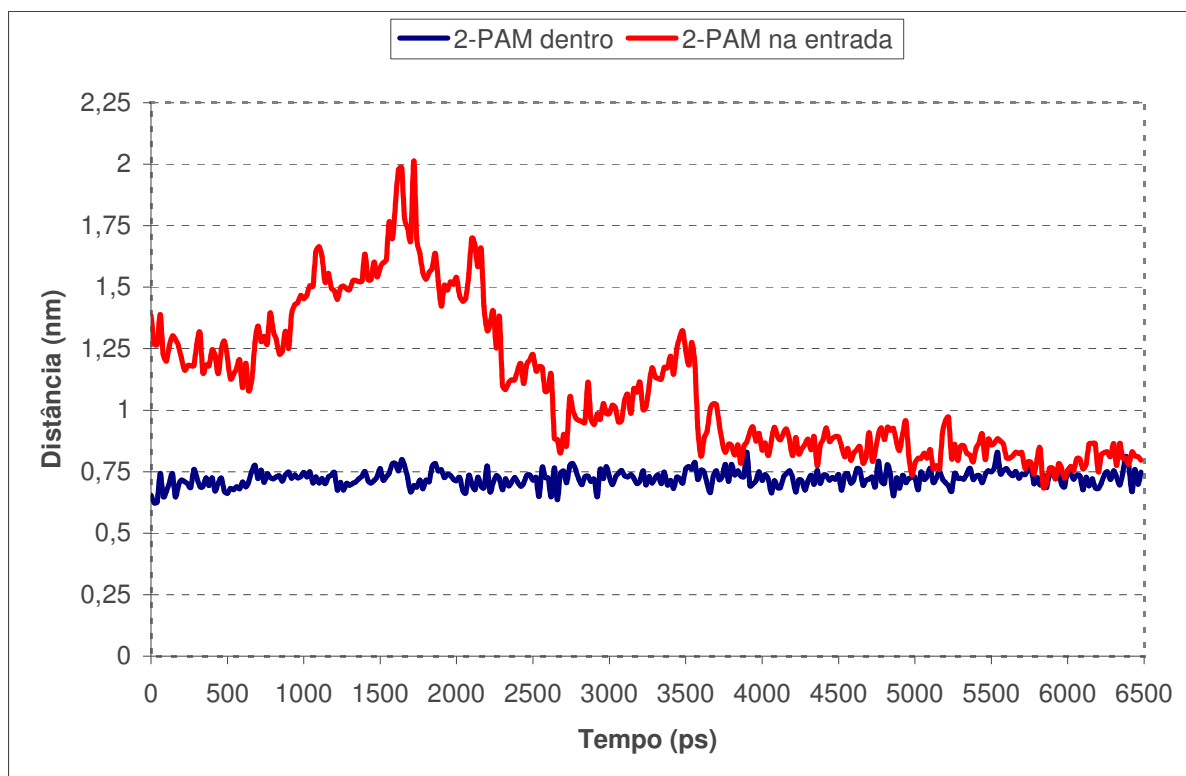


Figura 3.9. Distâncias entre os centros de massa da *2-PAM* e do *GA*.

3.1.5 Distância entre o Oxigênio ácido da *2-PAM* e o Fósforo do *GA*

Como o principal interesse desta tese é investigar as principais interações entre a *2-PAM* e o sítio ativo da enzima, para posterior proposta de mecanismos de reação química e como o tempo de 6500 ps para a simulação com a *2-PAM* ancorada inicialmente na entrada do sítio ativo, não foi suficiente para uma efetiva estabilização do fármaco, Fig. 3.9, deste ponto em diante, as análises foram feitas utilizando-se a trajetória referente a simulação em que a condição de partida foi com a *2-PAM* ancorada no interior do sítio ativo da *HuAChE*.

A análise feita agora foi referente à distância entre o oxigênio ácido da *2-PAM* e o fósforo do *GA*. Resultados mostraram que a partir dos 3 ns de simulação, a distância oscilou, em média, entre 4 e 5 Å, mostrando que a *2-PAM* interage bem com o *GA* e possivelmente com outros resíduos do interior do sítio ativo.

É importante discutir que a escala de tempo necessária para um determinado fármaco, partindo do exterior da enzima até chegar ao interior do sítio ativo e se estabilizar é, sem dúvida, muito maior do que o tempo de estabilização do fármaco, quando este já se encontra ancorado, dentro do sítio ativo.

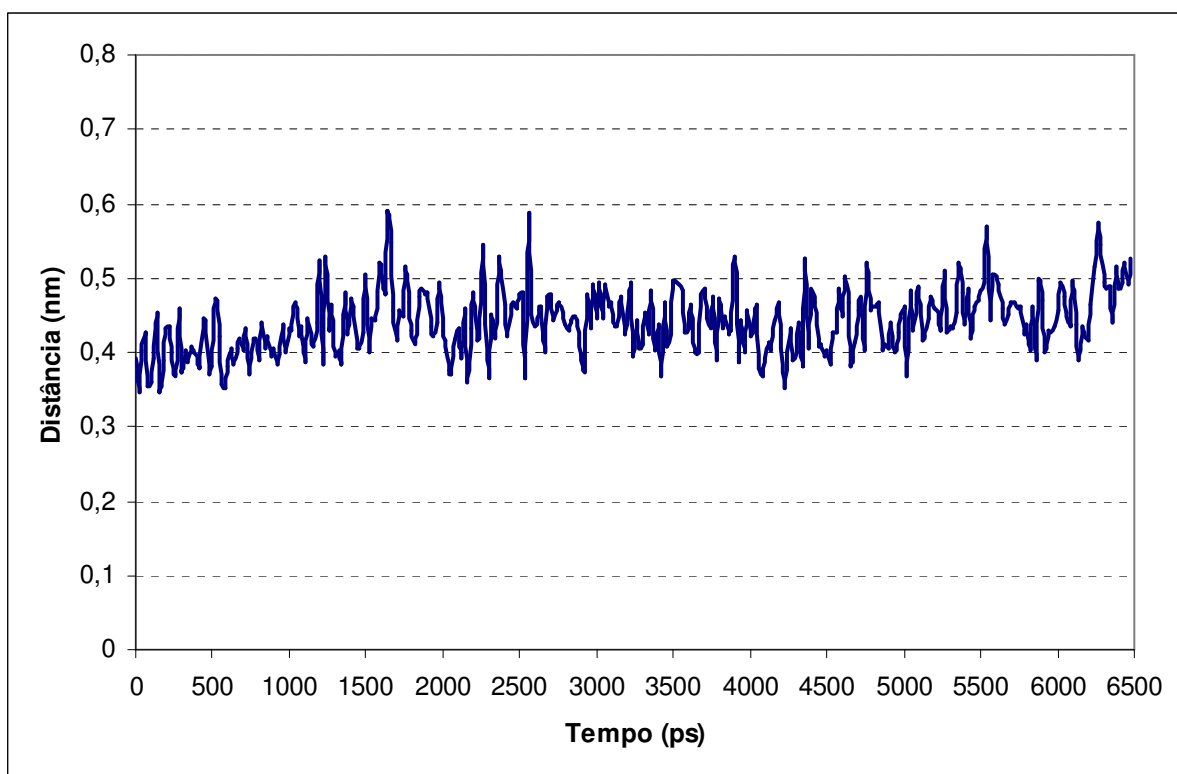


Figura 3.10. Distância entre o oxigênio da *2-PAM* e o fósforo do *GA*.

3.1.6 Interações entre a *2-PAM* e Resíduos do Sítio Ativo Próximos à *2-PAM*

Para verificar quais resíduos poderiam estar interagindo com a *2-PAM*, pegou-se o quadro referente aos 3 ns, onde começou a estabilização e, fez-se uma seleção dos aminoácidos que estavam até 5 Å de raio de cada átomo da oxima. Destes, foram separados aqueles que poderiam estar contribuindo para estabilização da *2-PAM* por algum tipo de interação, como eletrostática, causada

pelo efeito hidrofóbico ou através de ligações hidrogênio. Como é mostrado na Fig. 3.11, os mais próximos foram: Ser203, GA, His447, Tyr337, Tyr124 e Trp86.

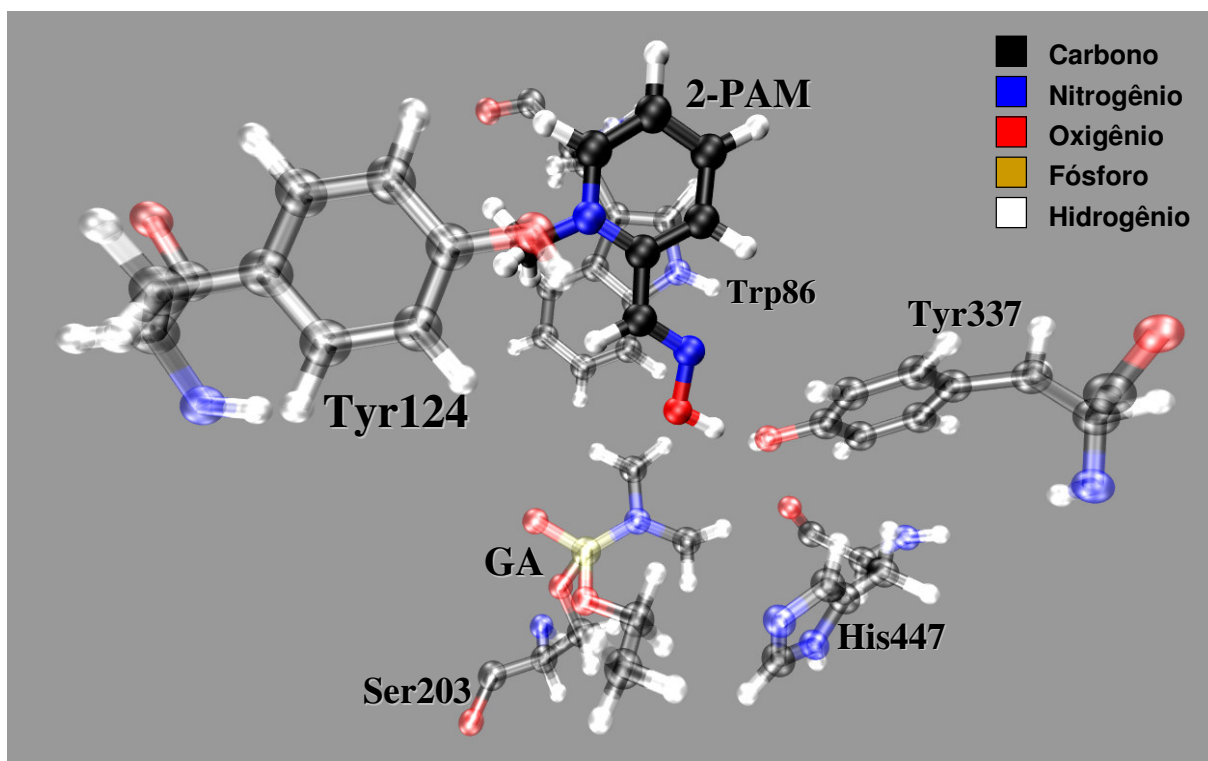


Figura 3.11. Instante 3 ns da simulação por DM do complexo *HuAChE*/GA/2-PAM, com a oxima dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

Como a 2-PAM está entre a Tyr124 e o Trp86, foi medida a distância entre alguns átomos, Fig. 3.12, para verificar se a 2-PAM permaneceu nesta posição e quais as prováveis interações que poderiam estar havendo entre a oxima e estes dois aminoácidos.

Como é mostrada na Fig. 3.12, a estabilização da distância, em torno dos $(3,7 \pm 0,3)$ Å, entre o oxigênio (**a₃**) da Tyr124 e o nitrogênio positivo (**a₄**) da 2-PAM, sugere que a Tyr124 esteja interagindo eletrostaticamente com a 2-PAM durante os 3,5 ns finais de simulação e, que a estabilização da distância entre o carbono (**a₁**) do anel aromático da 2-PAM e o carbono (**a₂**) aromático do Trp86, por volta dos $(3,6 \pm 0,3)$ Å, sugere interação causada pelo efeito hidrofóbico entre ambos anéis, o que explica a permanência do fármaco próximo ao complexo Ser203-GA.

É importante relatar que, em Dinâmica Molecular, ainda não são tratados os efeitos de polarização. Por isso não se pode dizer em interações do tipo empilhamento π , quando são estudadas interações entre anéis aromáticos e sim, contatos causados pelo efeito hidrofóbico. Já com a mecânica quântica pode-se descrever melhor interações deste tipo.

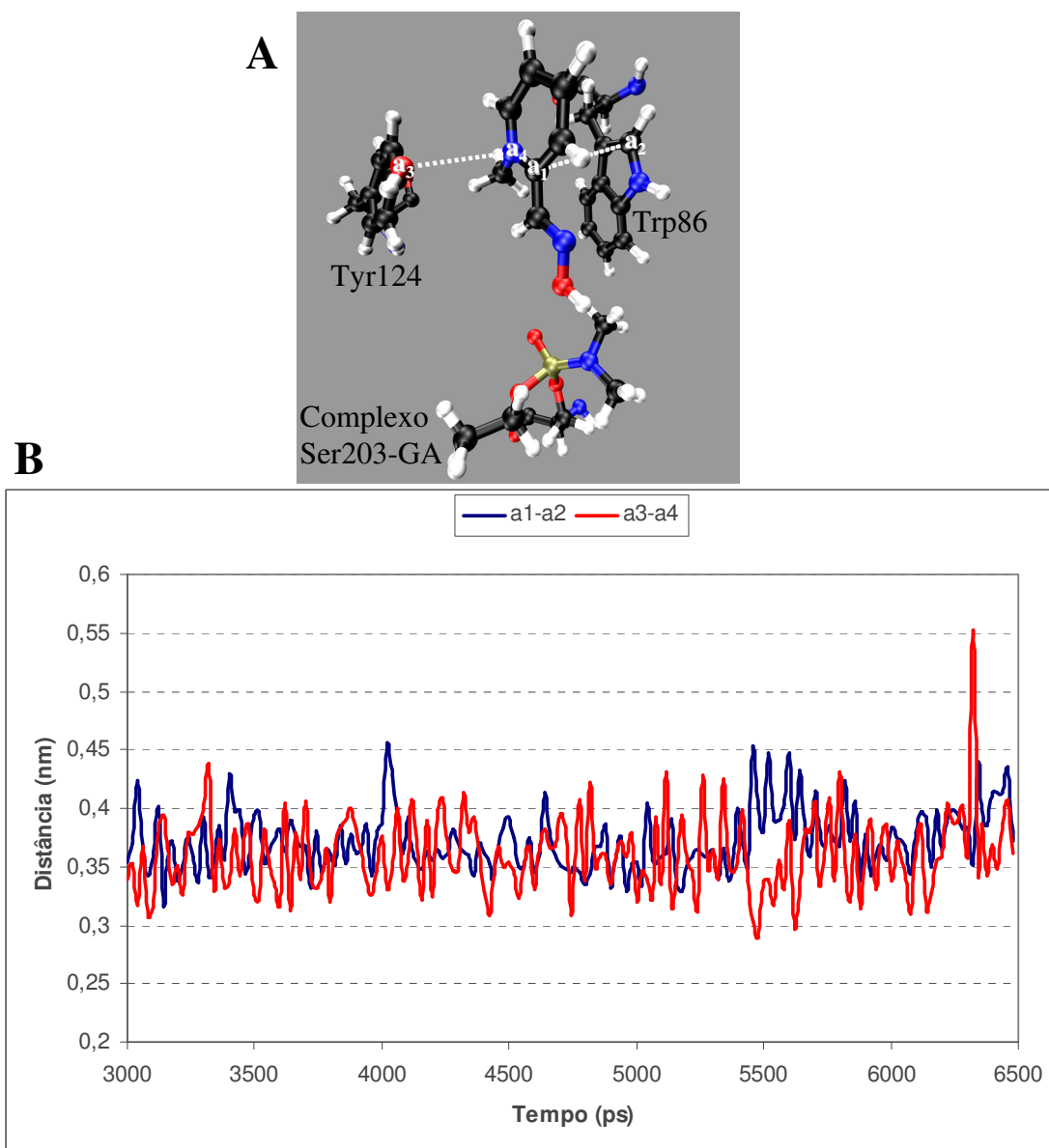


Figura 3.12. (A) Destaque da 2-PAM entre a Tyr124 e o Trp86 mais o complexo Ser203-GA. (B) Distâncias entre átomos da Tyr124, 2-PAM e do Trp86.

Duas outras distâncias monitoradas nesta simulação foram entre o hidrogênio ácido (a_1) da 2-PAM e o nitrogênio (a_3) da His447 e, entre o mesmo hidrogênio (a_1)

da *2-PAM* e o oxigênio (**a₂**) da Tyr337, Fig. 3.13. Resultados mostram que tanto a distância **a1-a3** como a distância **a1-a2** permanecem, respectivamente, em torno de $(4,8 \pm 0,4)$ Å e $(1,9 \pm 0,2)$ Å, mostrando que a *2-PAM* permaneceu estável dentro do sítio ativo da *HuAChE*.

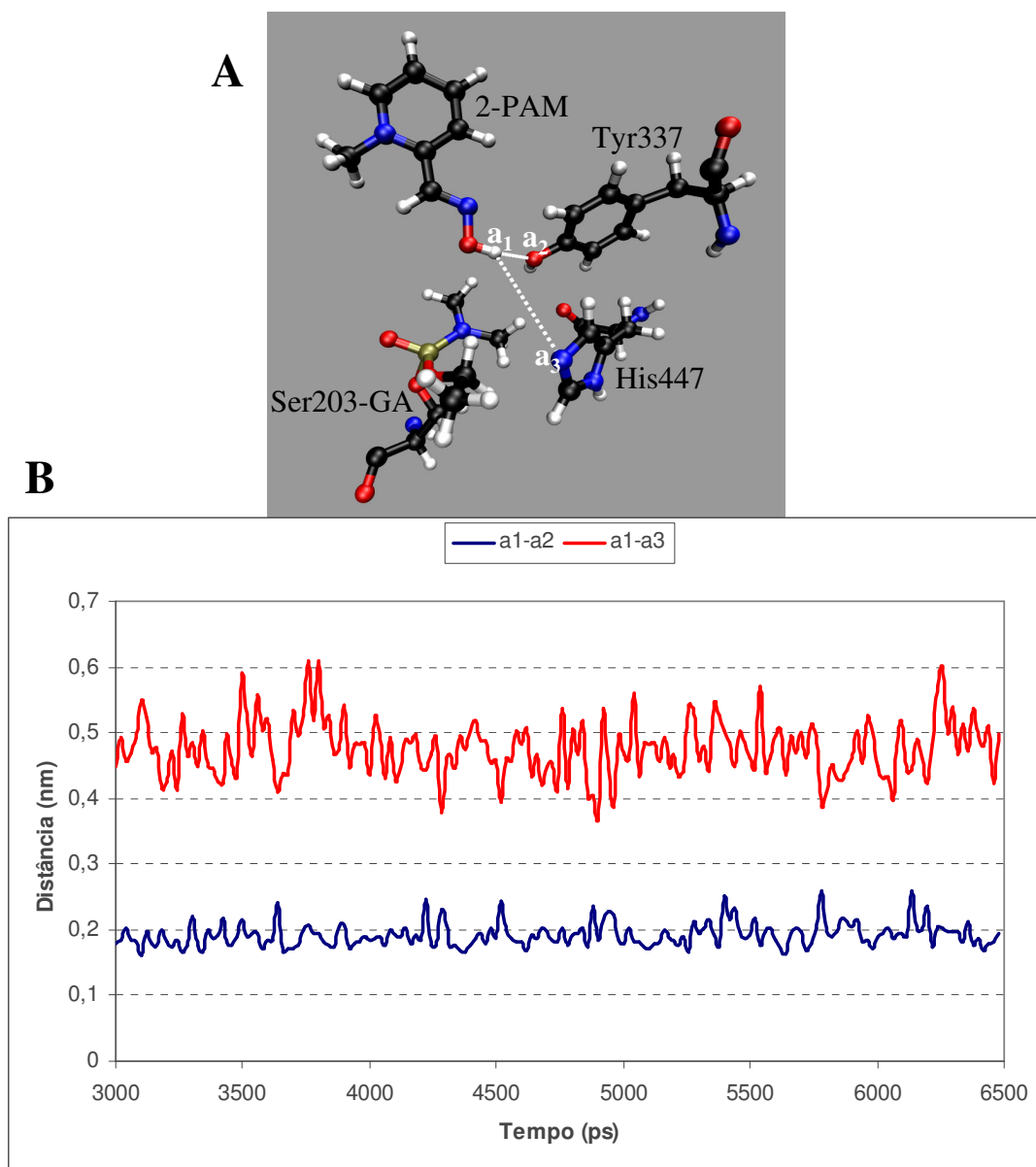


Figura 3.13. (A) Destaque da *2-PAM*, Tyr124, a His447 e o complexo Ser203-GA. (B) Distâncias entre átomos da *2-PAM*, Tyr337 e da His447.

Como o hidrogênio **a1** da *2-PAM* permaneceu próximo o suficiente do oxigênio **a2** da Tyr337, para ocorrer mais uma possível interação intermolecular, Fig. 3.13, o número médio de ligações hidrogênio formadas entre a *2-PAM* e a

Tyr337, foi também calculado. Como é mostrado na Fig. 3.14, houve a formação de até duas ligações hidrogênio entre a pralidoxima e a tirosina, durante os 3500 ps restantes de simulação, sugerindo mais um motivo para a estabilização da oxima dentro do sítio ativo da enzima.

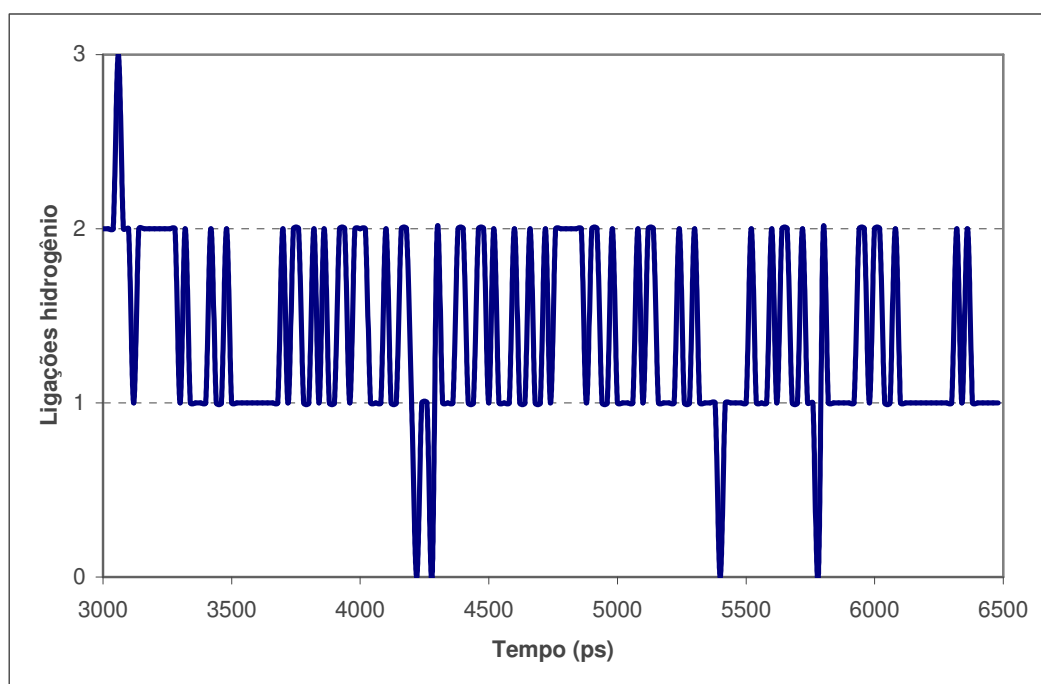


Figura 3.14. Numero de ligações hidrogênio formadas entre a 2-PAM e a Tyr337.

Com a junção de informações obtidas por medidas de distâncias, tipos de interações, ligações hidrogênio formadas entre um ligante e aminoácidos de uma enzima ou proteína, com Dinâmica Molecular é possível se fazer a descrição completa de como um substrato esteja interagindo com uma enzima porém, a DM clássica não pode ser aplicada ao estudo de quebra e formação de ligações químicas, pois os átomos são considerados como esferas e as ligações são consideradas como molas, descritas por potenciais harmônicos que vão ao infinito, impossíveis de serem quebradas. No entanto, com o uso da Mecânica Quântica ou, melhor, Dinâmica Molecular Híbrida por MQ/MM, isto é possível, pois, na parte quântica as ligações químicas são tratadas pela sobreposição de funções de onda

eletrônicas, que se torna desprezível a longas distâncias, possibilitando descrever o rompimento das ligações.

3.2 DINÂMICA MOLECULAR HÍBRIDA

3.2.1 Testando MQ/MM com o GROMACS/MOPAC

Como descrito no item 2.2.2.1, Procedimentos de Simulação, foram executadas minimizações de energia do sistema, com a *2-PAM* tratada quanticamente e o restante classicamente, onde três métodos semi-empíricos foram usados e comparados, AM1, PM3 e RM1. É importante relatar que não é interessante a energia total do sistema, já que se tem uma quantidade muito pequena de resíduos quânticos, em comparação com o número total de átomos do sistema, ou seja, uma razão de 142/119772. Assim, a energia quântica seria mascarada. Por esta razão a energia calculada foi a energia interna de interação entre os átomos quânticos e o restante do sistema, ou seja, interação quântico-quântico, que somada à interação quântico-clássico, deste ponto em diante, será chamada de energia MQ/MM. São desconsideradas as interações clássico-clássico. Além disso, esse tipo de abordagem já vem sendo bem descrito e aplicado em trabalhos do pesquisador Gerrit Groenhof e colaboradores (BOGGIO-PASQUA *et al.*, 2009; GROENHOF *et al.*, 2008; DONNINI *et al.*, 2006).

Como se pode observar na Fig. 3.15, com o método híbrido usando RM1 para a parte quântica, a energia MQ/MM se estabiliza logo nos primeiros passos de simulação, enquanto com o método PM3, apesar da energia se estabilizar antes do passo de número 100, há oscilações no início e, usando o método AM1, há

oscilações durante quase todos os 1000 passos de minimização. Assim, o método escolhido para simular a reativação da *HuAChE/GA* foi o RM1, que ainda apresentou a menor energia.

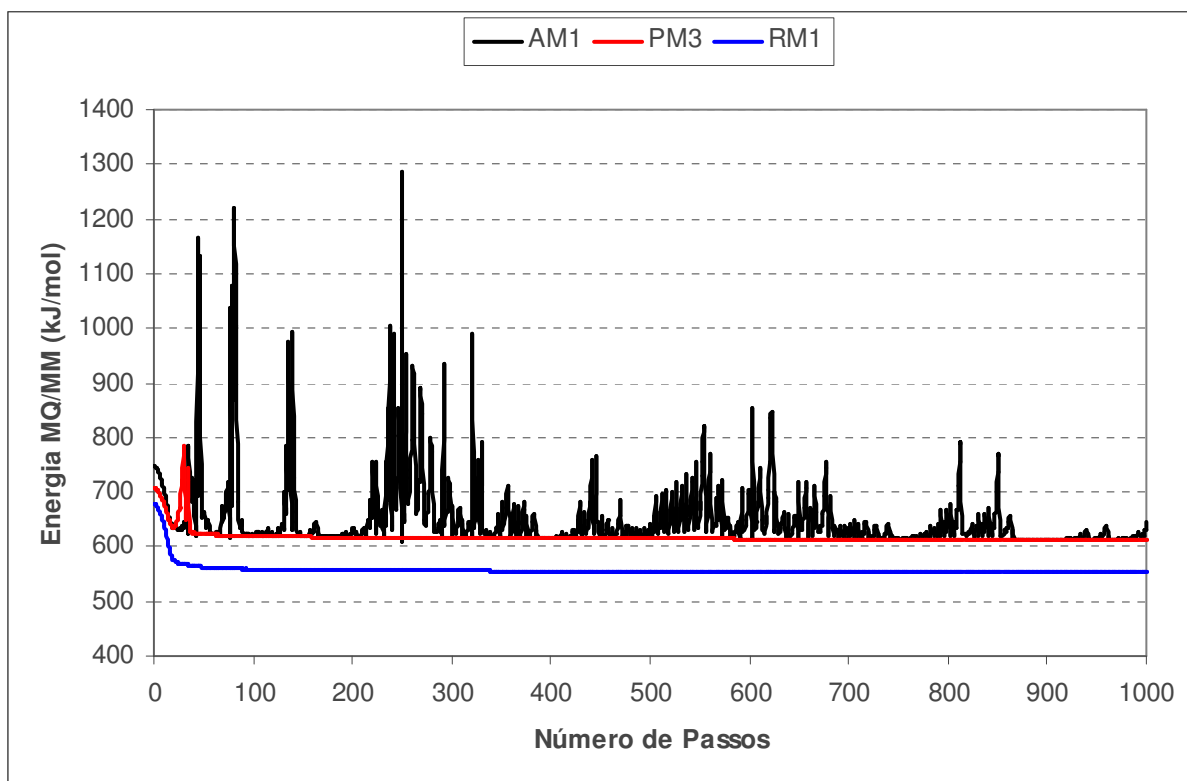


Figura 3.15. Minimização por MQ/MM usando diferentes métodos semi-empíricos.

O método AM1 foi um dos primeiros a serem criados. Assim, espera-se que a variação de energia para uma determinada otimização de geometria se estabilize lentamente, requerendo um número maior de passos, quando acoplado a MM. Já no método PM3, correções foram feitas e, é possível tratar alguns elementos de transição da tabela periódica, porém, ele não é muito bom para o cálculo do calor de formação que já é melhor descrito com o uso do método RM1.

3.2.2 Etapas de Reação por MQ/MM

Anteriormente às simulações híbridas, foi necessário primeiro se conhecer o estado de protonação de resíduos da tríade catalítica e de outros aminoácidos próximos a *2-PAM*, em pH 7,4, para facilitar a proposta de mecanismos de reação e a análise da viabilidade. Assim os pKas dos principais resíduos foram calculados e são apresentados na Tab. 3.1. Os resultados mostram que, em pH 7,4, a cadeia lateral do Glu202 deve estar protonada, apesar de seu pKa ser de 4,25 quando o aminoácido está isolado, assim como a cadeia lateral da His447 deve estar preferencialmente em sua forma básica, apesar de ser anfótera. Quanto ao pKa da pralidoxima e algumas outras oximas, em pH fisiológico, já foi estimado e descrito na literatura. Para a *2-PAM*, seu valor é 7,68 (GRAY, 1984). Assim, a oxima estudada neste trabalho, poderia tranquilamente doar um próton para a His447 por ser ácida em relação a histidina.

Tabela 3.1. Estado de protonação de alguns aminoácidos da *HuAChE* em pH 7,4

Aminoácido	pKa
Glu202	10,42
Glu334	3,89
Glu450	7,42
His447	4,14
Tyr124	13,32
Tyr337	15,09

3.2.2.1 Etapa 1

Foram tomadas como coordenadas iniciais, para as simulações híbridas, o quadro referente ao instante 5500 ps da simulação clássica, com a *2-PAM* posicionada em uma região que pudesse favorecer reações químicas por MQ/MM, como é mostrado na Fig. 3.16. Deste ponto em diante, os átomos **b₁**, **b₂**, **b₃**, **b₄**, **b₅**,

b₆, **b₇**, **b₈** e **b₉** serão sempre os mesmos, por exemplo, os átomos **b₁** e **b₂** representarão, respectivamente, o oxigênio e o hidrogênio ácido da 2-PAM.

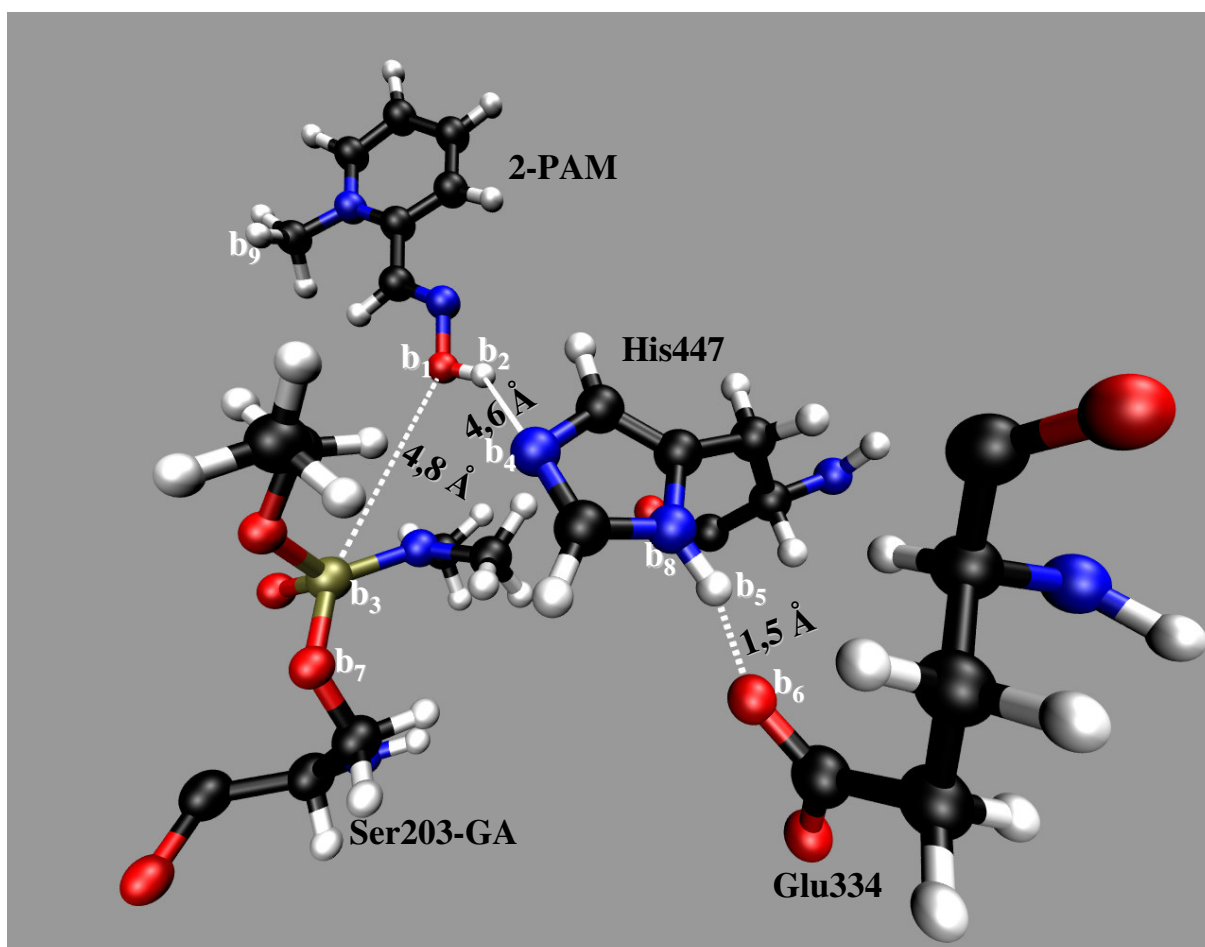


Figura 3.16. Instante 5500ps da simulação clássica, com a 2-PAM ancorada no interior do sítio ativo da *HuAChE/GA*.

Assim, foi executada uma simulação por dinâmica molecular MQ/MM de 50 ps e, logo nos primeiros picossegundos, houve, espontaneamente, protonação do oxigênio **b₆** do Glu334 pelo hidrogênio **b₅** da His447, ocorrendo uma primeira etapa de reação. Na Fig. 3.17, são mostradas as variações das distâncias **b₈-b₅** (em vermelho), mostrando o rompimento da ligação N-H da His447 (partindo de aproximadamente 1,0 Å e estabilizando-se em torno de 1,5 Å), **b₆-b₅** (em azul), onde há a formação da ligação O-H no Glu334 (partindo de 1,5 Å e estabilizando-se em torno de 1,0 Å) e **b₁-b₃** (em preto), representando a variação da distância entre o

oxigênio da *2-PAM* e o fósforo do *GA*, estabilizando-se entre 4,0 e 4,5 Å, ao longo da simulação.

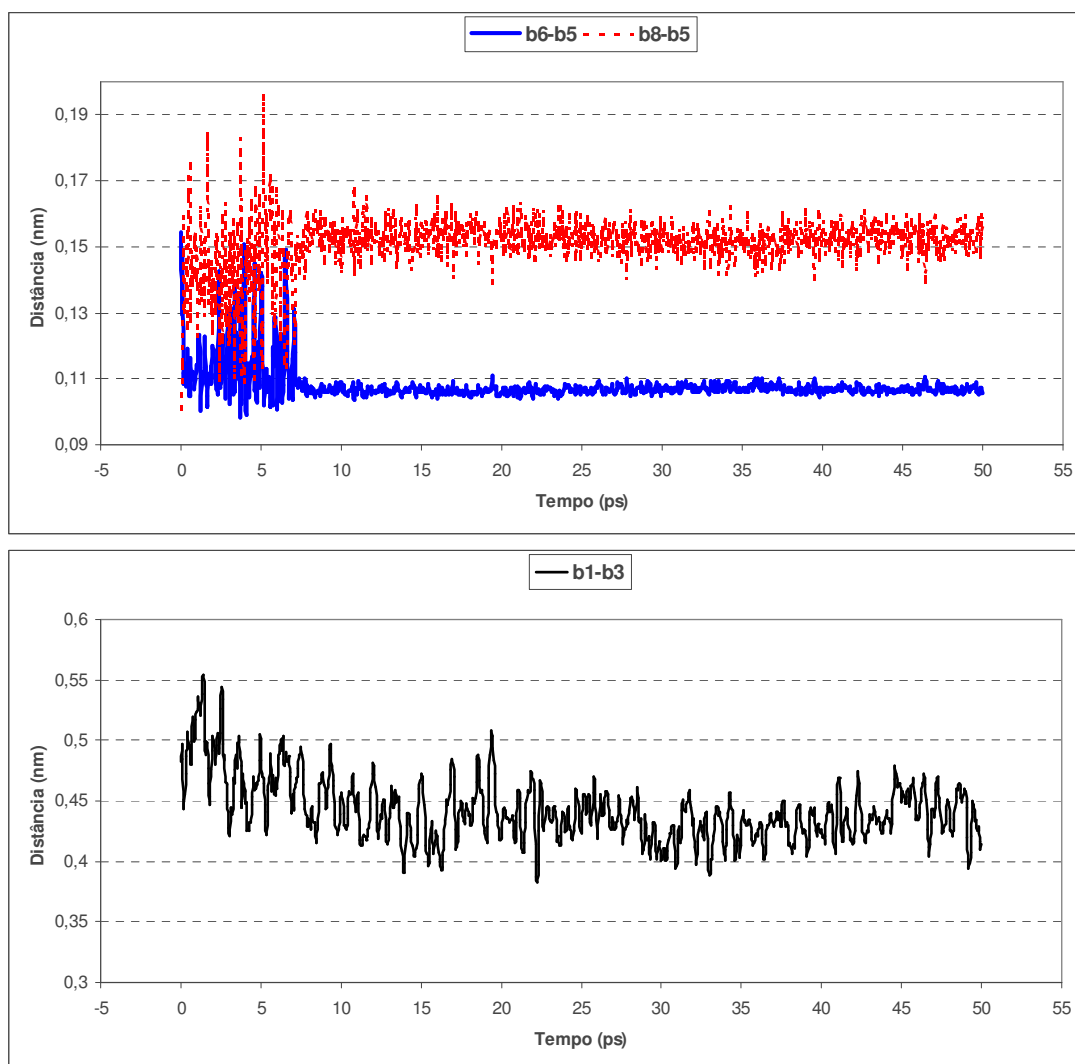


Figura 3.17. Variação das distâncias b_6-b_5 , b_8-b_5 e b_1-b_3 , ao longo do tempo.

Para verificar se o rompimento e a formação de uma nova ligação foi favorável energeticamente, analogamente ao item 3.2.1, calculou-se a energia interna de interação entre os átomos quânticos e o restante do sistema. Os resultados mostraram, Fig. 3.18, que nos primeiros picossegundos (aproximadamente entre 1,0 e 2,0 ps), houve estabilização da energia dos reagentes, em média de $(-597,1 \pm 10,4)$ kcal/mol. Posteriormente, por volta dos 5,0 ps surgiu um máximo de energia possivelmente relacionado ao estado de

transição da primeira etapa de reação, com energia de -560 kcal/mol e, no intervalo entre 26,0 e 50,0 ps, houve estabilização da energia dos produtos em torno dos $(-716,0 \pm 4,6)$ kcal/mol. Assim foi possível calcular a energia média de ativação (energia média do possível estado de transição menos a energia média dos reagentes) e o calor de reação (energia média dos produtos menos a energia média dos reagentes).

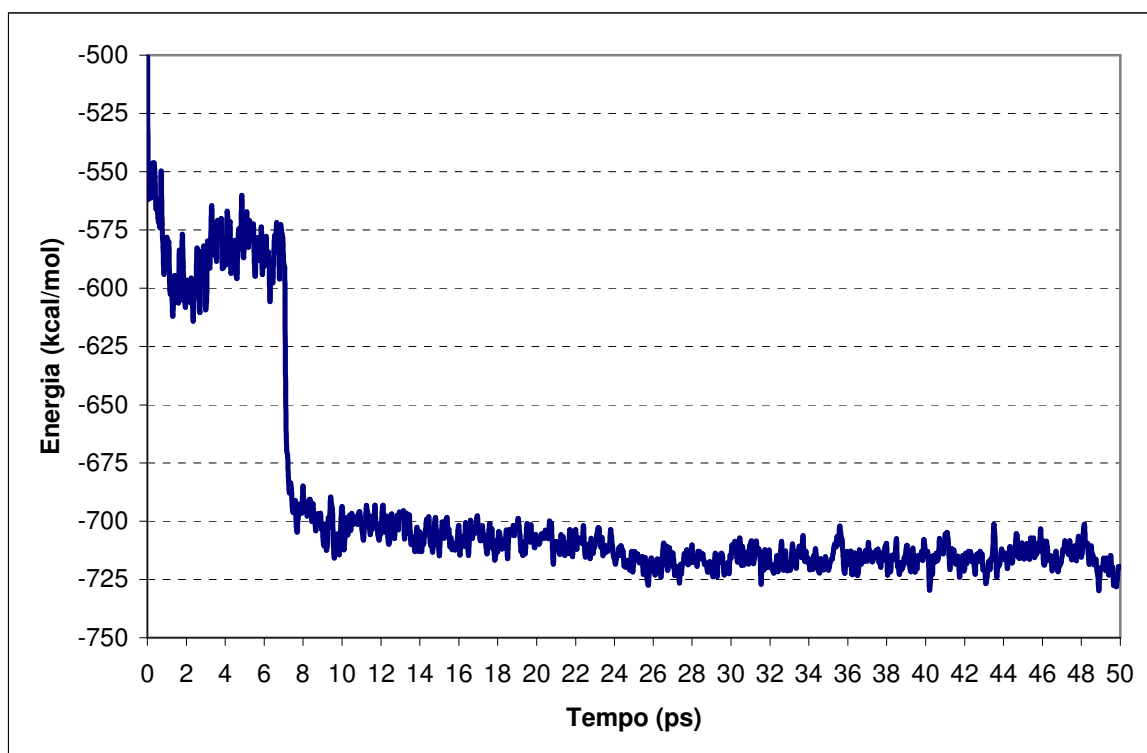


Figura 3.18. Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na primeira etapa de reação.

Os valores médios das energias de reagentes, produtos, estado de transição, ativação e de reação, são apresentados na Tab. 3.2 e mostram que bastou ser rompida uma barreira de aproximadamente 37,1 kcal/mol para que o sistema se estabilizasse em um valor de aproximadamente 118,9 kcal/mol menor que a energia dos reagentes, sugerindo a ocorrência de uma reação espontânea.

Tabela 3.2. Energias médias da primeira etapa de reação: Protonação do Glu334 pela His447.

Energias de	Valor médio (kcal/mol)
Reagentes	-597,1
Produtos	-716,0
Estado de Transição	-560
Reação*	-118,9
Ativação**	37,1

* (produtos) – (reagentes).

** (estado de transição) – (reagentes).

3.2.2.2 Etapa 2

Para simular a segunda etapa da reação, protonação da His447 aniônica pela 2-PAM, foi traçada a coordenada de reação, baseada na restrição da distância **b₁-b₄** (entre oxigênio da 2-PAM e o nitrogênio básico da His447), variando esta distância a cada 5,0 ps, de 0,5 em 0,5 Å, partindo-se de 3,5 Å até chegar aos 3,0 Å, seguida de uma simulação MQ/MM de 50 ps, sem restrição de distância. Assim a condição inicial dos primeiros 5,0 ps foi o último quadro da simulação anterior, Fig. 3.19, com o Glu334 já protonado pela His447. Deste modo seguiu-se com as três simulações sucessivas. Assim, para cada uma das três simulações, foi calculada a variação da energia MQ/MM. Como mostrado na Fig. 3.20(A), para a restrição de 3,5 Å (distância **b₁-b₄**), apesar da energia ter subido, no último ps estabilizou-se em média (média aritmética das energias do último picossegundo) no valor de $(-648,40 \pm 7,2)$ kcal/mol. Adicionalmente, **Apêndice E.2**, essa simulação foi estendida em mais 1 ps, mostrando que a energia parou de subir, estabilizando-se em torno do valor já citado anteriormente. Para a restrição de 3,0 Å, Fig. 3.20(B), é observado um pico de valor $-624,73$ kcal/mol que sugere a energia de um possível estado de transição (ET) referente a provável transferência do hidrogênio ligado ao oxigênio **b₁** da 2-PAM para o nitrogênio **b₄** da His447 e, quando é retirada a restrição, como mostrado na Fig. 3.20(C), a energia oscila entre -680 kcal/mol e -640 kcal/mol, nos últimos 5 ps

de simulação, resultando em um valor médio (média aritmética dos últimos 5 ps da simulação sem restrição da distância $\mathbf{b_1-b_4}$) de $(-657,9 \pm 9,5)$ kcal/mol. Deste modo, com os valores médios calculados mais o valor de máximo de energia para a segunda etapa de reação, foi possível traçar um gráfico que representasse a energia dos reagentes, energia do possível ET e a energia dos produtos, Fig. 3.21.

Monitorando-se a variação das distâncias $\mathbf{b_1-b_2}$ e $\mathbf{b_2-b_4}$, nota-se que realmente houve a transferência do hidrogênio ácido da *2-PAM* para a His447, através da estabilização da distância $\mathbf{b_2-b_4}$, por volta de 1,0 Å, Fig. 3.22. Ainda é possível notar que, nos últimos 50 ps onde a restrição da distância $\mathbf{b_1-b_4}$ foi retirada, a *2-PAM* fica razoavelmente próxima do *GA* e a distância $\mathbf{b_1-b_3}$ (representada na Fig. 3.16) estabiliza-se em torno dos 5,0 Å, a partir dos 40 ps.

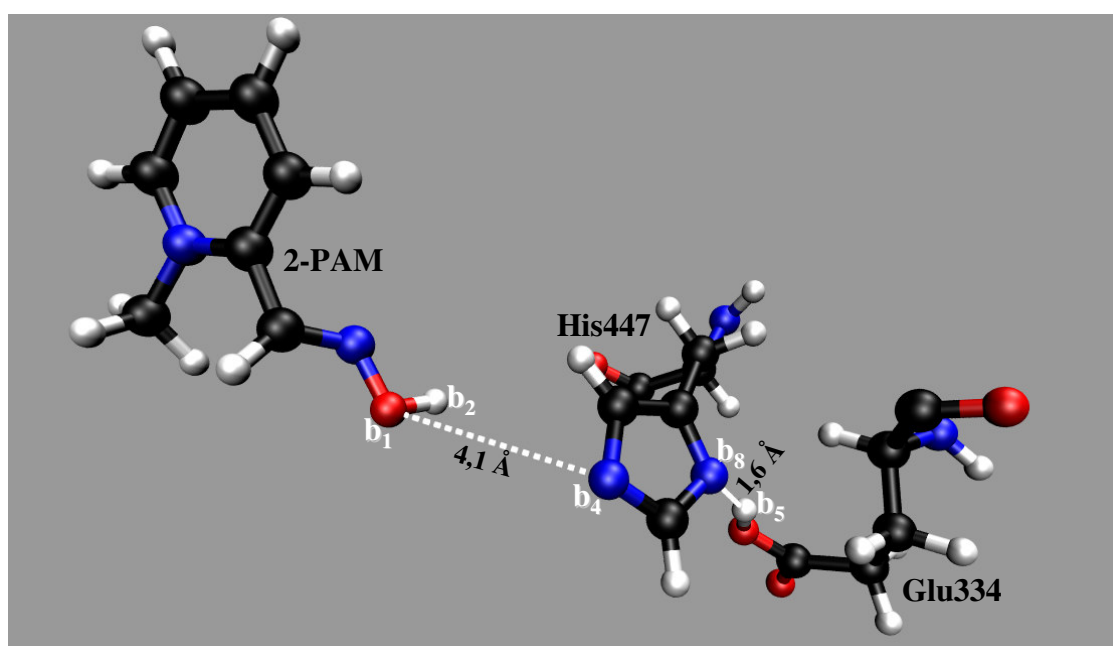


Figura 3.19. Condição de partida para a Etapa 2 (Último quadro da Etapa 1).

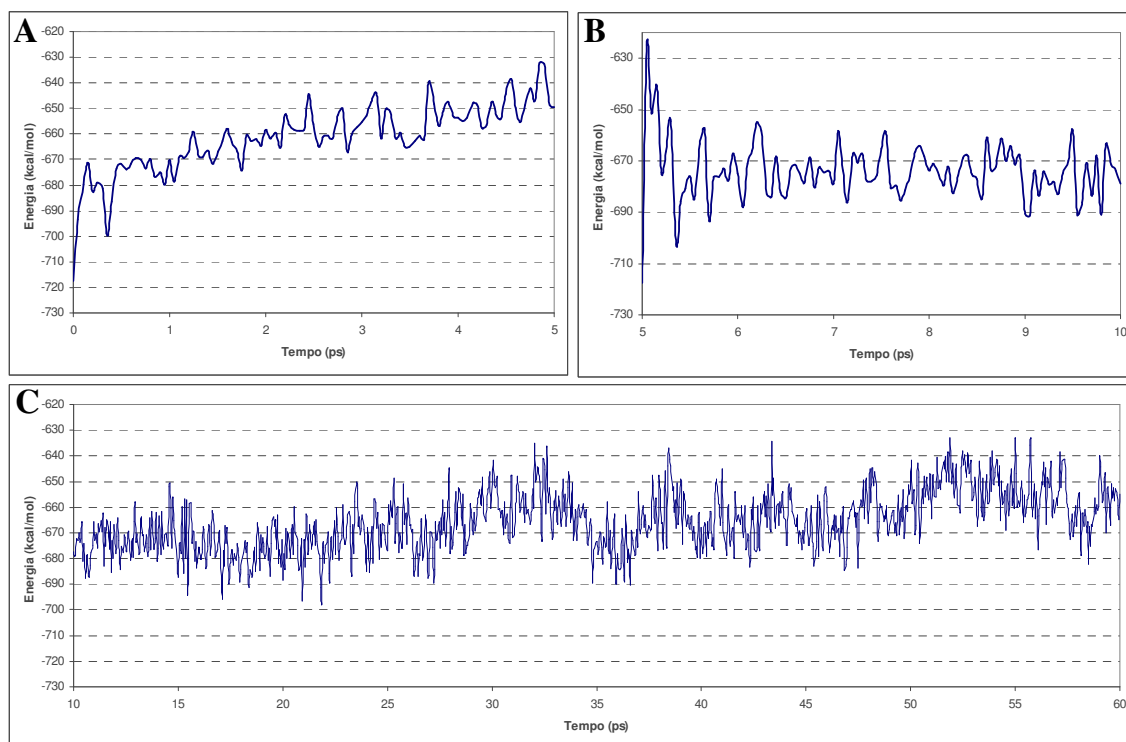


Figura 3.20. Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na segunda etapa de reação. (A) restrição de 3,5 Å; (B) restrição de 3,0 Å e; (C) Sem restrição.

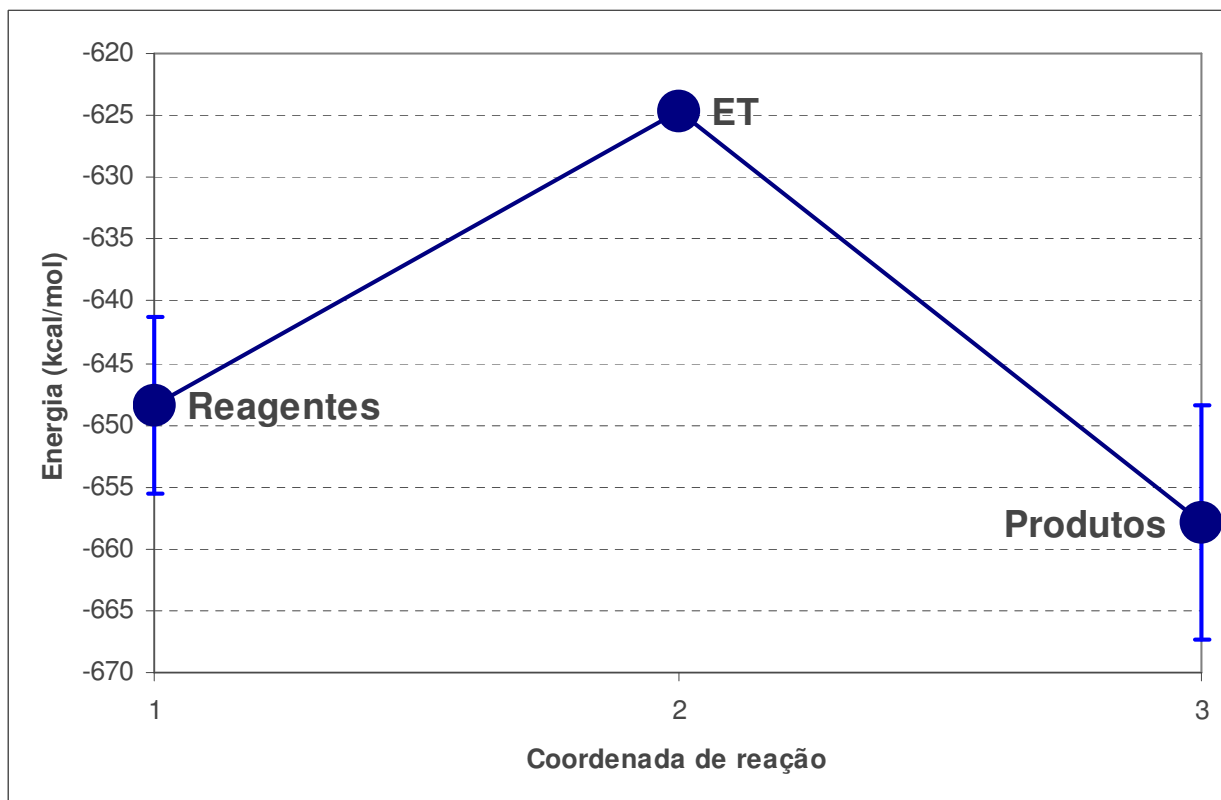


Figura 3.21. Coordenada de reação proposta para a segunda etapa de reação.

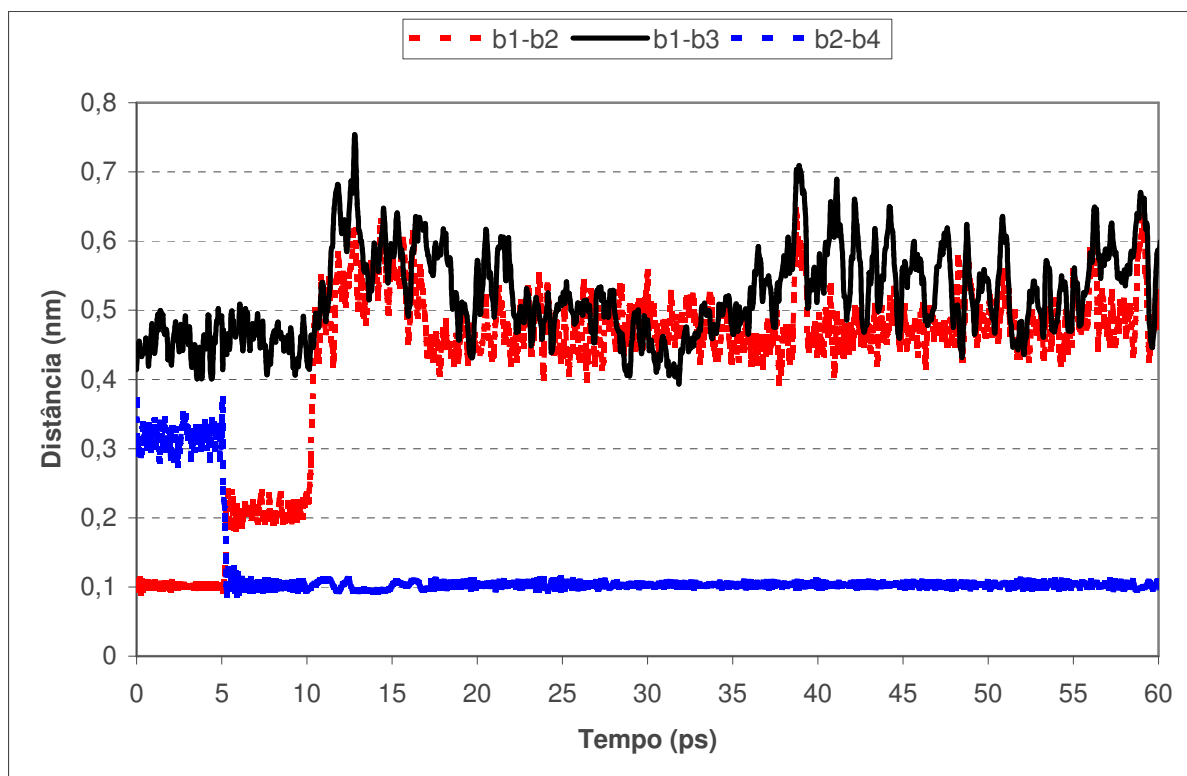


Figura 3.22. Variação das distâncias b_1-b_2 , b_1-b_3 e b_2-b_4 , ao longo do tempo.

3.2.2.3 Etapa 3

Para se propor esta etapa, partiu-se do ultimo quadro da simulação anterior, Fig. 3.23, onde foram feitas, cinco sucessivas simulações de dinâmica MQ/MM de 5,0 ps, cada, com restrições da distância b_1-b_3 , respectivamente, de 4,0 Å, 3,5 Å, 3,0 Å, 2,5 Å e 2,0 Å, seguida de mais uma simulação híbrida de 5,0 ps com restrição para as distâncias b_1-b_3 e b_3-b_7 de 2,0 Å, de forma que o possível estado intermediário bipirâmide trigonal, formado entre a *2-PAM*, o *GA* e a Ser203, se estabilizasse, Fig. 3.24. Assim, as restrições foram retiradas e foi feita mais uma simulação híbrida de 50 ps, perfazendo um total de 80 ps.

Analogamente às etapas anteriores, a energia MQ/MM foi calculada e monitorada ao longo do tempo, Fig. 3.25. Os resultados sugerem, a partir da observação do perfil energético, que está se formando um produto com uma energia

por volta dos -675 kcal/mol. Além disso, há um ponto de máximo em, aproximadamente -525 kcal/mol e, uma energia inicial de aproximadamente -625 kcal/mol, sugerindo uma coordenada de reação, em que há energia de reagentes, energia de um possível estado de transição, seguido de energia de produtos. Assim as distâncias b_1-b_3 e b_3-b_7 , referentes aos 50 últimos picossegundos, foram monitoradas, Fig.3.26 e, como se pode observar, o fósforo (b_3) do organofosforado GA se ligou ao oxigênio (b_7) da Ser203 enquanto a 2-PAM se afastou do GA. Assim, esta coordenada de reação, não foi efetiva para descrever um processo de reativação da *HuAChE*, possivelmente pela serina por esta via de reação, ser mais nucleofílica do que a pralidoxima. Deste ponto de vista, seria necessário propor uma via, em que a Ser203, se tornasse menos nucleofílica possibilitando a ocorrência da reação de desinibição da enzima. Assim foi proposta uma quarta via de reação.

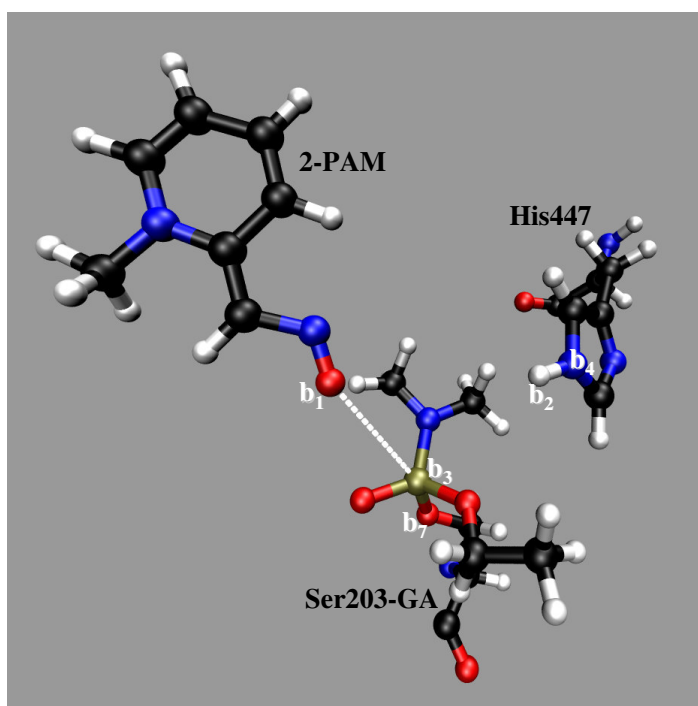


Figura 3.23. Condição de partida para a Etapa 3 (Ultimo quadro da Etapa 2).

The graph displays the potential energy of a system over an 80-picosecond period. The y-axis, labeled 'Energia (kcal/mol)', ranges from -500 to -725 with major grid lines every 25 units. The x-axis, labeled 'Tempo (ps)', ranges from 0 to 80 with major ticks every 5 units. The energy trace is highly oscillatory. From 0 to approximately 30 ps, the energy fluctuates between -600 and -625 kcal/mol, with a notable peak reaching -525 kcal/mol at 25 ps. Between 30 and 35 ps, the energy drops significantly, stabilizing at a lower level. From 35 ps to 80 ps, the energy fluctuates between -675 and -700 kcal/mol, with a slight upward trend towards the end of the simulation.

Figura 3.25. Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na terceira etapa de reação.

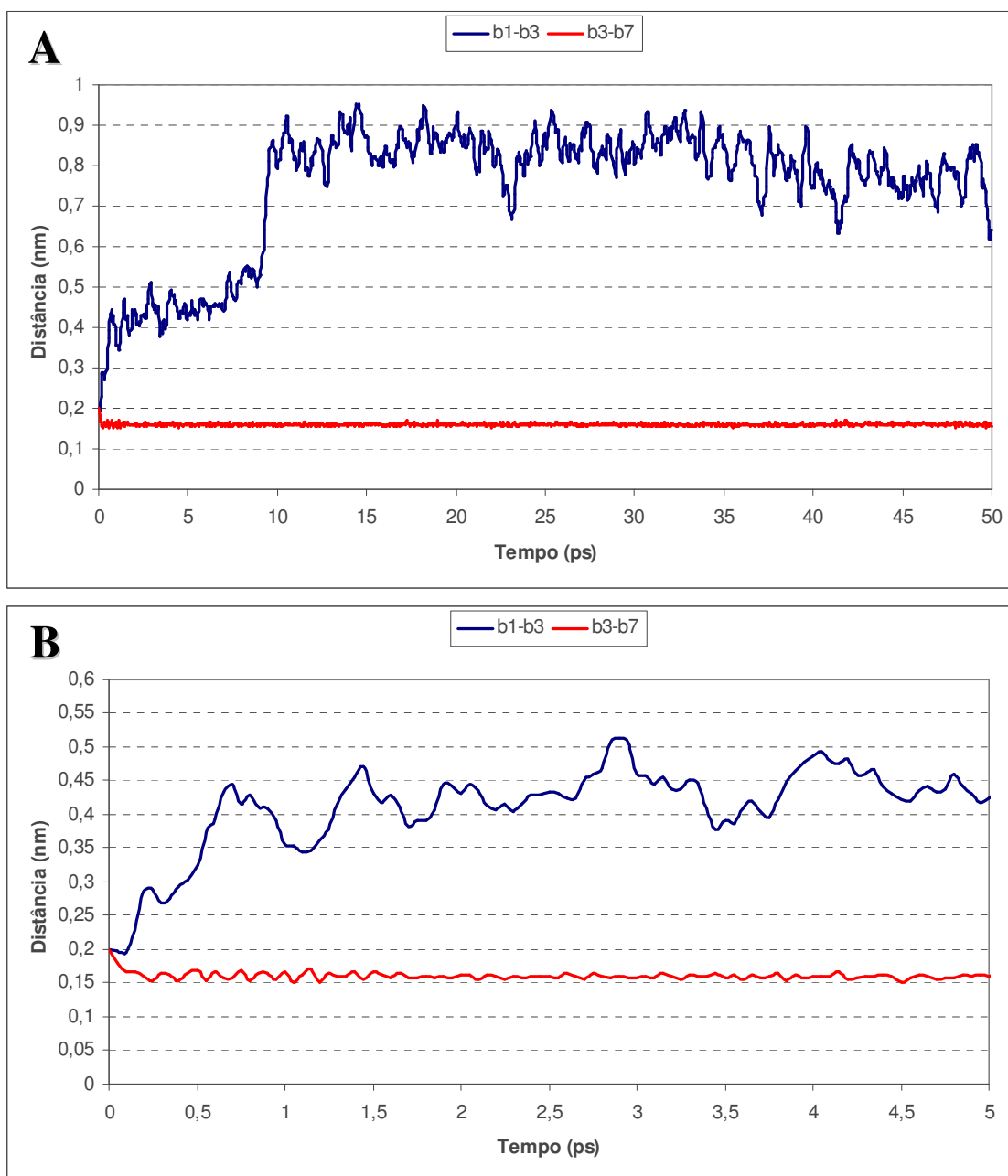


Figura 3.26. Distâncias b_1-b_3 e b_3-b_7 ao longo dos (A) 50ps finais da terceira etapa de reação. (B) Ampliação dos primeiros 5 ps.

3.2.2.4 Etapa 4

Nesta via, o quadro de partida foi o referente ao instante 30 ps da simulação anterior, que além de continuarem sendo mantidas as restrições de 2,0 Å para as distâncias b_1-b_3 e b_3-b_7 , uma nova restrição de distância foi feita em b_4-b_7 , Fig. 3.27, variando esta de 5,5 Å até 3,5 Å de 0,5 em 0,5 Å. Deste modo foram feitas

simulações por DM MQ/MM de 5,0 ps para cada restrição e, após o término destes 25 ps, foi feita mais uma última simulação de 50 ps, sem restrição de distâncias, totalizando 75 ps. A energia MQ/MM foi calculada, durante este intervalo de tempo, e somada aos 30 ps da simulação anterior para possibilitar a visualização de um perfil energético, durante 105 ps, como é mostrado na Fig. 3.28.

Apesar do aspecto do gráfico de energia MQ/MM nos fornecer um perfil de reação química, onde se tem, energia de reagentes, entre -650 e -600 kcal/mol, energia de um possível estado de transição, por volta de -500 kcal/mol e a energia dos produtos, oscilando entre -675 e -625 kcal/mol, distâncias como **b₂-b₄**, **b₂-b₇**, **b₁-b₃**, **b₃-b₇** e **b₄-b₉**, que pudessem variar o suficiente a ponto de favorecer ocorrência de reações químicas, foram monitoradas dos 30 ps até os 105 ps, lembrando que o intervalo entre 30 e 55 ps, se refere à região onde há variação da restrição de distância **b₄-b₇** e restrição de $2,0 \text{ \AA}$ para as distâncias **b₁-b₃** e **b₃-b₇** e, a partir dos 55 ps, todas as restrições foram retiradas. As variações das distâncias **b₂-b₄**, **b₂-b₇**, **b₁-b₃**, **b₃-b₇** e **b₄-b₉**, ao longo do tempo, são mostradas nas Fig. 3.29, Fig. 3.30 e Fig. 3.31.

Como mostrado na Fig. 3.29, logo que é feita a restrição de $3,5 \text{ \AA}$ para a distância **b₄-b₇** (entre 50 e 55 ps), o próton (**b₂**) ligado ao nitrogênio (**b₄**) é imediatamente doado para o oxigênio (**b₇**) da Ser203 e, quando todas as restrições são retiradas, a partir dos 55 ps, o nitrogênio (**b₄**) não volta a se ligar ao próton (variação da distância **b₂-b₇**) e, a ligação entre o oxigênio (**b₇**) e o hidrogênio (**b₂**), é estabilizada em torno de $1,0 \text{ \AA}$.

No caso das variações das distâncias referentes ao átomo de fósforo (**b₃**) do GA, oxigênio da 2-PAM (**b₁**) e oxigênio da Ser203 (**b₇**), Fig. 3.30, pode-se notar que, entre 55 ps e 66 ps, já sem restrições de distâncias, o fósforo se aproxima do

oxigênio da *2-PAM*, ficando entre 1,8 e 1,9 Å e, se afasta do oxigênio da Ser203, ficando entre 1,9 e 2,0 Å. Além disso, a partir dos 66 ps, é mostrado que, efetivamente, a *HuAChE* foi reativada, pois a distância **b₁-b₃** fica, em média, em torno dos 1,75 Å (valor de uma ligação covalente formada entre um fósforo e um oxigênio) e a distância **b₃-b₇**, em torno dos 2,0 Å.

Outro resultado mostrado na Fig. 3.31, é a ocorrência natural da protonação do nitrogênio (**b₄**) da His447 por um dos hidrogênios metílicos (**b₉**) da *2-PAM*, que ocorreu sem nenhuma restrição de distâncias, ou seja, a partir dos 55 ps de simulação o hidrogênio metílico da *2-PAM* se aproximou do nitrogênio (**b₄**) da His447 e, se ligou a este, a partir dos 66 ps, onde o comprimento desta ligação é muito próximo de 1,0 Å.

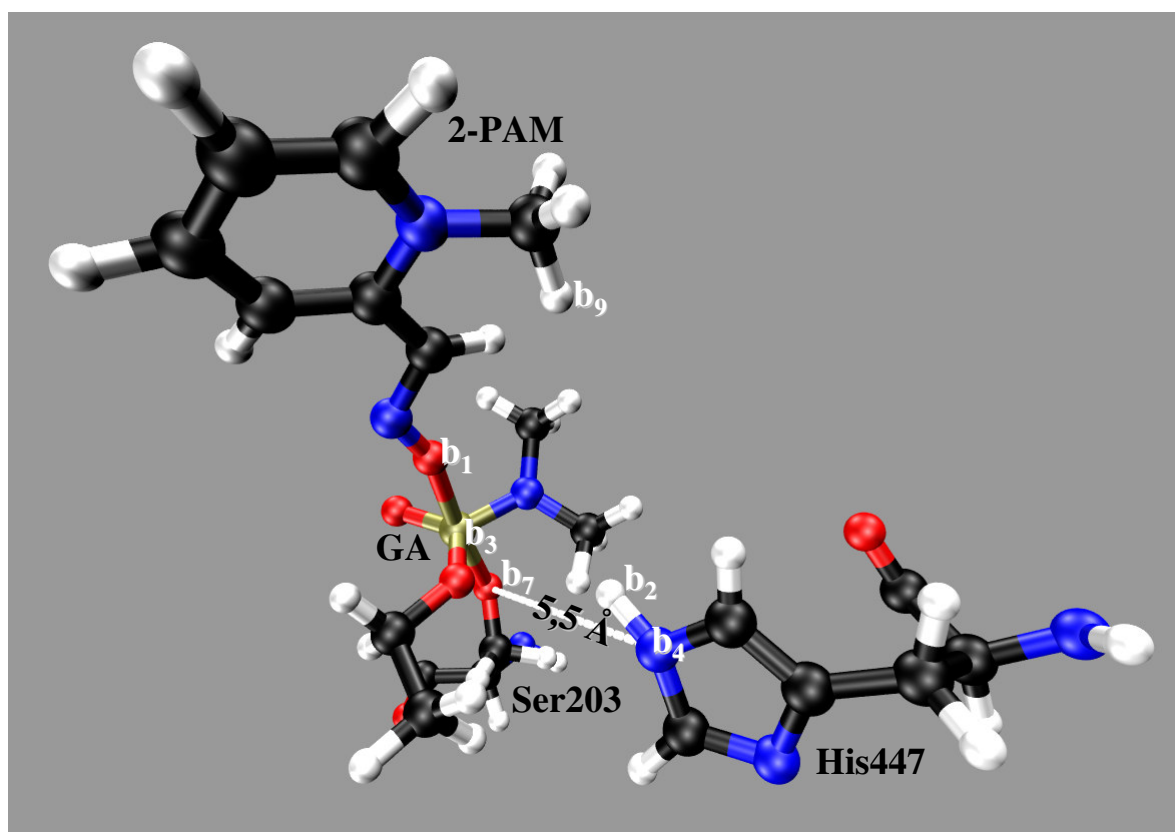


Figura 3.27. Início dos primeiros 5 ps da etapa 4, com restrição em **b₄-b₇** de 5,5 Å.

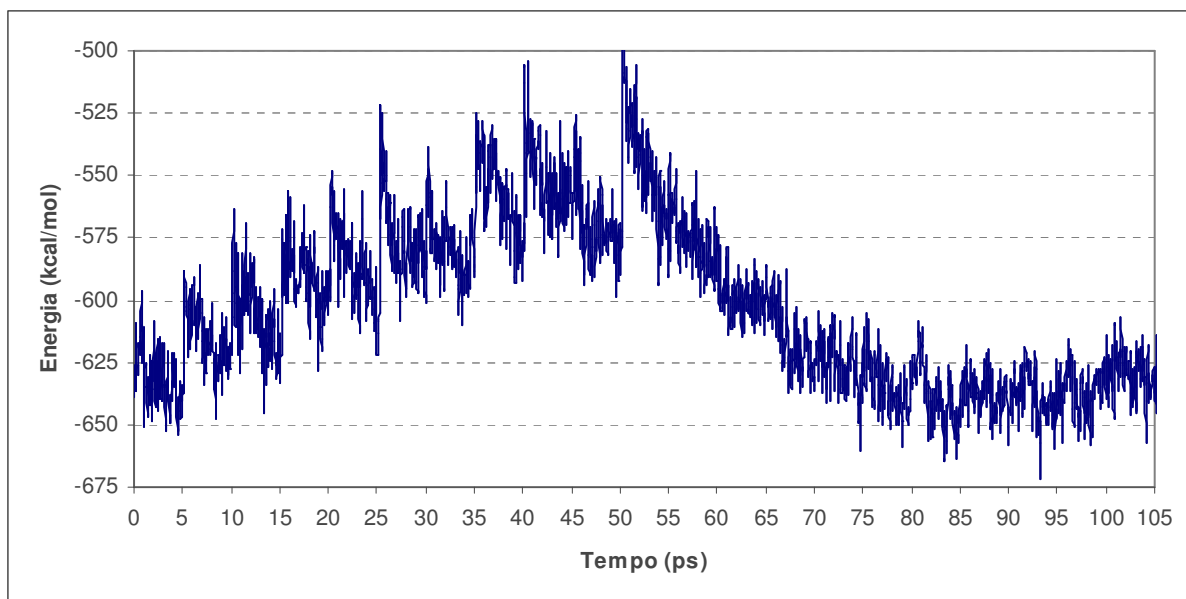


Figura 3.28. Variação da energia MQ/MM por DM híbrida na quarta etapa de reação.

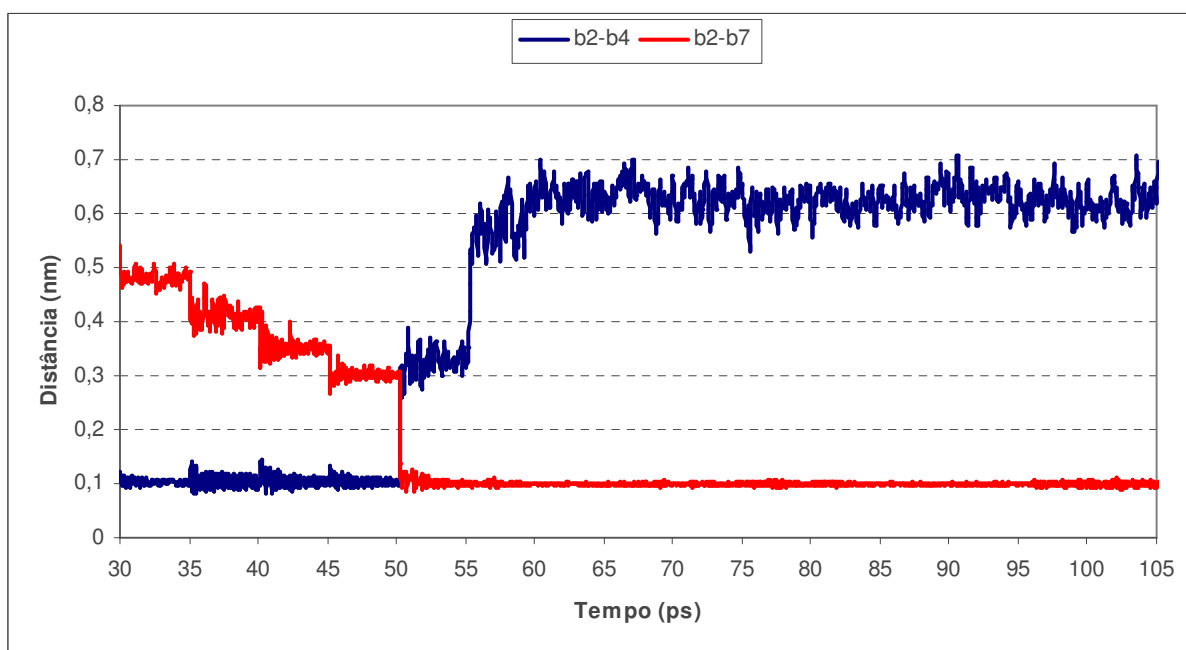


Figura 3.29. Distâncias b_2-b_4 e b_2-b_7 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação.

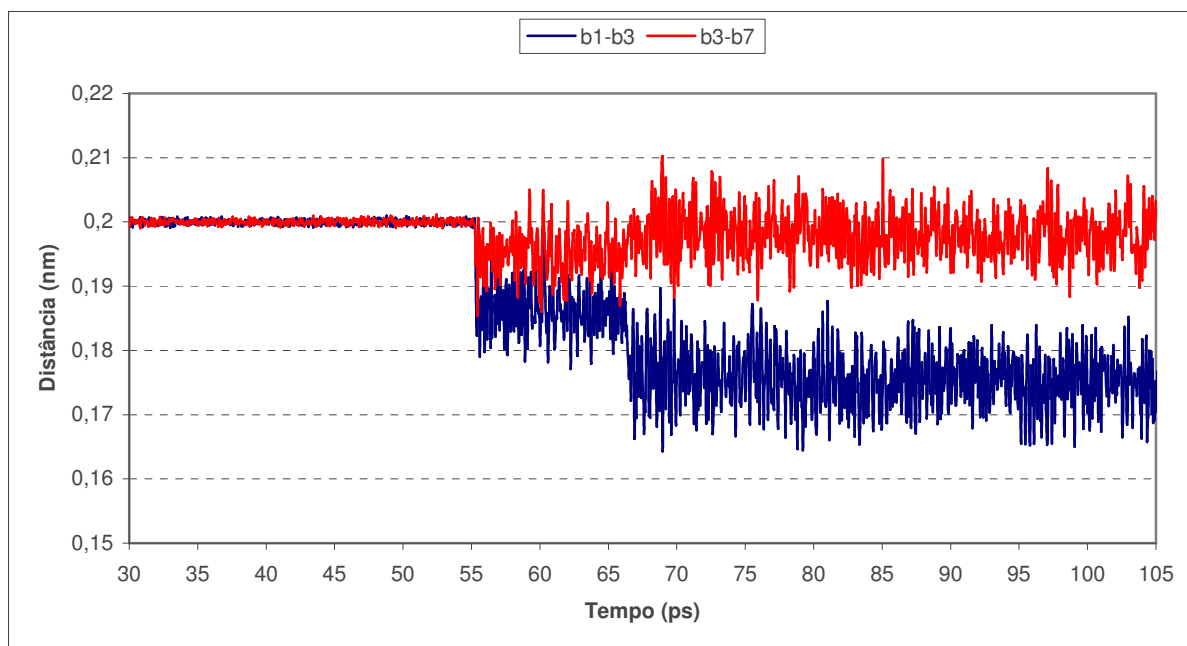


Figura 3.30. Distâncias b_1-b_3 e b_3-b_7 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação.

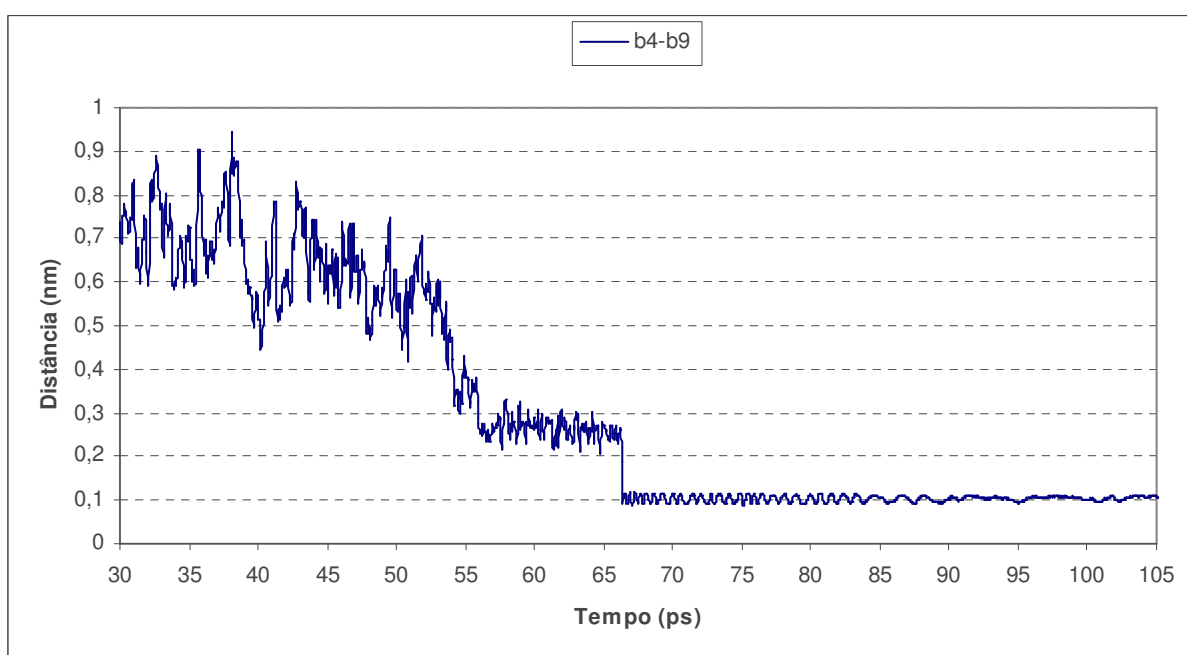


Figura 3.31. Distância b_4-b_9 ao longo dos 75 ps finais da quarta etapa de reação.

Tanto em cálculos puramente quânticos, como em cálculos híbridos, é comum se traçar um caminho de reação, fazendo com que valores de distâncias, ângulos ou ângulos de diedros variem, de forma que seja possível traçar um gráfico de energia versus coordenada de reação. Isto pode ser feito manualmente, como mostrado

neste trabalho, ou de forma automatizada como é feito em programas como o MOPAC.

Em Mecânica Quântica, a formação e quebra de ligações entre átomos pesados não ocorrem sem a ajuda de uma coordenada dinâmica ou sem o uso de sucessivas restrições de distâncias, por exemplo. Já protonações e desprotonações, podem ocorrer naturalmente e sem o uso de restrições.

Assim que o nitrogênio da His447 foi protonado pelo hidrogênio metílico da 2-PAM, o comprimento da ligação entre o fósforo do organofosforado GA e o oxigênio da oxima se reduziu e ficou estabilizado em torno dos 1,75 Å. Neste trabalho, assim que o próton metílico foi doado, a carga total do complexo 2-PAM/GA passou de +1 para zero. Como já descrito na literatura por Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES *et al.*, 2006), para que oximas permaneçam no sítio ativo da *HuAChE*, é necessário que ela seja carregada positivamente e, para que ela saia, é necessário ter carga total nula ou negativa.

Para evitar usar restrição de distâncias, uma estratégia seria reparametrizar o sistema após o primeiro passo da reação e voltar à simulação de DM clássica, pois a mudança de carga leva a mudanças conformacionais em maior escala. Após o re-equilíbrio do sistema, se escolheria um quadro com a condição de aproximação ótima dos novos reagentes, para então fazer MQ/MM novamente. Em seguida o processo se repetiria com nova reparametrização e novo retorno à DM clássica, até completar todos os passos de reação. Porém, o tempo envolvido nos rearranjos conformacionais e perturbações no sistema por diversos fatores, inclusive a falta de efeitos de polarização nas simulações puramente clássicas, poderiam não garantir a execução de todas as etapas em tempo hábil. Isto levou à escolha do procedimento executado no presente trabalho (restrição de distâncias), deixando as alternâncias

entre dinâmicas clássicas e híbridas para trabalhos futuros, em melhores condições de capacidade de processamento computacional e programas paralelizados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ESTADOS DE TRANSIÇÃO

Com todos os resultados obtidos, referentes às quatro etapas de reações, propostas por MQ/MM, ainda é preciso ter certeza de que, em cada via, haja um ponto de sela verdadeiro, ou seja, um verdadeiro estado de transição. Isso é feito através do cálculo da frequência imaginária no infravermelho que será descrito a seguir, individualmente para cada etapa de reação.

3.3.1 Etapa 1

Neste passo, tomou-se como condições de partida, coordenadas da primeira etapa da simulação híbrida, somente dos átomos quânticos referentes a His447 e o Glu334, no momento em que o próton do nitrogênio delta da histidina foi transferido, para prosseguir com os cálculos semi-empíricos de ET e CRI, usando o método RM1. Os resultados mostraram, Fig. 3.32, que foi encontrada uma única frequência imaginária (frequência negativa no infravermelho) de valor $2216i\text{ cm}^{-1}$ e de intensidade considerável, indicando a existência do estado de transição, referente a protonação do Glu334 pela His447. Assim, para caracterizar a absorção $2216i\text{ cm}^{-1}$ no infravermelho como ponto de sela verdadeiro, foi feito o cálculo da CRI, que é apresentado na Fig. 3.33(A) e que mostra conectividade entre reagentes, ET e produtos. Ainda assim, verificou-se a espontaneidade da reação, a partir do cálculo da energia livre de reação ($\Delta G^{\circ}_{\text{reação}} = G^{\circ}_{\text{produtos}} - G^{\circ}_{\text{reagentes}}$), baseada na energia

interna e não na entropia, Fig. 3.33(B), onde o valor obtido foi de $-2,57$ kcal/mol, mostrando que a reação é espontânea. Os resultados mostram ainda, Fig. 3.33(A), que para os reagentes se transformarem em produtos é necessário romper uma barreira energética de $9,67$ kcal/mol.

Adicionalmente, **Apêndice E.3**, foi calculada a frequência imaginária no infravermelho, para esta primeira etapa de reação, com a histidina protonada nos dois nitrogênios, a fim de verificar se seria encontrado um estado de transição que representasse a desprotonação da histidina pelo glutamato. Assim, verificou-se que foi encontrada uma única frequência imaginária (frequência negativa no infravermelho) de valor $815i\text{ cm}^{-1}$ e de alta intensidade, indicando a existência do estado de transição também para esta reação.

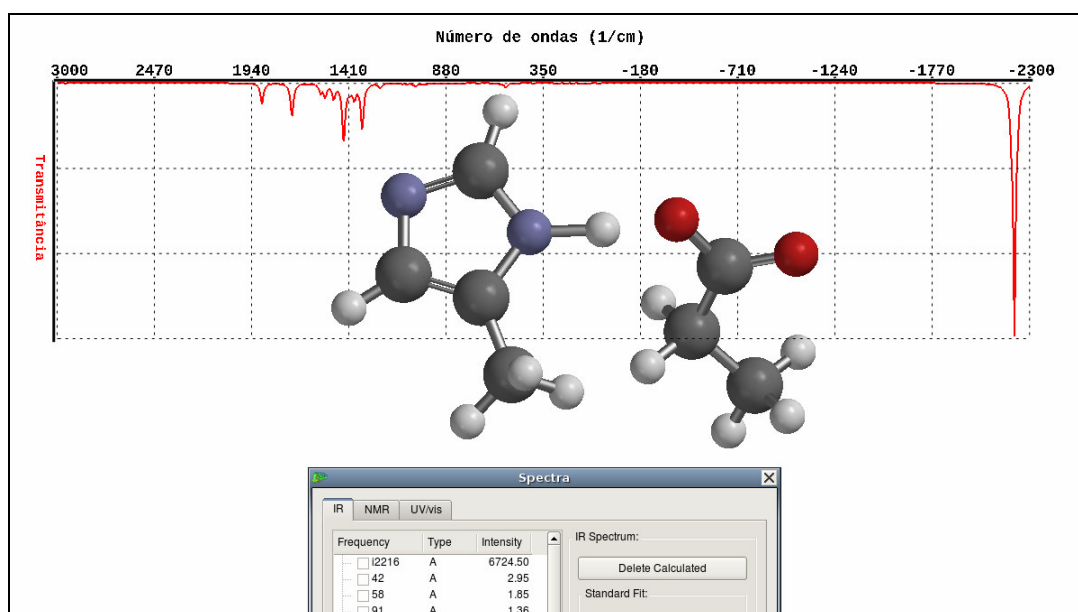


Figura 3.32. Espectro no infravermelho para a primeira etapa de reação, usando o método RM1.

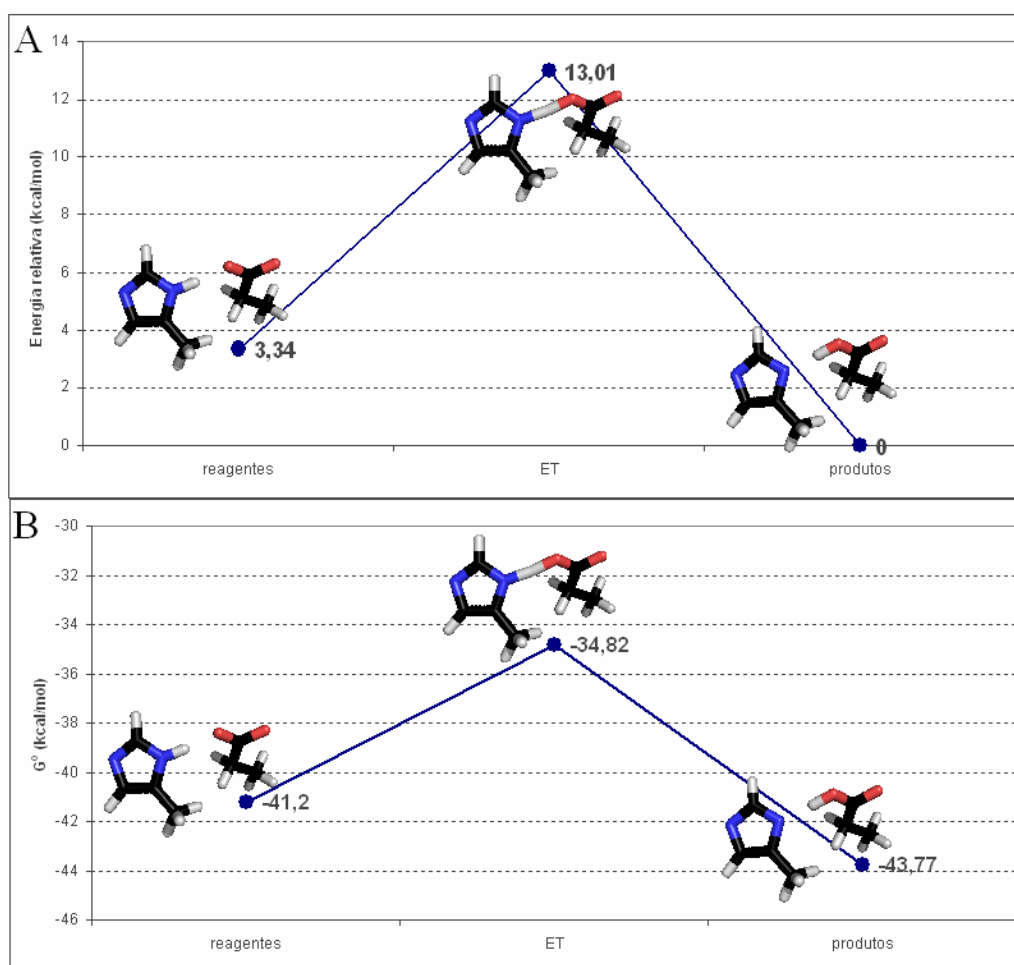


Figura 3.33. (A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na primeira etapa de reação.

3.3.2 Etapa 2

Nesta próxima etapa, a transferência do próton da hidroxila da *2-PAM* para o nitrogênio Eta da HIS447, houve a participação do Glu334. As coordenadas destas três moléculas foram extraídas da segunda etapa dos cálculos híbridos, exatamente no momento da transferência do próton da oxima para o nitrogênio básico da histidina. Assim a caracterização do ET e o cálculo da CRI foram feitos e os resultados mostraram, Fig. 3.34, que houve absorção no infravermelho referente a uma única frequência imaginária de $1185i\text{ cm}^{-1}$ bastante intensa, em relação às outras, caracterizando o estado de transição desta segunda etapa de reação. Já os

resultados por CRI, Fig. 3.35(A), mostraram que houve conexão entre reagentes, ET e produtos, além de mostrar que o Glu334 foi importante para contribuir com uma barreira energética pequena, de apenas 0,3 kcal/mol, que favoreceu a ocorrência de uma reação mais espontânea que a reação da etapa anterior, com calor de reação igual a $-33,51$ kcal/mol, Fig. 3.36(A) e ΔG de reação, baseado na energia interna, igual a $-33,19$ kcal/mol, Fig. 3.36(B).

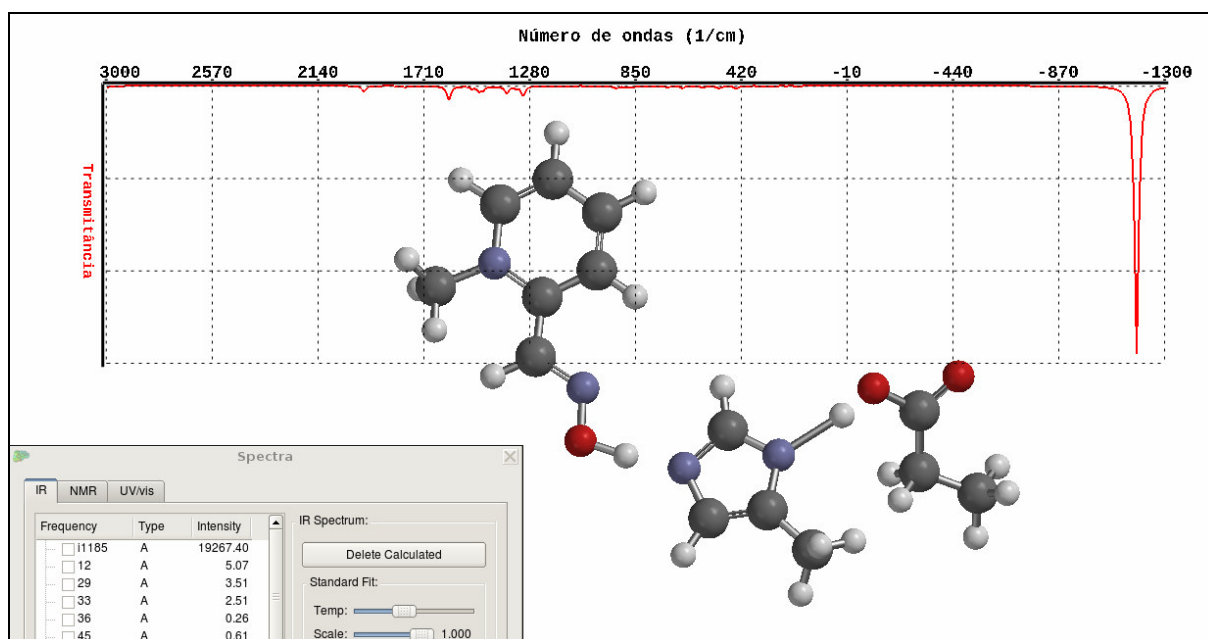


Figura 3.34. Espectro no infravermelho para a segunda etapa de reação, usando o método RM1.

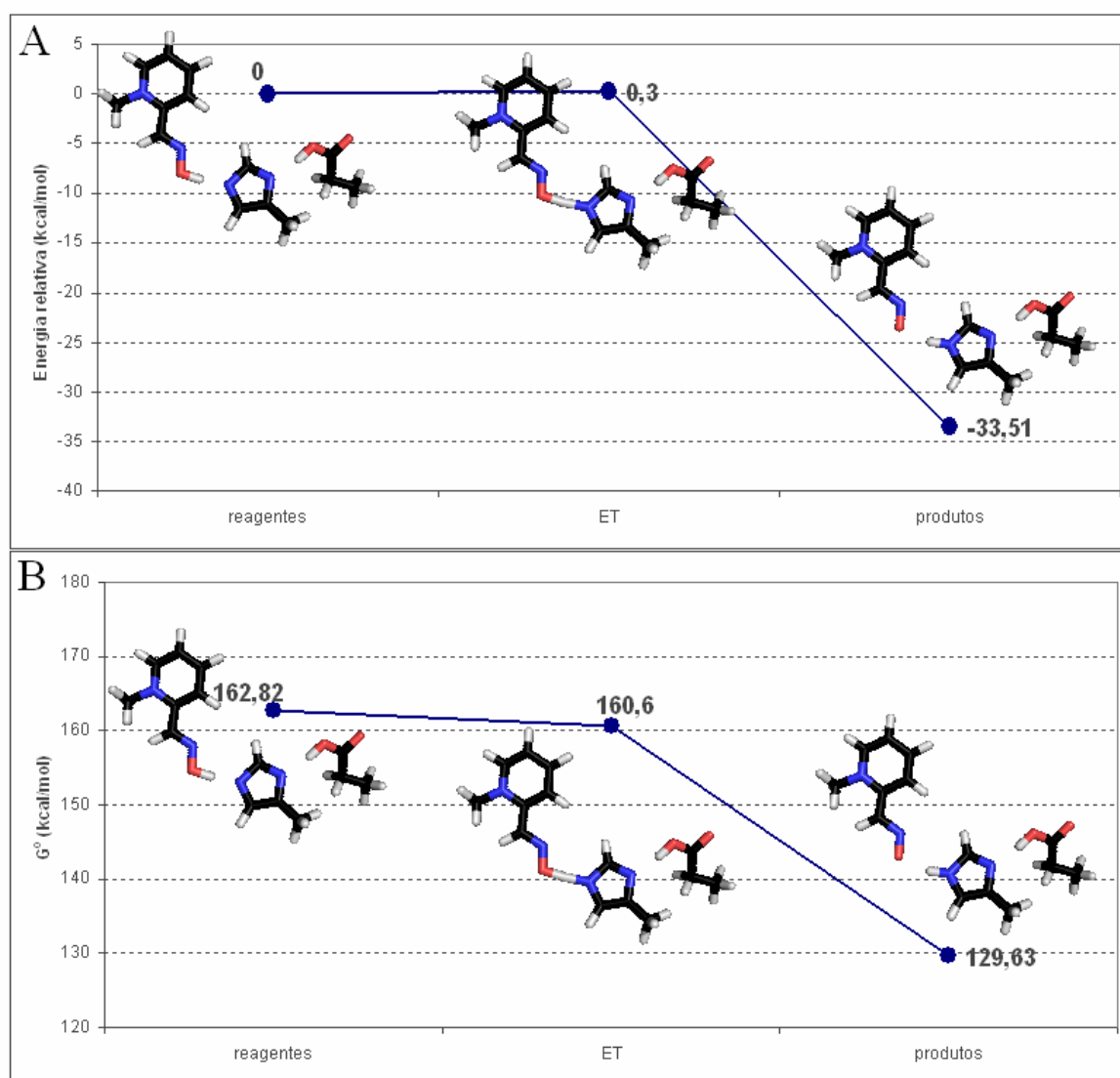


Figura 3.35. (A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na segunda etapa de reação.

3.3.3 Etapa 3

Neste passo, pegou-se como condição inicial, as coordenadas referentes ao complexo *2-PAM/GA/Ser203* bipiramidétrigonal mais as coordenadas da His447, no momento em que a histidina doou o próton para a o oxigênio da serina. Quando o estado de transição foi calculado, apareceu uma única frequência imaginária de intensidade razoável e de valor $2345i\text{ cm}^{-1}$, caracterizando este como um verdadeiro estado de transição, como é mostrado na Fig. 3.36. Assim, foi feito o CRI, mostrando

conexão entre reagentes, ET e produtos, Fig. 3.37, caracterizando o ET como um verdadeiro ponto de sela.

Para esta etapa de reação, o valor da energia de ativação foi próximo do valor obtido na primeira etapa de reação, dando 10,76 kcal/mol (17,46 kcal/mol – 6,7 kcal/mol), Fig. 3.37(A), e os valores dos calores de reação e da energia livre de reação, baseada na energia interna de reação, foram, respectivamente, -6,7 kcal/mol e -7,3 kcal/mol, mostrando que esta terceira etapa de reação, também é espontânea.

Outro resultado interessante, obtido neste passo, foi a contração da ligação entre o fósforo do *GA* e o oxigênio da *2-PAM* e, o estiramento da ligação formada entre o fósforo do *GA* e o oxigênio da Ser203, que ocorreu no momento que o próton da histidina foi doado para o oxigênio da serina (formação de produtos), sugerindo que esta reação ocorre no sentido da reativação da *HuAChE*. Os valores destas distâncias para os reagentes, ET e produtos são mostrados na Fig. 3.38.

Para esta etapa de reação, ainda foi feito um cálculo adicional, mostrado no **Apêndice E.4**, em que foi colocado um grupo hidroxila abaixo da histidina para representar o efeito do glutamato da tríade catalítica da *HuAChE*. Assim foi calculada a frequência imaginária no infravermelho, para esta reação, a fim de verificar se seria encontrado um estado de transição que representasse a protonação da serina pela histidina. Verificou-se que foi encontrada uma única frequência imaginária (frequência negativa no infravermelho) de valor $1602i\text{ cm}^{-1}$ e de alta intensidade, indicando a existência do estado de transição também para esta reação. Resultados mostraram que, após a otimização do estado de transição, o grupo hidroxila foi protonado, se transformando em água e a frequência imaginária obtida para a histidina em sua forma neutra, representou a protonação da serina

pela histidina, agora desprotonada e com carga formal -1, corroborando resultados obtidos na **Etapa 4** dos métodos híbridos, Fig. 3.29.

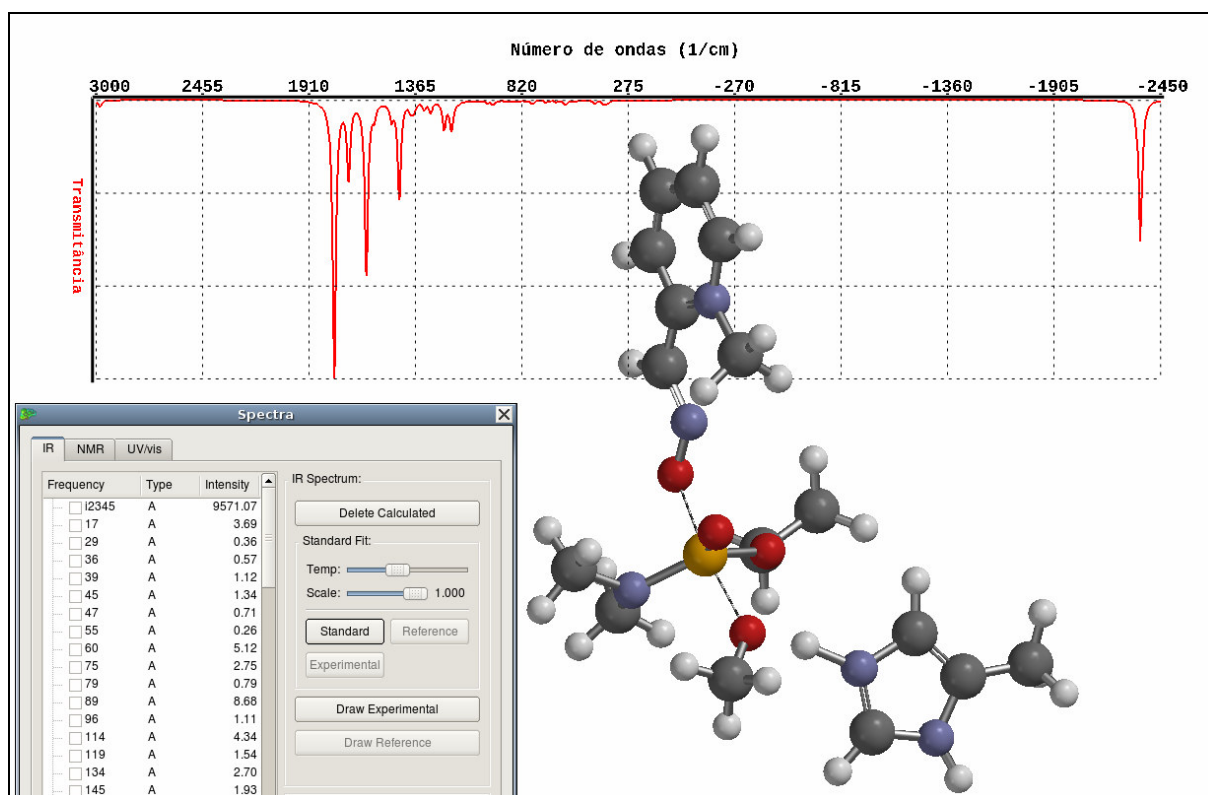


Figura 3.36. Espectro no infravermelho para a terceira etapa de reação, usando o método RM1.

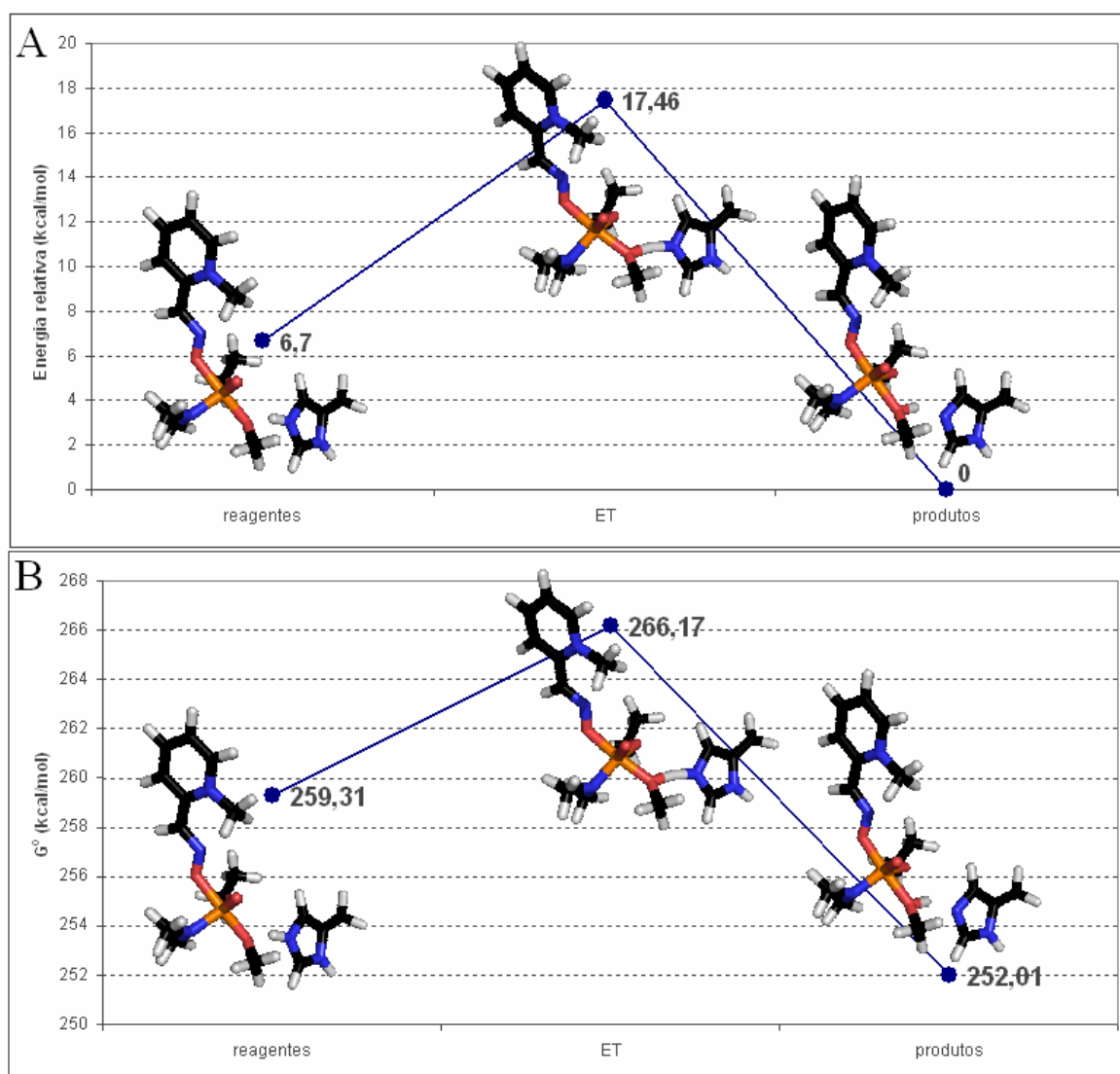


Figura 3.37. (A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na terceira etapa de reação.

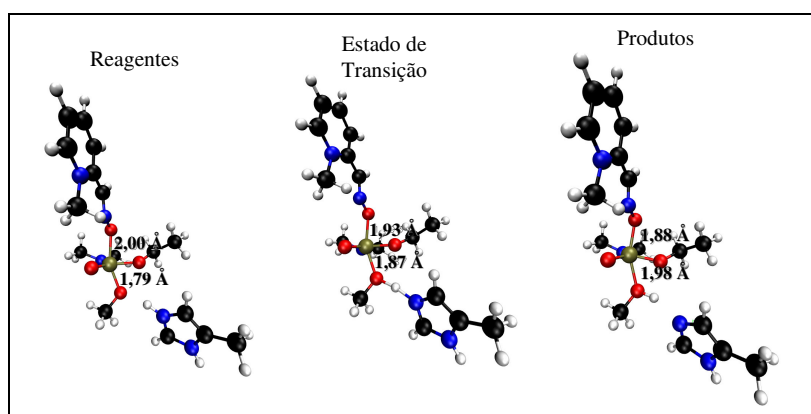


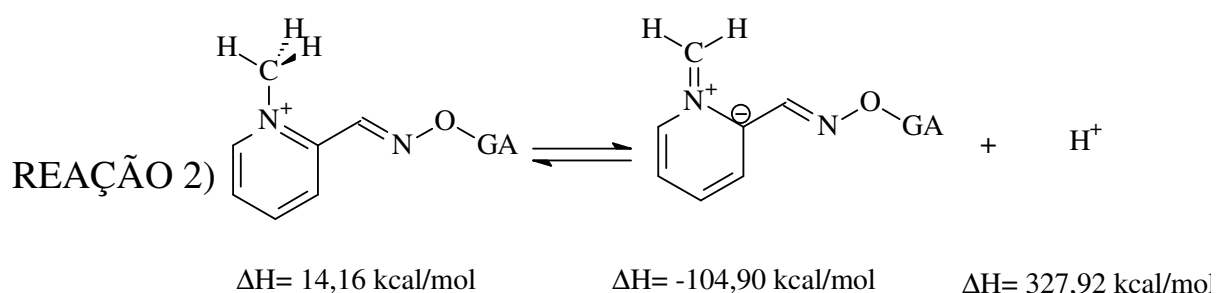
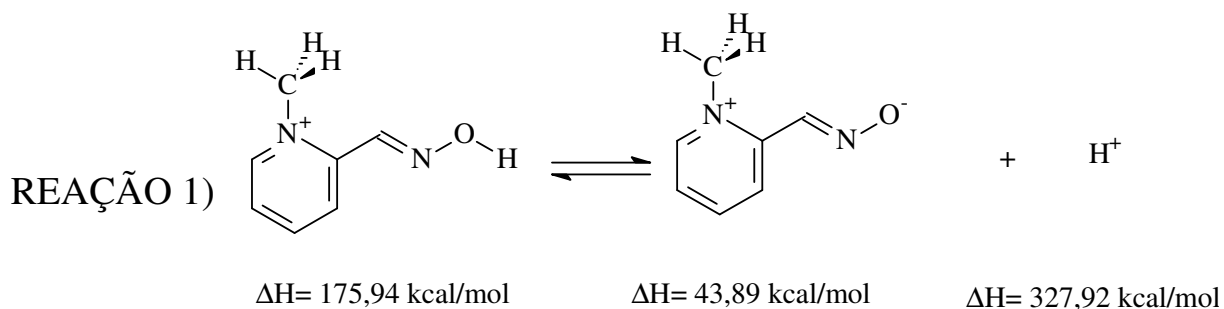
Figura 3.38. Variação de distâncias entre a 2-PAM e o GA e entre o GA e a Ser203, na terceira etapa de reação.

3.3.4 Ultima etapa

Nesta via de reação química, um próton do grupo metil do anel piridinico da *2-PAM*, foi doado para a histidina. Tomaram-se como condições de partida, coordenadas referentes ao cálculo obtido por MQ/MM, no momento que este próton foi doado. Assim o estado de transição e a coordenada de reação intrínseca foram calculados. Os resultados mostraram, que para esta etapa, apesar de se saber que o rompimento de ligações carbono-hidrogênio não é muito comum em química orgânica, houve o aparecimento de um estado de transição bem caracterizado, Fig. 3.39, com frequência 737 i cm^{-1} e, com alta intensidade em relação às outras bandas de absorção. Além disso, sua validação como ponto de sela verdadeiro foi feita por CRI, Fig. 3.40. Com isso, foram calculados os calores de reação e a energia livre de reação, baseada na energia interna, dando valores, respectivamente de $-21,77\text{ kcal/mol}$ e $-20,13\text{ kcal/mol}$, mostrando que esta reação é mais espontânea e ocorre com menor gasto energético que a reação da etapa anterior, por ter uma barreira energética de apenas $0,18\text{ kcal/mol}$, Fig. 3.40(A). Ainda, analogamente a resultados obtidos por MQ/MM, observou-se que, o comprimento da ligação formada entre o fósforo do *GA* e o oxigênio da *2-PAM* se contraiu de $1,77\text{ \AA}$ para $1,73\text{ \AA}$, estabilizando, mais ainda, o complexo *2-PAM/GA*.

Por não haver programas que calculem o pKa de prótons não polarizáveis, a fim de complementar resultados, o pKa do próton ligado ao grupo metila da pralidoxima complexada ao *GA* foi estimado, relacionando-se o pKa com calores de reação, através de regra de três simples, de acordo com procedimento a seguir:

1) Calcularam-se os calores de formação das reações abaixo, utilizando o método RM1.



Assim, os calores de reação das reações 1 e 2 foram, respectivamente, -195,87 kcal/mol e -183,26 kcal/mol.

2) Relacionou-se o calor de formação da 2-PAM com seu pKa experimental e o calor de formação do complexo 2-PAM/GA com o pKa a ser encontrado por regra de três simples.

$$\begin{array}{lcl} -195,87 \text{ kcal/mol} & \longrightarrow & 7,68 \\ -183,26 \text{ kcal/mol} & \longrightarrow & \text{pKa}_{(2\text{-PAM/GA})} \end{array}$$

Daí, obtém-se, $\text{pKa}_{(2\text{-PAM/GA})} = 8,19$

Assim, com esse valor de pKa estimado, foi possível mostrar que a reação de protonação da His447 pelo hidrogênio metílico da 2-PAM é viável, pois o pKa da His447 é 4,14, em pH 7,4.

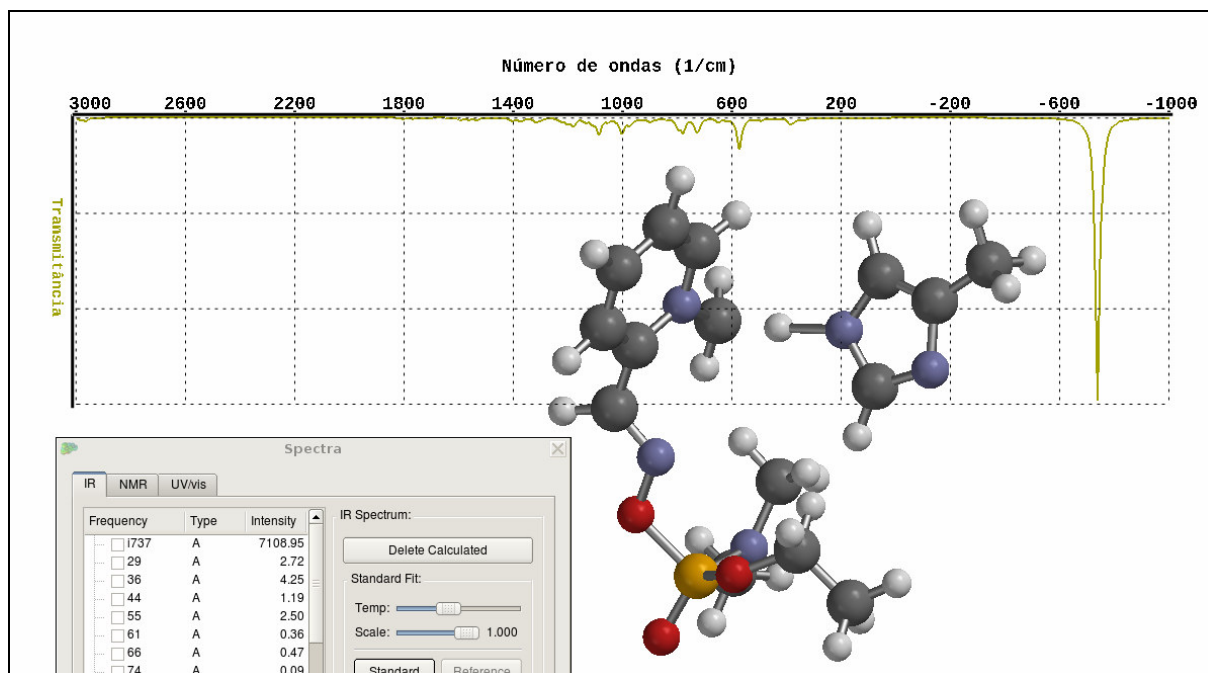


Figura 3.39. Espectro no infravermelho para a ultima etapa de reação, usando o método RM1.

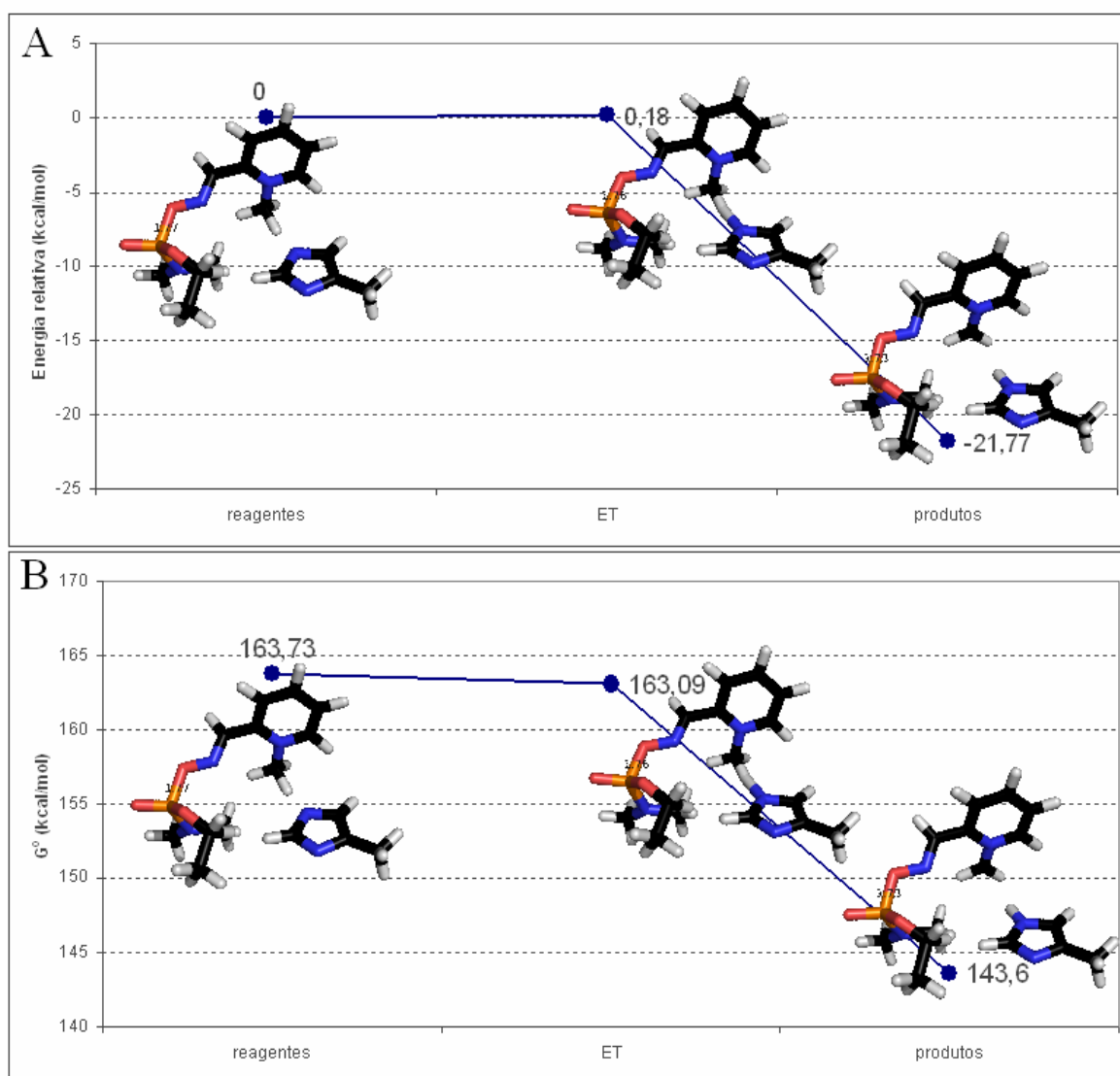


Figura 3.40. (A) Energia relativa e (B) Energia livre padrão dos reagentes, ET e produtos, calculadas por CRI, usando RM1, na ultima etapa de reação.

Com os cálculos das coordenadas de reação intrínseca e dos estados de transição para cada etapa de reação, foi possível mostrar que, além de todas essas reações serem espontâneas, efetivamente ocorrem, pois os possíveis estados de transição obtidos por MQ/MM foram caracterizados como pontos de sela verdadeiros e, todas as quatro etapas das reações ocorreram no sentido dos produtos. Ainda assim todas as frequências imaginárias obtidas foram únicas e intensas em comparação com outras bandas de absorção no infravermelho.

Talvez o único resultado que poderia, em princípio, gerar críticas pela comunidade científica foi um resultado não esperado que ocorreu espontaneamente, na última etapa de reação, ou seja, um grupo metil doando um hidrogênio para uma histidina, porém, o cálculo estimado do pKa desta reação foi feito, mostrando que essa reação, em particular, é possível. Além do mais, já é relatado há algumas décadas na literatura a existência de um reagente estável e muito reativo, conhecido como Ilídeo (SOLOMONS, 1996), cujo anel é muito semelhante ao anel do complexo *2-PAM/GA* sem um hidrogênio metílico.

Um outro problema que também poderia gerar discussão pela comunidade científica é o uso de métodos semi-empíricos para a obtenção de estados de transição e cálculos de coordenada de reação intrínseca, porém, Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES *et al.*, 2009b) já fizeram esta comparação em um trabalho recente, onde mostraram que um mesmo estado de transição obtido, usando os métodos semi-empíricos RM1 e PM6, era também obtido usando um método mais robusto como o DFT/B3LYP 6-31G(d,p).

Finalmente, juntando-se as informações obtidas a partir da dinâmica molecular híbrida e da caracterização dos estados de transição como pontos de sela verdadeiros, foi possível propor etapas de reação viáveis de reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico tabun.

4 CONCLUSÕES

Ao utilizar como condições de partida as coordenadas do modelo da acetilcolinesterase humana inibida por tabun, já proposto por nosso grupo de pesquisa (GONÇALVES et al., 2006), aumentando-se o tempo de simulação de um nanossegundo para 6,5 nanossegundos, o modelo se apresentou estável ao longo do tempo simulado e, a pralidoxima, em uma das simulações foi capaz de entrar no sítio ativo da enzima enquanto na outra, permaneceu praticamente durante todo o intervalo de tempo, estabilizada e próxima da tríade catalítica da enzima, mostrando que a Dinâmica Molecular clássica foi uma boa ferramenta computacional para prever energias envolvidas além das interações entre o substrato e enzima inibida.

O pacote computacional híbrido GROMACS/MOPAC com o método RM1, implementado nesse trabalho, tornou possível se atingir um mínimo de energia com um número menor de passos e o uso de até 500 átomos quânticos no sistema, além de se mostrar satisfatório na descrição das energias envolvidas em cada uma das etapas referentes ao mecanismo de reativação da *HuAChE*.

Com o uso da dinâmica molecular híbrida foi possível estudar quebra e formação de ligações químicas, ou seja, propor reações químicas que ocorrem em um meio enzimático, o que não seria possível se fosse usada somente a Dinâmica Molecular clássica.

A caracterização, dos possíveis estados de transição sugeridos por MQ/MM, utilizando o método semi-empírico RM1 e a coordenada de reação intrínseca, como pontos de sela verdadeiros se mostrou satisfatória e foi capaz de mostrar conexão entre os reagentes, estados de transição e produtos em cada etapa da reação de

reativação da *HuAChE*, possibilitando a proposta de uma via de reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados neurotóxicos.

Como continuação deste trabalho, são sugeridos os seguintes estudos:

- Utilização das informações obtidas neste trabalho para o projeto de novos potenciais reativadores da acetilcolinesterase inibida por organofosforados neurotóxicos.
- Estudo por dinâmica molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por outros organofosforados, utilizando como fármacos, outras oximas, preferencialmente aquelas com mais de uma carga positiva.
- Estudo por dinâmica molecular de oximas fosforiladas, dentro do canal do sítio ativo da acetilcolinesterase humana.
- Aplicação da Dinâmica Molecular híbrida MQ/MM, usando o pacote computacional GROMACS/MOPAC com RM1, no estudo da inibição de outras proteases, como a protease do HIV e, no projeto racional de novos potenciais fármacos utilizados em doenças negligenciáveis, como a malária e a doença de chagas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F. R.; ARACAVA, Y.; FAWCETT, W. P.; OLIVEIRA, M.; RANDALL, W. R.; HAMILTON, T. A.; KAN, R. K.; JR, J. A. R. AND ADLER, M. **Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents**. PNAS (2006).
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of liquids**; Clarendon Press, Oxford (1987).
- ATKINS, P. W.; FRIEDMAN, R. S. **Molecular Quantum Mechanics**. 3^a edição, Oxford University Press, Oxford (1997).
- BAS, D. C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. **"Very Fast Prediction and Rationalization of pKa Values for Protein-Ligand Complexes"** Proteins, 73, 765-783(2008).
- BALLANTYNE, B., BISMUTH, C. & HALL, A. H. Cyanides: chemical warfare agents and potential terrorist threats. In: MARRS, T. C., MAYNARD, R. L. & SIDELL, F. R. (ed.). **Chemical warfare agents – toxicology and treatment**. 2. Ed. West Sussex, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, p. 495-542 (2007).
- BECKE, A. D. **Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior**. Physical Review A, Vol. 38, p. 3098-3100 (1988).
- BECKE, A. D. **Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange**. J. Chem. Phys. 98 :7 (1993).
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN GUNSTEREN, W. F. **Practical algorithms for dynamic simulations**. In **Molecular Dynamics Simulation of Statistical Mechanical Systems**, Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi", Ed. By Ciccotti G. & Hoover H. G., North-Holland Phys. Publishing, Amsterdam (1986).
- BLACK, R. M.; HARRISON, J. M. **The Chemistry of Organophosphorus Chemical Warfare Agents**. In HARTLEY, F.R.(ed); **The Chemistry of Organophosphorus Compounds Vol.4 – Ter – and Quinque-valent Phosphorus Acids and Their Derivatives**; p. 781-840; John Wiley & Sons (1996).
- BRENEMANN, C. M.; WIBERG, K. B. J. Comp. Chem 11, 361 (1990).
- BOGGIO-PASQUA, M.; ROBB, M.A.; GROENHOF, G. **Hydrogen bonding controls excited-state decay of the Photoactive Yellow Protein chromophore**. Journal of the American Chemical Society, 131, 13581-13581 (2009).
- BROOKS, B. R., BRUCCOLERI, R. E., OLAFSON, B. D., STATES, D. J., SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M.; **CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization and Dynamics Calculations.**, Journal of Computational Chemistry, 4:2, 187-217 (1983).

- CASTRO, A. T. **Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurotóxicos**. Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de Engenharia (IME), Rio de Janeiro (2002).
- CLARK. M, R.D.CRAMER III, N.V.OPDENSCH. J.Computacional Chem., 10 982 (1989).
- DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. **Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems**. J. Chem. Phys. 98:10089-10092, 1993.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. (2002).
- DELANO, W. L.; BROMBERG, S. **PyMOL User's Guide**, DeLano Scientific LLC: San Francisco-CA. (2004).
- DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review**. J. Braz. Chem. Soc. 20:3, 407-428. (2009).
- DEPPMEIER; B.J.; DRIESSEN, A.J.; HEHRE, T.S.; HEHRE, W.J.; JOHNSON, J.A.; KLUNZINGER, P.E.; LEONARD, J.M.; PHAM, I.N.; PIETRO, W.J.; JIANGUO, YU; SHAO, Y.; FUSTI-MOLNAR, L.; JUNG, Y.; KUSSMANN, J.; OCHSENFELD, C.; BROWN, S. T.; GILBERT, A. T. B.; SLIPCHENKO, L. V.; LEVCHENKO, S. V.; O'NEILL, D. P.; DISTASIO JR, R. A.; LOCHAN, R. C.; WANG, T.; BERAN, G. J. O.; BESLEY, N. A.; HERBERT, J. M.; LIN, C. Y.; VAN VOORHIS, T.; CHIEN, S. H.; SODT, A.; STEELE, R. P.; RASSOLOV, V. A.; MASLEN, P. E.; KORAMBATH, P. P.; ADAMSON, R. D.; AUSTIN, B.; BAKER, J.; BYRD, E. F. C.; DACHSEL, H.; DOERKSEN, R. J.; DREUW, A.; DUNIETZ, B. D.; DUTOI, A. D.; FURLANI, T. R.; GWALTNEY, S. R.; HEYDEN, A.; HIRATA, S.; HSU, C.P.; KEDZIORA, G.; KHALLIULIN, R. Z.; KLUNZINGER, P.; LEE, A. M.; LEE, M. S.; LIANG, W.; LOTAN, I.; NAIR, N.; PETERS, B.; PROYNOV, E. I.; PIENIAZEK, P. A.; RHEE, Y. M.; RITCHIE, J.; ROSTA, E.; SHERRILL, C. D.; SIMMONETT, A. C.; SUBOTNIK, J. E.; WOODCOCK III, H. L.; ZHANG, W.; BELL, A. T.; CHAKRABORTY, A. K.; CHIPMAN, D. M.; KEIL, F. J.; WARSH, A.; HEHRE, W. J.; SCHAEFER III, H. F.; KONG, J.; KRYLOV, A. I.; GILL, P. M. W.; HEAD-GORDON, M. **SPARTAN '08 build 130int9e**. Wavefunction Inc. Copyright © 1995 - 2008 (2008).
- DONNINI, S.; GROENHOF, G.; WIERINGA, R.K.; JUFFER, A.H.. **The Planar Conformation of a Strained Proline Ring: a QM/MM Study**. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 64 (2006), 700-710.
- EDDLESTON M.; L. SZINICZ.; P. EYER.; N. BUCKLEY. **Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials**. QJ Med 95:275-283 (2002).
- EKSTRÖM, F., AKFUR, C., TUNEMALM, A.-K. & LUNDBERG, S. **Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the cristal structure of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase**. Biochemistry, Vol. 45, p. 74-81 (2006).

-EKSTRÖM, F., PANG, Y.-P., BOMAN, M., ARTURSSON, E., AKFUR, C. & BÖRJEGREN, S. **Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates.** Biochemical Pharmacology, Vol. 72, p. 597-607 (2006a).

-ESSMANN, U., PERERA, L., BERKOWITZ, M. L., DARDEN, T., LEE, H., PEDERSEN, L. G. **A smooth particle mesh ewald potential.** J. Chem. Phys. 103:8577-8592 (1995).

-EYER, P. A. & WOREK, F. Oximes. In: MARRS, T. C., MAYNARD, R. L. & SIDELL, F. R. (ed.). **Chemical warfare agents – toxicology and treatment.** 2. Ed. West Sussex, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, p. 305-329 (2007).

-FRANZ W.; HORST T.; LADISLAUS S.; PETER E. **Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes.** Biochemical Pharmacology 68, 2237-2248 (2004).

-FRANZ WOREK; HORST THIERMANN; LADISLAUS SZINICZ; PETER EYER. **Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes.** Biochemical Pharmacology 68 2237-2248 (2004).

-FROESE, R. D. J., MOROKUMA, K. **The IMOMO and IMOMM methods for excited states. A study of the adiabatic $S_0 \rightarrow T_{1,2}$ excitation energies of cyclic alkenes and enones.** Chemical Physics Letters 263, 393-400 (1996).

- FUKUI, K. **The path of chemical reactions – the IRC approach.** Accounts of Chemical Research. Vol. 14(12), p. 363-368 (1981).

-GIACOBINI, E. **Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives.** Pharmacological Research, Vol. 50, p. 433-440 (2004).

-GOGONEA, V. **The QM/MM Method. An Overview.** Internet Electronic Journal of Molecular Design, 1, 173–184 (2002).

-GOLDSTEIN, H.; **Classical Mechanics**, 2nd ed, Addison-Wesley, London (1980).

-GONÇALVES, A. S.; FRANÇA, T. C. C.; SILVA, A. W. S.; VILLAR, J. D. F. **Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun.** J. Braz. Chem. Soc., v. 17:5, 968-975 (2006).

-GONÇALVES, A. S.; CAFFARENA, E. R. ; PASCUTTI, P. G. **Dissociation of Molecular Aggregates under High Hydrostatic Pressure: The Influence of Water Structure on Benzene Cluster Solubility.** J. Braz. Chem. Soc., v.20:7, 1227-1234 (2009a).

-GONÇALVES, A. S.; FRANÇA, T. C. C.; VILLAR, J. D. F.; PASCUTTI, P. G. **Conformational Analysis of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 using PM6 and RM1 Methods**. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-6 (2009b).

-GRAY, A. P. **Design and structure-activity relationships of antidotes to organophosphorus anticholinesterase agents**. Drug Metabolism Reviews 15(3), 557-589 (1984).

-GROENHOF, G.; SCHAEFER, L.V.; BOGGIO-PASQUA, M.; GRUBMUELLER, H.; ROBB, M.A. **Arginine52 controls the photoisomerization process in photoactive yellow protein**. Journal of the American Chemical Society, 130, 3250-3251 (2008).

-GURNEY, R. W. **Electrolytes and electrolysis**. Reports on Progress in Physics (1937).

-HALGREN, T.A., J.Computacional Chem., 17, 490(1996).

-HASSINEN, T. and PERÄKYLÄ, M. **"New Energy Terms for Reduced Protein Models Implemented in an Off-Lattice Force Field."** J. Comput Chem. 22, 1229-1242 (2001).

-HEHRE, WARREN J., YU JIANGUO, KLUNZINGER, PHILIP E., LOU LIANG. **A Brief Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations**. Wavefunction, Inc Editora (1998).

-HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL E. **GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation**. J. Chem. Theor. Comp. 4 pp. 0 (2008).

-HIGGINS, D., TAYLOR, W.; **Bioinformatics Sequence, structure and databanks**, Oxford University Press (2001).

-HOHENBERG, P., KOHN, W. Phys. Rev. 136:B864 (1964).

-HORNBERG, A.; TUNEMALM, A. K. AND EKSTROM F. **Crystal Structures of Acetylcholinesterase in Complex with Organophosphorus Compounds Suggest that the Acyl Pocket Modulates the Aging Reaction by Precluding the Formation of the Trigonal Bipyramidal Transition State**. Biochemistry, 46, 4815-4825 (2007).

-HUMPHREY, W.; DALKE, A. and SCHULTEN, K. **'VMD – Visual Molecular Dynamics'**. J. Molec. Graphics, 14.1, 33-38 (1996).

-ISTVAN J. ENYEDY; IIDIKO M. KOVACH; AKOS BENCSURA. **Molecular dynamics study of active-site interactions with tetracoordinate transients in acetylcholinesterase and its mutants**. Biochem J., 353, 645-653 (2001).

-JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. 2a Ed. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. 599 p. ISBN 13 978-0-480-01186-7 (H/B), 12 978-0-470-01187-4 (P/B) (2007).

-JORGENSEN, W. L., MAXWELL, D. S. & TIRADO-RIVES, J. **Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids**. Journal of American Society. 118: 11225-11236 (1996).

-KAHN, K.; BRUICE, T. C. **Parameterization of OPLS-AA force field for the conformational analysis of macrocyclic polyketides**. J. Comp. Chem. 23 (10) pp. 977-996 (2001).

-KARPLUS, M.; PETSKE, G. A.; **Molecular Dynamics Simulations in Biology**. Nature, 347, 631-639 (1990).

-KOHN, W., SHAM, L.J., Phys. Rev. 140: A1133(1965).

-KRYGER G, HAREL M, GILES K, TOKER L, VELAN B, LAZAR A, KRONMAN C, BARAK D, ARIEL N, SHAFFERMAN A, SILMAN I, SUSSMAN JL. **Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II**. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. Nov; 56 (Pt 11):1385-94 (2000).

-KUCA, K.; CABAL, J.; PATOCKA, J.; KASSA, J. **Synthesis of Bisquaternary Symmetric – χ,δ -Bis(2-Hydroxyiminomethylpyridinium) Alkane Dibromides and Their Reactivation of Cyclosarin-Inhibited Acetylcholinesterase**. Letters in Organic Chemistry, 1, 84-86 (2004).

-LEACH, A. R. **Molecular modelling: principles and applications**. 2a Ed. Essex, UK, Pearson Education Limited. 744 p. ISBN 0-582-38210-6 (2001).

-LEE, C.; YANG, W. and PARR, R. G. Phys. Rev. B 37:785 (1988).

-LI, H.; ROBERTSON, A. D.; JENSEN, J. H. **"Very Fast Empirical Prediction and Interpretation of Protein pKa Values"** Proteins, 61, 704-721(2005).

-MARK E. TUCKERMAN, GLENN J. MARTYNA. **Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications**. J. Phys. Chem. B, 104, 159-178 (2000).

-MARRS, T.C., MAYNARD, R.L.; SIDELL, F.R. **Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment**. John Wiley & Sons (1996).

-MASERAS, F., MOROKUMA, K. **IMOMM: A new integrated ab initio + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states**. J. Comput. Chem. 16(9), 1170-1179 (1995).

-MASKAWA, K. **The Sarin Poisoning Incident in Tokyo Subways**. V International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents, Escocimo, Suécia (1995).

-MAXWELL, D. M.; BRECHT, K. M.; KOPLOVITZ I.; SWEENEY R. E. **Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?** Molecular Toxicology (2006).

-McWEENEY, R.; PEACOCK, T. E. **The Electronic Structure and Spectra of some Nitrogen Heterobenzenes.** Proc. Phys. Soc. A 70 41-50 (1956).

-MORALES, J. H. A.; CONTRERAS, R.; SORIANO A.; TUÑÓN, I.; SILLA, E. **A Computational Study of the Protein-Ligand Interactions in CDK2 Inhibitors: Using QM/MM Interaction Energy as a Predictor of the Biological Activity.** Biophys. J. 92: 430-439 (2007).

-MORALES-ROJAS, H. & MOSS, R. A. **Phosphorolytic reactivity of o-iodosylcarboxylates and related nucleophiles.** Chemical Reviews, Vol. 102, p. 2497-2521 (2002).

-NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. **α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing.** Current Opinion in Structural Biology, 9:6, 732-737 (1999).

-NEUMANN, M. **"Dielectric relaxation in water. Computer simulations with the TIP4P potential"**, J. Chem. Phys. 85, 1567 (1986).

-MORGON, N. H. & CUSTODIO, R. **Revisão: Teoria do Funcional de Densidade.** Química Nova, 18:1 (1995).

-OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. G. **The α/β hydrolase fold.** Protein Eng, 5(3), 197-211(1992).

-ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; ARIEL, N.; SEGALL, Y.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. **Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase.** J-Biol-Chem; Vol 273(31), 19509-17 (1998).

-ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; ARIEL, N.; SEGALL, Y.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. **The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors.** J-Biol-Chem; Vol 271(20), 11953-62 (1996).

-PASCUTTI, P. G. **Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular.** In: Pedro G Pascutti. (Org.). v. 1, p. 1-38 (2002).

-PATRICK, G.L. **An introduction to Medicinal Chemistry.** Second Edition, Oxford New York (2002).

-PENNEY, W. G. **The theory of molecular structure.** Reports on Progress in Physics (1939).

-QUINN, D. M. **Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states.** Chemical Reviews, Vol. 87, p. 955-979 (1987).

-ROCHA G. B.; FREIRE R. O.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. P. **RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I.** Journal of Computational Chemistry 27(10), 1101-1111 (2006).

-SCHAFTENAAR, G. and NOORDIK, J. H., **"Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures"**, J. Comput.-Aided Mol. Design, 14,123-134 (2000).

-SCHMIDT M.W., BALDRIDGE K.K., BOATZ J.A., ELBERT S.T., GORDON M.S., JENSEN J.H., KOSEKI S., MATSUNAGA N., NGUYEN K.A., S.J.SU, WINDUS T.L., AND DUPUIS M. GAMESS version = 3 jul 2003 (R2) from Iowa State University, J.A.Montgomery J.Comput.Chem, 14, 1347-1363 (1993).

-SHAFFERMAN, A., BARAK, D., KAPLAN, D., ORDENTLICH, A., KRONMAN, C. & VELAN, B. **Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center.** Chemico-Biological Interactions, Vol. 157-158, p. 123-131 (2005).

-SHIH, J. H. and CHEN, C. L. **Molecular Dynamics Simulation of Bisphenol A Polycarbonate.** Macromolecules 28, 4509-4515 (1995).

-SIDELL, F.R.; BORAK, J. **Chemical warfare agents: II. Nerve agents.** Annals of Emergency Medicine, 21, 865-871 (1992).

-SIDELL, F.R.; TAKAFUJI, E.T., FRANZ, D.R. (ed.) **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine.** Office of the Surgeon General, US Army, Washington D.C., pp 129-179 (1997).

-SILVA, M. L. ; GONÇALVES, A. S.; BATISTA, P. R.; VILLAR, J. D. F.; PASCUTTI, P. G.; FRANÇA, T. C. C. **Design, Docking Studies and Molecular Dynamics of New Potential Selective Inhibitors of Plasmodium falciparum Serine Hydroxymethyltransferase.** Molecular Simulation, 1029-0435 (2009).

-SMART, J. K. **History of chemical and biological warfare: an American perspective.** In: SIDELL, F.R., TAKAFUJI, E. T. & FRANZ, D.R. (ed.). Medical aspects of chemical and biological warfare. Textbook of military medicine. Office of the Surgeon General, US Army, Washington D.C., p. 9-86 (1997).

-SMITH, B. M. **Catalytic methods for the destruction of chemical warfare agents under ambient conditions.** Chemical Society Reviews, Vol. 37, p. 470-478 (2008).

-SOLOMONS, T. W. G. Química Orgânica, 6ª edição, volume 2(1996).

-SOMANI, S. M., SOLANA, R. P. & DUBE, S. N. Toxicodynamics of nerve agents. In: SOMANI, S. M. (ed.). Chemical warfare agents. Academic Press Inc., San Diego, p. 68-123 (1992).

-SOREQ,H.E., BEN-AZIZ,R., PRODY,C.A., SEIDMAN,S., GNATT,A., NEVILLE,L., LIEMAN-HURWITZ,J., LEV-LEHMAN,E., GINZBERG,D., LAPIDOT-LIFSON,Y. AND ZAKUT,H. **Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (24), 9688-9692 (1990).

-STEWART, J. J. P. Journal of Computational Chemistry ,12 - 320-341 (1991).

-STEWART, J. J. P. **Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements.** J Mol Model 13:1173-1213 (2007).

-TAYLOR, P; RADIC, Z. **The Cholinesterases: From Genes to Proteins.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 34, 281-320 (1994).

-THE MEDICAL LETTER ON DRUGS AND THERAPEUTICS. **Prevention and treatment of injury from chemical warfare agents.** www.medicalletter.org, 44:1 (2002).

-THE WEDNESDAY REPORT. **Weapons of Mass Destruction. Nerve Agents: Tabun Sarin Soman.** (2007).

-TU, A.T. **Overview of Sarin Terrorist Incidents in Japan in 1994 and 1995.** VI International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents, Estocolmo, Suécia (1998).

-U.S. Fish & Wildlife Service. Office of Migratory Bird Management. IMBD Events and Information Coordinator. 703/358 2318. IMBD@fws.gov. **Pesticides and Birds.** (2000).

-VAN DER SPOEL, A. R. VAN BUUREN, E. APOL, P. J. MEULENHOF, D. P. TIELEMAN, A. L. T. M. SIJBERS, B. HESS, K. A. FEENSTRA, E. LINDAHL, R. VAN DRUNEN AND H. J. C. BERENDSEN. **Gromacs User Manual version 3.1.1,** Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. Internet: www.gromacs.org (2002).

-VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL E.; HESS B.; GROENHOF G.; MARK A. E.; BERENDSEN, H. J. C. : **GROMACS: Fast, Flexible and Free,** J. Comp. Chem. 26 pp. 1701-1718 (2005).

-VAN GUNSTEREN, W. F., BILLETER, S. R., EISING, A. A., HÜNENBERGER, P. H., KRÜGER, P., MARK, A. E., SCOTT, W. R. P., TIRONI, I. G. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide.** Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich (1996).

-VILLAR, J. D. F. *et al.* **Defesa Contra Guerra Química e Biológica.** 1º Seminário Anual de Avaliação do Programa de Apoio ao Ensino e à Pesquisa Científica e Tecnológica sobre Defesa Nacional – PRÓ-DEFESA Seminário de Avaliação do PRÓ-DEFESA. (2006).

- THOM, V., MOROKUMA, K., FARKAS, O., SCHLEGEL, H. B., FRISCH, M. J. **Geometry Optimization with QM/MM, ONION, and Other Combined Methods. I. Microiterations and Constraints.** J Comput Chem 24: 760–769 (2003).

-WARSHEL, A.; LEVITT, M. **Perspective on ``Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme''.** J Mol Biol 103:227-249 (1976).

-WOO, T. K., DENG, M. M. P. L. AND ZIEGLER, T. in **Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanics Methods**, edited by J. Gao and M. Thompson, no. 712 in ACS Symposium Series, p. 128 (1999).

-WOREK, F., KOLLER, M., THIERMANN, H. & SZINICZ, L. **Diagnostic aspects of organophosphate poisoning.** Toxicology, Vol. 214, p. 182-189 (2005).

-WOREK, F., THIERMANN, H., SZINICZ, L. & EYER, P. **Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes.** Biochemical Pharmacology, Vol. 68, p. 237-2248 (2004).

-WORLD HEALTH ORGANIZATION; **United Nations Environmental Program. Public health impact of pesticide used in agriculture.** WHO: Geneva (1990).

-YANG, Y.-C. **Chemical detoxification of nerve agent VX.** Accounts of Chemical Research, Vol. 32, p. 109-115 (1999).

-YANG, Y.-C., BAKER, J. A. & WARD, J. R. **Decontamination of chemical warfare agents.** Chemical Reviews, Vol. 92, p. 1729-1743 (1992).

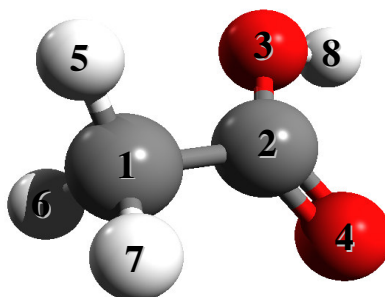
6 APÊNDICES

6.1 APÊNDICE A: Parametrização de Moléculas Desconhecidas

Parametrizar, neste trabalho, é o preparo de arquivos com as topologias para moléculas não contidas no campo de forças OPLSAA incluso no pacote computacional GROMACS.

O procedimento segue o roteiro:

- 1- Desenha-se, por exemplo, o ácido acético, com um editor molecular.
- 2- Sendo a numeração de cada átomo do ácido acético, a ilustrada abaixo:



- 3- Cria-se, com um editor de texto um arquivo com extensão **.top* ou **.itp* (extensões de arquivos de topologias reconhecidos pelo pacote computacional GROMACS 3.3.1), em que neste arquivo adiciona-se o seguinte:

Átomo	Parâmetro	Massa Carga
1	opls_???	12
2	opsl_???	12
3	opls_???	16
4	opsl_???	16
5	opls_???	1
6	opls_???	1
7	opls_???	1
8	opls_???	1

Onde ??? é um valor numérico que varia de átomo para átomo e que chama sub-rotinas com parâmetros e propriedades deste átomo.

- 4- Adiciona-se no arquivo de topologias as ligações, terceiros vizinhos, ângulos, diedros e diedros impróprios formados, respectivamente, entre dois, dois, três, quatro e quatro átomos, como é esquematizado abaixo:

[ligações] ; função

1	2	?
1	5	?
1	6	?
1	7	?
2	3	?
2	4	?
3	8	?

[terc. viz] ; função

1	8	?
3	5	?
3	6	?
3	7	?
4	5	?
4	6	?
4	7	?
4	8	?

[ângulos] ; função

1	2	3	?
1	2	4	?
2	1	5	?
2	1	6	?
2	1	7	?
2	3	8	?
3	2	4	?

[diedros próprios] ; função

1	2	3	8	?
3	2	1	5	?
3	2	1	6	?
3	2	1	7	?
4	2	1	5	?
4	2	1	6	?
4	2	1	7	?
4	2	3	8	?

[diedros impróprios] ; função

1	5	6	7	?
2	1	4	3	?

SUPÉRFLUO

NÃO

6.2 APÊNDICE B: Programas do Pacote GROMACS 3.3.1

A seguir são apresentados os programas executáveis do pacote GROMACS 3.3.1 utilizados para gerar os arquivos de entrada, executar os cálculos de minimização de energia e de dinâmica molecular e extrair informações dos arquivos de saída para posterior análise.

B.1 CONSTRUÇÃO DOS ARQUIVOS ENTRADA

Para a construção dos arquivos entrada, foi necessário somente o arquivo *HuAChE-GA.pdb*, contendo as coordenadas tridimensionais da proteína com o resíduo GA ligado covalentemente ao aminoácido Ser203. A seqüência de programas utilizados foi a seguinte:

```
pdb2gmx -f HuAChE-GA.pdb -o sistema.gro -p sistema.top
editconf -bt cubic -f sistema.gro -o sistema.gro -c -d 1.0
genbox -cp sistema.gro -cs tip4p.gro -o sistema_stpr.gro -p sistema.top
make_ndx -f sistema_stpr.tpr
```

O programa “pdb2gmx” converte o arquivo *.pdb* da proteína no arquivo *sistema.gro*, contendo as coordenadas da proteína e do GA no formato que o pacote GROMACS 3.3.1 reconhece, e no arquivo *sistema.top* contendo os dados de topologia da *HuAChE-GA*;

O programa “editconf” gera em torno da proteína, já com o resíduo GA incluído, uma caixa de tamanho adequado ao volume da mesma;

O programa “genbox” solvata o sistema, isto é, introduz nesta caixa as moléculas do solvente;

O programa “make_ndx” é utilizado para criar os grupos dentro do sistema para posterior análise ex: grupo *proteína* (já com o GA incluído) e a *2-PAM*.

B.1.1 Incluindo os Arquivos Correspondentes a 2-PAM no Sistema *HuAChE-GA*

Os arquivos *2-PAM.itp*, *2-PAM.gro* gerados pelo servidor PRODRG e já com as cargas corrigidas por métodos quânticos, foram incluídos no sistema segundo o procedimento:

- 1- Editar os arquivos *sistema.gro* e *2-PAM.gro*.
- 2- Copiar e colar as coordenadas da *2-PAM* no final do arquivo *sistema.gro*.
- 3- Executar *editconf* para acertar a numeração.
- 4- Corrigir o número total de átomos no topo do arquivo *sistema.gro*.
- 5- Editar o arquivo *sistema.top*.
- 6- Querendo-se simular, por exemplo, o sistema com a *2-PAM*, acrescentar “*#include 2-PAM.itp*” abaixo da linha “*Include topologies*”.
- 7- Acrescentar na última linha do arquivo os nomes e a quantidade de moléculas adicionadas de cada espécie (o mesmo nome deve constar do arquivo de topologia).

B.1.2 Inserindo Íons para Equilibrar a Carga do Sistema

Como o sistema estudado não apresenta carga líquida zero, foi necessário incluir íons para equilibrar as cargas. Para a *HuAChE*, que apresentou cargas negativas, foram adicionados íons Na^+ . Estes íons foram inseridos no sistema segundo o procedimento descrito abaixo:

- 1- Editar o arquivo de topologias, *sistema.top*.
- 2- Digitar o nome e o número de íons que se deseja colocar, abaixo da linha “[*Molecules*]”.
- 3- Executar o programa *genion* para gerar os íons.

```
genion -s sistema_stpr.tpr -o sistema_ion.gro -np "número de cátions" -pname "nome do cátion" -pq "carga do cátion"
```
- 4- Na opção “*Select a group*”, selecionar sempre o grupo correspondente ao solvente.
- 5- Subtrair no arquivo *.top*, abaixo da linha “[*Molecules*]”, o número de moléculas do íon adicionado do número de moléculas do solvente.

B.2 MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA E DINÂMICA MOLECULAR

Uma vez construídos os arquivos de entrada, a próxima etapa foi a execução dos programas para a minimização de energia e simulação de dinâmica molecular. A seqüência de programas utilizados foi a seguinte:

Para a minimização de energia:

```
grompp -s stpr.mdp -c sistema_ion.gro -p sistema.top -o sistema_stpr.tpr
mdrun -v -s sistema_stpr.tpr -o sistema_stpr.trr -c sistema_stpr.gro -g
stprlog>&stpr.job&
```

```
grompp -s st.mdp -c sistema_stpr.gro -p sistema.top -o sistema_st.tpr
mdrun -v -s sistema_st.tpr -o sistema_st.trr -c sistema_st.gro -g stlog>&st.job&
```

```
grompp -s cg.mdp -c sistema_st.gro -p sistema.top -o sistema_cg.tpr
mdrun -v -s sistema_cg.tpr -o sistema_cg.trr -c sistema_cg.gro -g cglog>&cg.job&
```

```
grompp -s lbfgs.mdp -c sistema_cg.gro -p sistema.top -o sistema_lbfgs.tpr
mdrun -v -s sistema_lbfgs.tpr -o sistema_lbfgs.trr -c sistema_lbfgs.gro -g
lbfgslog>&lbfgs.job&
```

Para dinâmica com restrição de posição dos átomos pesados:

```
grompp -v -f pr.mdp -c sistema_lbfgs.gro -p sistema.top -o sistema_pr.tpr
mdrun -v -s sistema_pr.tpr -o sistema_pr.trr -c sistema_pr.gro -g prlog>&pr.jog&
```

Para a dinâmica molecular sem restrição:

```
grompp -v -f md.mdp -c sistema_pr.gro -p sistema.top -o sistema_md.tpr
mdrun -v -s sistema_md.tpr -o sistema_md.trr -c sistema_md.gro -g mdlog>&md.job&
```

O programa *grompp* concatena dados dos arquivos de coordenadas (*.gro*), de topologia (*.top*) e de parâmetros (*.mdp*) do sistema em um só arquivo que servirá de arquivo de entrada para a execução dos cálculos que se seguirão.

O programa *mdrun* dá início as simulações e gera os arquivos de saída *.trr* e *.edr*, que contém todos os resultados dos cálculos, os arquivos *.gro* com as coordenadas dos últimos quadros gerados, nas respectivas etapas e os arquivo de *st/pr/mdlog* e *.job* que contém dados referentes ao andamento dos cálculos.

São os arquivos *.mdp* que contém os parâmetros do cálculo a ser realizado e, para cada etapa do cálculo, foi utilizado um arquivo *.mdp* diferente. No item B.4 são apresentados os conteúdos dos arquivos *.mdp* utilizados neste trabalho.

B.3 PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DE RESULTADOS DAS DINÂMICAS

Depois de concluída a dinâmica molecular, foram executados os programas para gerar os gráficos de variação de energia, DRMQ temporal e espacial, número de ligações hidrogênio, distâncias interatômicas e para extrair quadros ao longo da dinâmica. Estes programas são apresentados abaixo:

Para gerar o gráfico de variação de energia total:

```
g_energy -f ener.edr -s sistema_md.tpr -o energia.xvg
```

escolhe-se a opção 12, opção referente ao cálculo de energia total.

Para extrair quadros dos sistemas *HuAChE*-GA com a *2PAM*, *DZP* ou a *DZPanc*:

`make_ndx -f sistema_md.tpr` [usar o h (help) para criar o grupo *2PAM*, *DZP* ou *DZPanc* com o sistema, por exemplo: *2PAM/sistema*].

```
trjconv -fit progressive -n index.ndx -f sistema_md.trr (ou traj.xtc) -s
sistema_md.tpr -o sistema.pdb -b t0 -e tf
```

Em que t_0 é o quadro no tempo t_0 ps e t_f o quadro no tempo t_f ps, ou seja, extraem-se as coordenadas indo do quadro t_0 a t_f ps.

A opção *-fit progressive* ajusta os quadros progressivamente ao longo da dinâmica. Isso evita distorções que podem ser provocadas pelo possível deslocamento do sistema dentro da caixa d'água.

Para gerar os gráficos de DRMQ temporal e FDRMQ:

Cria-se primeiro os grupos que se quer analisar com `make_ndx`:

```
make_ndx -f sistema_md.tpr
```

DRMQ temporal:

```
g_rms -n index.ndx -s sistema_md.tpr -f sistema_md.trr -o DRMQtemp.xvg -prev 1
```

FDRMQ:

```
g_rmsf -n index.ndx -s sistema_md.tpr -f sistema_md.trr -o DRMQesp.xvg -res
```

Para gerar os gráficos de distâncias interatômicas:

Criar grupos de pares de átomos com `make_ndx`:

```
make_ndx -f sistema_md.tpr
```

Selecionam-se os átomos da seguinte forma:

an <ENTER> ,

para tantos átomos quantos forem necessários para a análise, onde **n** é o número do átomo que pode ser encontrado no arquivo *sistema_md.gro*.

Executar o programa `g_dist`:

```
g_dist -f traj.xtc -s sistema_md.tpr -n index.ndx -o distancia.xvg
```

Escolhe-se então, os pares criados anteriormente pelo *make_ndx* para cada distância interatômica a ser calculada.

Analisa-se o arquivo .xvg com o programa XMGRACE.

Para gerar os gráficos de número de ligações hidrogênio:

Cria-se os grupos a serem analisados com *make_ndx*:

```
make_ndx -f sistema_md.tpr
```

Executa-se o programa *g_hbond* da seguinte forma:

```
g_hbond -f traj.xtc -s sistema_md.tpr -n index.ndx -num NumLigH.xvg , onde
```

NumLigH.xvg é o arquivo que contem o número de ligações hidrogênio formadas em função do tempo de simulação.

Todos os arquivos com extensão .xvg contidos neste trabalho, foram visualmente analisados pelo programa XMGRACE e melhorados no programa CALC, incluso no pacote OPENOFFICE.

B.4 CONTEÚDO DOS ARQUIVOS DE PARÂMETROS .MDP

stpr.mdp:

```
title           = min_steepest_descent_PR
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE -DPOSRES
constraints     = none
integrator      = steep
nsteps          = 20000
nstlist         = 10
ns_type         = grid
rlist           = 1.0
pbc             = xyz
coulombtype     = PME
rcoulomb        = 1.0
epsilon-r       = 1
vdw-type        = Cut-off
rvdw            = 1.0
emtoll          = 209.2
emstep          = 0.01
fourierspacing  = 0.12
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-5
optimize_fft    = yes
```

st.mdp:

```

title           = min_steepest_descent
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = none
integrator      = steep
nsteps          = 20000
nstlist         = 10
ns_type         = grid
rlist           = 1.0
pbc             = xyz
coulombtype     = PME
rcoulomb        = 1.0
epsilon-r       = 1.0 ;1 for CUTOFF, PME and SWITCH and, 54 for
REACTIONFIELD
vdw-type        = Cut-off
rvdw            = 1.0
emtol           = 104.6
emstep          = 0.01
ewald_rtol      = 1e-5
optimize_fft    = yes

```

cg.mdp:

```

title           = min cg
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = none
integrator      = cg
nsteps          = 20000
nstlist         = 10
ns_type         = grid
nstcgsteep      = 100
rlist           = 1.0
pbc             = xyz
coulombtype     = PME
rcoulomb        = 1.0
vdw-type        = Cut-off ;Switch
rvdw            = 1.0
emtol           = 41.84
emstep          = 0.01
ewald_rtol      = 1e-5
optimize_fft    = yes

```

lbfgs.mdp:

```

title           = min_steepest_descent
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = none
integrator      = l-bfgs ;steep
nsteps          = 20000
nstlist         = 10
ns_type         = grid
rlist           = 1.0
pbc             = xyz

```

```

coulombtype      = PME
rcoulomb         = 1.0
epsilon-r        = 1.0 ;1 for CUTOFF, PME and SWITCH and, 54 for
REACTIONFIELD
vdw-type         = Cut-off
rvdw            = 1.0
emtol           = 41.84
emstep          = 0.01
ewald_rtol       = 1e-5
optimize_fft     = yes

```

pr.mdp:

```

title           = 500ps_pr_fixo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DPOSRES
integrator      = md
tinit          = 0
dt             = 0.002
nsteps         = 250000 ; total 500 ps
comm-mode      = Linear
nstcomm        = 1
nstxout        = 500
nstvout        = 20000
nstfout        = 20000
nstlog         = 1000
nstenergy      = 100
nstxtcout      = 500
xtc-precision  = 1000
energygrps     = Protein PAM TAB NA+ SOL
nstlist        = 5
ns_type        = grid
pbc            = xyz
rlist          = 1.0
domain-decomposition = no
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.0
epsilon-r      = 1
vdw-type       = Cut-off
rvdw           = 1.0
DispCorr       = EnerPres
optimize_fft   = yes
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = system
tau-t          = .1
ref-t          = 310
gen_vel        = yes
gen_temp       = 310
gen_seed       = 173529
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = Isotropic
tau-p          = 1
compressibility = 4.5e-5
ref-p          = 1
constraints    = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs
unconstrained-start = no
Shake-SOR      = no
shake-tol      = 1e-04
lincs-order    = 4

```

```

lincs-warnangle      = 30
morse                = no

```

md.mdp:

```

title                = 6.5 ns
cpp                  = /lib/cpp
include              =
define               =
integrator            = md
tinit                = 0
dt                   = 0.002
nsteps               = 3250000 ; 6.5 ns
comm-mode            = Linear
nstcomm              = 1
nstxout               = 50000 ; trr
nstvout               = 50000 ; velocidades
nstfout              = 50000 ; forcas
nstlog               = 1000
nstenergy            = 100
nstxtcout            = 10000 ; xtc
xtc-precision        = 1000
energygrps           = TAB PAM NA+ Protein SOL
nstlist              = 5
ns_type              = grid
pbc                  = xyz
rlist                = 1.0
domain-decomposition = no
coulombtype          = PME
rcoulomb             = 1.0
epsilon-r            = 1
vdw-type             = Cut-off
rvdw                 = 1.0
DispCorr             = EnerPres
optimize_fft         = yes
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = System
tau-t                = .1
ref-t                = 310
gen_vel              = no
gen_temp             = 310
gen_seed             = 173529
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = Isotropic
tau-p                = 1
compressibility       = 4.5e-5
ref-p                = 1
constraints           = all-bonds
constraint-algorithm  = Lincs
unconstrained-start  = no
Shake-SOR            = no
shake-tol            = 1e-04
lincs-order          = 4
lincs-warnangle      = 30
morse                = no

```

6.3 APÊNDICE C: Compilando o GROMACS 3.3.1 com o MOPAC 7

Neste apêndice é descrito, minuciosamente, como compilar o pacote computacional GROMACS com o programa MOPAC, com o objetivo de possibilitar o uso do método híbrido MQ/MM. As etapas seguem abaixo:

1) Descarregar o arquivo compactado ***gromacs-3.3.1.tar.gz*** do endereço eletrônico [<http://www.gromacs.org/content/view/79/98/>].

2) Entrar na pasta onde se encontra o pacote computacional ***gromacs-3.3.1.tar.gz*** e descompactá-lo, a partir de um terminal, usando o seguinte comando:

```
tar xvfz gromacs-3.3.1.tar.gz
```

3) Adquirir do endereço eletrônico [<http://openmopac.net/>] o programa MOPAC versão 7 e descompactá-lo.

4) Colocar os códigos-fonte ***gmxmop.f*** e ***dcart.f***, modificados pelo Dr. Gerrit Groenhof do *Max Planck Institute for biophysical Chemistry*, no subdiretório ***/mopac7/fortan/***. A listagem dos arquivos ***gmxmop.f*** e ***dcart.f*** está no final deste apêndice.

5) Abrir com um editor de textos o arquivo ***/mopac7/fortran/block.f*** e substituir os valores das integrais, do método AM1, referentes aos átomos ***H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br*** e ***I***, pelos valores referentes aos mesmos átomos, presentes no arquivo ***Rm1.rm1***, disponibilizado pelo Dr. Gerd Bruno da Rocha, da Universidade Federal da Paraíba, para que o método RM1 seja usado quando chamarmos o método AM1. A listagem do arquivo ***Rm1.rm1*** se encontra também no final deste apêndice.

6) Compilar todos os arquivos, exceto os arquivos *mopac.f*, *mol.dat.f* e *deriv.f*, que estão na pasta **/mopac7/fortran/**, com o comando:

```
f77 -O2 -c *.f
```

6) A partir dos arquivos objeto (*.o) criados, convertê-los na biblioteca **libmopac.a** da seguinte maneira:

```
ar rcv libmopac.a *.o
```

```
ranlib libmopac.a
```

7) Passar o arquivo **libmopac.a** para a pasta aonde foi descompactado o GROMACS e executar a seguinte seqüência de comandos, como super usuário:

```
./configure CPPFLAGS=-DUSE_MOPAC LIBS=-lmopac LDFLAGS=-L$PWD --with-qmmm-mopac
```

```
make
```

```
make install
```

```
make links
```

```
make distclean
```

LISTAGEM DO CÓDIGO-FONTE DCART.F

```
*****
```

```

      SUBROUTINE DCART (COORD,DXYZ)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
      INCLUDE 'SIZES'
      DIMENSION COORD(3,*), DXYZ(3,*),
      COMMON /MOLKST/ NUMAT,NAT(NUMATM),NFIRST(NUMATM),NMIDDLE(NUMATM),
1          NLAST(NUMATM), NORBS, NELECS,NALPHA,NBETA,
2          NCLOSE,NOPEN,NDUMY,FRACT
      COMMON /DENSTY/ P(MPACK), PA(MPACK), PB(MPACK)
C*****
C
C      DCART CALCULATES THE DERIVATIVES OF THE ENERGY WITH RESPECT TO THE
C          CARTESIAN COORDINATES. THIS IS DONE BY FINITE DIFFERENCES.
C
C      THE MAIN ARRAYS IN DCART ARE:
C          DXYZ      ON EXIT CONTAINS THE CARTESIAN DERIVATIVES.
C
C*****
      COMMON /KEYWRD/ KEYWRD
      COMMON /EULER / TVEC(3,3), ID
      COMMON /MOLMEC/ HTYPE(4),NHCO(4,20),NNHCO,ITYPE
```

```

COMMON /UCELL / L1L,L2L,L3L,L1U,L2U,L3U
COMMON /DCARTC/ K1L,K2L,K3L,K1U,K2U,K3U
COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
C COSMO change
  LOGICAL ISEPS, USEPS, UPDA
  COMMON /ISEPS/ ISEPS, USEPS, UPDA
C end of COSMO change
  CHARACTER*241 KEYWRD
  DIMENSION PDI(171),PADI(171),PBDI(171),
1CDI(3,2),NDI(2),LSTOR1(6), LSTOR2(6), ENG(3)
  LOGICAL DEBUG, FORCE, MAKEP, ANADER, LARGE
  EQUIVALENCE (LSTOR1(1),L1L), (LSTOR2(1), K1L)
  SAVE CHNGE, CHNGE2, ANADER, DEBUG, FORCE
  DATA ICALCN/0/
  DATA CHNGE /1.D-4/
  CHNGE2=CHNGE*0.5D0
*
* CHNGE IS A MACHINE-PRECISION DEPENDENT CONSTANT
* CHNGE2=CHNGE/2
*
  IF (ICALCN.NE.NUMCAL) THEN
    ICALCN=NUMCAL
    LARGE = (INDEX(KEYWRD,'LARGE') .NE. 0)
    ANADER= (INDEX(KEYWRD,'ANALYT') .NE. 0)
    DEBUG = (INDEX(KEYWRD,'DCART') .NE. 0)
    FORCE = (INDEX(KEYWRD,'PREC')+INDEX(KEYWRD,'FORCE') .NE. 0)
  ENDIF
  NCELLS=(L1U-L1L+1)*(L2U-L2L+1)*(L3U-L3L+1)
  DO 10 I=1,6
    LSTOR2(I)=LSTOR1(I)
10 LSTOR1(I)=0
  IOFSET=(NCELLS+1)/2
  NUMTOT=NUMAT*NCELLS
  DO 20 I=1,NUMTOT
    DO 20 J=1,3
20 DXYZ(J,I)=0.D0
  IF(ANADER) REWIND 2
  DO 130 II=1,NUMAT
    III=NCELLS*(II-1)+IOFSET
    IM1=II
    IF=NFIRST(II)
    IM=NMIDDLE(II)
    IL=NLAST(II)
    NDI(2)=NAT(II)
    DO 30 I=1,3
30 CDI(I,2)=COORD(I,II)
    DO 130 JJ=1,IM1
      JJJ=NCELLS*(JJ-1)
C FORM DIATOMIC MATRICES
      JF=NFIRST(JJ)
      JM=NMIDDLE(JJ)
      JL=NLAST(JJ)
C GET FIRST ATOM
      NDI(1)=NAT(JJ)
      MAKEP=.TRUE.
      DO 120 IK=K1L,K1U
        DO 120 JK=K2L,K2U
          DO 120 KL=K3L,K3U
            JJJ=JJJ+1
            KKK=KKK+1
            DO 40 L=1,3

```

```

40      CDI(L,1)=COORD(L,JJ)+TVEC(L,1)*IK+TVEC(L,2)*JK+TVEC
      1(L,3)*KL

      IF(.NOT. MAKEP) GOTO 90
      MAKEP=.FALSE.
      IJ=0
      DO 50 I=JF,JL
        K=I*(I-1)/2+JF-1
        DO 50 J=JF,I
          IJ=IJ+1
          K=K+1
          PADI(IJ)=PA(K)
          PBDI(IJ)=PB(K)
50      PDI(IJ)=P(K)
C GET SECOND ATOM FIRST ATOM INTERSECTION
      DO 80 I=IF,IL
        L=I*(I-1)/2
        K=L+JF-1
        DO 60 J=JF,JL
          IJ=IJ+1
          K=K+1
          PADI(IJ)=PA(K)
          PBDI(IJ)=PB(K)
60      PDI(IJ)=P(K)
        K=L+IF-1
        DO 70 L=IF,I
          K=K+1
          IJ=IJ+1
          PADI(IJ)=PA(K)
          PBDI(IJ)=PB(K)
70      PDI(IJ)=P(K)
80      CONTINUE
90      CONTINUE
      IF(II.EQ.JJ) GOTO 120
      IF(ANADER) THEN
        CALL ANALYT(PDI,PADI,PBDI,CDI,NDI,JF,JL,IF,IL
1,      ENG)
        DO 100 K=1,3
          DXYZ(K,III)=DXYZ(K,III)-ENG(K)
100      DXYZ(K,JJJ)=DXYZ(K,JJJ)+ENG(K)
      ELSE
        IF( .NOT. FORCE) THEN
          CDI(1,1)=CDI(1,1)+CHNGE2
          CDI(2,1)=CDI(2,1)+CHNGE2
          CDI(3,1)=CDI(3,1)+CHNGE2
          CALL DHC(PDI,PADI,PBDI,CDI,NDI,JF,JM,JL,IF,IM
1,IL,  AA,1)
        ENDIF
        DO 110 K=1,3
          IF( FORCE ) THEN
            CDI(K,2)=CDI(K,2)-CHNGE2
            CALL DHC(PDI,PADI,PBDI,CDI,NDI,JF,JM,JL,IF
1,IM,IL, AA,1)
          ENDIF
          CDI(K,2)=CDI(K,2)+CHNGE
          CALL DHC(PDI,PADI,PBDI,CDI,NDI,JF,JM,JL,IF,IM
1,IL,  EE,2)
          CDI(K,2)=CDI(K,2)-CHNGE2
          IF( .NOT. FORCE) CDI(K,2)=CDI(K,2)-CHNGE2
          DERIV=(AA-EE)*23.061D0/CHNGE
          DXYZ(K,III)=DXYZ(K,III)-DERIV
          DXYZ(K,JJJ)=DXYZ(K,JJJ)+DERIV

```

```

110             CONTINUE
                ENDIF
120         CONTINUE
130     CONTINUE
        IF (NNHCO.NE.0) THEN
C
C     NOW ADD IN MOLECULAR-MECHANICS CORRECTION TO THE H-N-C=O TORSION
C
        DEL=1.D-8
        DO 160 I=1,NNHCO
            DO 150 J=1,4
                DO 140 K=1,3
                    COORD(K,NHCO(J,I))=COORD(K,NHCO(J,I))-DEL
                    CALL DIHED(COORD,NHCO(1,I),NHCO(2,I),NHCO(3,I),NHCO(4,
1I),ANGLE)
                    REFH=HTYPE(ITYPE)*SIN(ANGLE)**2
                    COORD(K,NHCO(J,I))=COORD(K,NHCO(J,I))+DEL*2.D0
                    CALL DIHED(COORD,NHCO(1,I),NHCO(2,I),NHCO(3,I),NHCO(4,
1I),ANGLE)
                    COORD(K,NHCO(J,I))=COORD(K,NHCO(J,I))-DEL
                    HEAT=HTYPE(ITYPE)*SIN(ANGLE)**2
                    SUM=(REFH-HEAT)/(2.D0*DEL)
                    DXYZ(K,NHCO(J,I))=DXYZ(K,NHCO(J,I))-SUM
140             CONTINUE
150         CONTINUE
160     CONTINUE
        ENDIF
C COSMO change A. Klamt
C analytic calculation of the gradient of the dielectric energy A.Klamt
        IF (USEPS) CALL DIEGRD(COORD,DXYZ)
C     DO 170 I=1,6
C 170 LSTOR1(I)=LSTOR2(I)
        IF ( .NOT. DEBUG) RETURN
        IW=6
        WRITE(IW, '(//10X, ''CARTESIAN COORDINATE DERIVATIVES'',//3X,
1 ''NUMBER  ATOM  '',5X, ''X'',12X, ''Y'',12X, ''Z'',/)'')
        IF (NCELLS.EQ.1) THEN
            WRITE(IW, '(2I6,F13.6,2F13.6)')
1 (I,NAT(I), (DXYZ(J,I),J=1,3), I=1, NUMTOT)
        ELSEIF (LARGE) THEN
            WRITE(IW, '(2I6,F13.6,2F13.6)')
1 (I,NAT((I-1)/NCELLS+1), (DXYZ(J,I),J=1,3), I=1, NUMTOT)
        ELSE
            WRITE(IW, '(2I6,F13.6,2F13.6)')
1 (I,NAT((I-1)/NCELLS+1), (DXYZ(J,I)+DXYZ(J,I+1)+DXYZ(J,I+2)
2,J=1,3), I=1, NUMTOT,3)
        ENDIF
        IROT=2
        IF (ANADER) REWIND IROT
C end of COSMO (A. Klamt) changes
        IF ( .NOT. DEBUG) RETURN
        WRITE(6, '(//10X, ''CARTESIAN COORDINATE DERIVATIVES'',//3X,
1 ''NUMBER  ATOM  '',5X, ''X'',12X, ''Y'',12X, ''Z'',/)'')
        IF (NCELLS.EQ.1) THEN
            WRITE(6, '(2I6,F13.6,2F13.6)')
1 (I,NAT(I), (DXYZ(J,I),J=1,3), I=1, NUMTOT)
        ELSEIF (LARGE) THEN
            WRITE(6, '(2I6,F13.6,2F13.6)')
1 (I,NAT((I-1)/NCELLS+1), (DXYZ(J,I),J=1,3), I=1, NUMTOT)
        ELSE
            WRITE(6, '(2I6,F13.6,2F13.6)')

```

```

1  (I,NAT((I-1)/NCELLS+1),(DXYZ(J,I)+DXYZ(J,I+1)+DXYZ(J,I+2)
2,J=1,3),I=1,NUMTOT,3)
ENDIF
IF (ANADER) REWIND 2
RETURN
END
SUBROUTINE DHC (P,PA,PB,XI,NAT,IF,IM,IL,JF,JM,JL,DENER,MODE)
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
DIMENSION P(*), PA(*), PB(*)
DIMENSION XI(3,*),NFIRST(2),NMIDDLE(2),NLAST(2),NAT(*)
C*****
C  DHC CALCULATES THE ENERGY CONTRIBUTIONS FROM THOSE PAIRS OF ATOMS
C      THAT HAVE BEEN MOVED BY SUBROUTINE DERIV.
C*****
COMMON /KEYWRD/ KEYWRD
1  /ONELEC/ USS(107),UPP(107),UDD(107)
COMMON /EULER / TVEC(3,3), ID
COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
SAVE ICALCN, WLIM, UHF
CHARACTER*241 KEYWRD
LOGICAL UHF, CUTOFF
DIMENSION H(171), SHMAT(9,9), F(171),
1  WJ(100), E1B(10), E2A(10), WK(100), W(100),
2  WJS(100), WKS(100)
DOUBLE PRECISION WJS, WKS
DATA ICALCN /0/
IF( ICALCN.NE.NUMCAL) THEN
    ICALCN=NUMCAL
    WLIM=4.D0
    IF(ID.EQ.0)WLIM=0.D0
    UHF=(INDEX(KEYWRD,'UHF') .NE. 0)
ENDIF
NFIRST(1)=1
NMIDDLE(1)=IM-IF+1
NLASt(1)=IL-IF+1
NFIRST(2)=NLASt(1)+1
NMIDDLE(2)=NFIRST(2)+JM-JF
NLASt(2)=NFIRST(2)+JL-JF
LINEAR=(NLASt(2)*(NLASt(2)+1))/2
DO 10 I=1,LINEAR
    F(I)=0.D0
10 H(I)=0.0D00
DO 20 I=1,LINEAR
20 F(I)=H(I)
    JA=NFIRST(2)
    JB=NLASt(2)
    JC=NMIDDLE(2)
    IA=NFIRST(1)
    IB=NLASt(1)
    IC=NMIDDLE(1)
    J=2
    I=1
    NJ=NAT(2)
    NI=NAT(1)
    CALL H1ELEC(NI,NJ,XI(1,1),XI(1,2),SHMAT)
    IF(NAT(1).EQ.102.OR.NAT(2).EQ.102) THEN
        K=(JB*(JB+1))/2
        DO 30 J=1,K
30 H(J)=0.D0
    ELSE
        J1=0

```

```

DO 40 J=JA,JB
  JJ=J*(J-1)/2
  J1=J1+1
  I1=0
  DO 40 I=IA,IB
    JJ=JJ+1
    I1=I1+1
    H(JJ)=SHMAT(I1,J1)
    F(JJ)=SHMAT(I1,J1)
40  CONTINUE
  ENDIF
  KR=1
  IF(ID.EQ.0) THEN
    CALL ROTATE (NJ,NI,XI(1,2),XI(1,1),W(KR),KR,E2A,E1B,ENUCLR,100.
1D0)
  ELSE
    CALL SOLROT (NJ,NI,XI(1,2),XI(1,1),WJ,WK,KR,E2A,E1B,ENUCLR,100.
1D0)
    IF(MODE.EQ.1) CUTOFF=(WJ(1).LT.WLIM)
    IF(CUTOFF) THEN
      DO 50 I=1,KR-1
50    WK(I)=0.D0
      ENDIF
      DO 60 I=1,KR-1
        WJS(I)=WJ(I)
        WKS(I)=WK(I)
60    CONTINUE
      ENDIF
C
C    * ENUCLR IS SUMMED OVER CORE-CORE REPULSION INTEGRALS.
C
      I2=0
      DO 70 I1=IA,IC
        II=I1*(I1-1)/2+IA-1
        DO 70 J1=IA,I1
          II=II+1
          I2=I2+1
          H(II)=H(II)+E1B(I2)
70    F(II)=F(II)+E1B(I2)
      DO 80 I1=IC+1,IB
        II=(I1*(I1+1))/2
        F(II)=F(II)+E1B(1)
80    H(II)=H(II)+E1B(1)
      I2=0
      DO 90 I1=JA,JC
        II=I1*(I1-1)/2+JA-1
        DO 90 J1=JA,I1
          II=II+1
          I2=I2+1
          H(II)=H(II)+E2A(I2)
90    F(II)=F(II)+E2A(I2)
      DO 100 I1=JC+1,JB
        II=(I1*(I1+1))/2
        F(II)=F(II)+E2A(1)
100   H(II)=H(II)+E2A(1)
      CALL FOCK2(F,P,PA,W, WJS, WKS,2,NAT,NFIRST,NMIDDLE,NLAST)
      EE=HELECT(NLAST(2),PA,H,F)
      IF( UHF ) THEN
        DO 110 I=1,LINEAR
110    F(I)=H(I)
        CALL FOCK2(F,P,PB,W, WJS, WKS,2,NAT,NFIRST,NMIDDLE,NLAST)

```

```

      EE=EE+HELECT(NLAST(2),PB,H,F)
    ELSE
      EE=EE*2.D0
    ENDIF
    DENER=EE+ENUCLR
    RETURN
  C
END

```

LISTAGEM DO CÓDIGO-FONTE GMXMOP.F

```

SUBROUTINE donhco(coord)
  IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
  INCLUDE 'SIZES'
  C
  C      Notice of Public Domain nature of MOPAC
  C
  C      'This computer program is a work of the United States
  C      Government and as such is not subject to protection by
  C      copyright (17 U.S.C. # 105.) Any person who fraudulently
  C      places a copyright notice or does any other act contrary
  C      to the provisions of 17 U.S. Code 506(c) shall be subject
  C      to the penalties provided therein. This notice shall not
  C      be altered or removed from this software and is to be on
  C      all reproductions.'
  C
  COMMON /GEOKST/ NATOMS,LABELS(NUMATM),
1      NA(NUMATM),NB(NUMATM),NC(NUMATM)
  COMMON /MOLMEC/ HTYPE(4),NHCO(4,20),NNHCO,ITYPE
  COMMON /MOLKST/ NUMAT,NAT(NUMATM),NFIRST(NUMATM),NMIDDLE(NUMATM),
1      NLAST(NUMATM),NORBS,NELECS,NALPHA,NBETA,
2      NCLOSE,NOPEN,NDUMY,FRACT
3      /KEYWRD/ KEYWRD
4      /NATORB/ NATORB(107)
  COMMON /CORE / CORE(107)
1      /BETAS / BETAS(107),BETAP(107),BETAD(107)
2      /MOLORB/ USPD(MAXORB),PSPD(MAXORB)
3      /VSIPS / VS(107),VP(107),VD(107)
4      /ONELEC/ USS(107),UPP(107),UDD(107)
  COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
1      /POLVOL/ POLVOL(107)
2      /MULTIP/ DD(107),QQ(107),AM(107),AD(107),AQ(107)
3      /TWOELE/ GSS(107),GSP(107),GPP(107),GP2(107),HSP(107)
4      ,GSD(107),GPD(107),GDD(107)
5      /IDEAA / GUESA1(107,10),GUESA2(107,10),GUESA3(107,10)
6      /IDEAS / GUESS1(107,10),GUESS2(107,10),GUESS3(107,10)
7      /IDEAP / GUESP1(107,10),GUESP2(107,10),GUESP3(107,10)
  COMMON /ALPHA / ALP(107)
1      /REFS/ ALLREF(107,4)
  COMMON /MNDO/ USSM(107),UPPM(107),UDDM(107),ZSM(107),
1ZPM(107),ZDM(107),BETASM(107),BETAPM(107),BETADM(107),
2ALPM(107),EISOLM(107),DDM(107),QQM(107),AMM(107),
3ADM(107),AQM(107),GSSM(107),GSPM(107),GPPM(107),
4GP2M(107),HSPM(107),POLVOM(107)
  COMMON /PM3 / USSPM3(107),UPPPM3(107),UDDPM3(107),ZSPM3(107),
1ZPPM3(107),ZDPM3(107),BETASP(107),BETAPP(107),BETADP(107),
2ALPPM3(107),EISOLP(107),DDPM3(107),QQPM3(107),AMPM3(107),
3ADPM3(107),AQPM3(107),GSSPM3(107),GSPPM3(107),GPPPM3(107),

```

```

4GP2PM3(107), HSPPM3(107),POLVOP(107)
COMMON /AM1BLO/USSAM1(107), UPPAM1(107), UDDAM1(107), ZSAM1(107),
1ZPAM1(107), ZDAM1(107), BETASA(107), BETAPA(107), BETADA(107),
2ALPAM1(107), EISOLA(107), DDAM1(107), QQAM1(107), AMAM1(107),
3ADAM1(107), AQAM1(107), GSSAM1(107), GSPAM1(107), GPPAM1(107),
4GP2AM1(107), HSPAM1(107),POLVOA(107)
COMMON /GEOM / GEO(3,NUMATM)
PARAMETER (MDUMY=MAXPAR**2-MPACK)
COMMON /SCRACH/ RXYZ(MPACK), XDUMY(MDUMY)
*
* COMMON BLOCKS FOR MINDO/3
*
COMMON /ONELE3 / USS3(18),UPP3(18)
1 /ATOMI3 / EISOL3(18),EHEAT3(18)
2 /EXPON3 / ZS3(18),ZP3(18)
*
* END OF MINDO/3 COMMON BLOCKS
*
COMMON /EXPONT/ ZS(107),ZP(107),ZD(107)
COMMON /ATOMIC/ EISOL(107),EHEAT(107)
DIMENSION COORD(3,NUMATM), ISWAP(2,20), ESTORE(107)
CHARACTER*241 KEYWRD, OLDE(20)*6, ALLREF*80
LOGICAL DEBUG, UHF,EXCI, TRIP, MINDO3, BIRAD, AM1, LPM3,
1LMNDO, HALFE, SLOW
DATA ESTORE(1)/0.D0/
C
C WRITE OUT THE INTERATOMIC DISTANCES
C
C CALL GMETRY(GEO,COORD)
C
RMIN=100.D0
L=0
DO 170 I=1,NUMAT
DO 170 J=1,I
L=L+1
RXYZ(L)=SQRT((COORD(1,I)-COORD(1,J))**2+
1 (COORD(2,I)-COORD(2,J))**2+
2 (COORD(3,I)-COORD(3,J))**2)
IF(RMIN.GT.RXYZ(L) .AND. I .NE. J .AND.
1 (NAT(I).LT.103 .OR. NAT(J).LT.103)) THEN
IMINR=I
JMINR=J
RMIN=RXYZ(L)
ENDIF
170 CONTINUE
C CALL VECPRN(RXYZ,NUMAT)
C
NNHCO=0
C
C SET UP MOLECULAR-MECHANICS CORRECTION TO -(C=O)-(NH)- LINKAGE
C THIS WILL BE USED IF MMOK HAS BEEN SPECIFIED.
C
ITYPE=1
IF(INDEX(KEYWRD,'AM1').NE.0)ITYPE=2
IF(INDEX(KEYWRD,'PM3').NE.0)ITYPE=3
IF(INDEX(KEYWRD,'MINDO').NE.0)ITYPE=4
C
C IDENTIFY O=C-N-H SYSTEMS VIA THE INTERATOMIC DISTANCES MATRIX
C
DO 220 I=1,NUMAT
IF(NAT(I).NE.8) GOTO 220
DO 210 J=1,NUMAT
IF(NAT(J).NE.6) GOTO 210

```

```

      IJ=MAX(I,J)
      JI=I+J-IJ
      IF(RXYZ((IJ*(IJ-1))/2+JI).GT.1.3)GOTO 210
      DO 200 K=1,NUMAT
        IF(NAT(K).NE.7) GOTO 200
        JK=MAX(J,K)
        KJ=J+K-JK
        IF(RXYZ((JK*(JK-1))/2+KJ).GT.1.6)GOTO 200
      DO 190 L=1,NUMAT
        IF(NAT(L).NE.1) GOTO 190
        KL=MAX(K,L)
        LK=K+L-KL
        IF(RXYZ((KL*(KL-1))/2+LK).GT.1.3)GOTO 190
C
C   WE HAVE A H-N-C=O SYSTEM.  THE ATOM NUMBERS ARE L-K-J-I
C   NOW SEARCH OUT ATOM ATTACHED TO NITROGEN, THIS SPECIFIES
C   THE SYSTEM X-N-C=O
C
      DO 180 M=1,NUMAT
        IF(M.EQ.K.OR.M.EQ.L.OR.M.EQ.J) GOTO 180
        MK=MAX(M,K)
        KM=M+K-MK
        IF(RXYZ((MK*(MK-1))/2+KM).GT.1.7)GOTO 180
        NNHCO=NNHCO+1
        NHCO(1,NNHCO)=I
        NHCO(2,NNHCO)=J
        NHCO(3,NNHCO)=K
        NHCO(4,NNHCO)=M
        NNHCO=NNHCO+1
        NHCO(1,NNHCO)=I
        NHCO(2,NNHCO)=J
        NHCO(3,NNHCO)=K
        NHCO(4,NNHCO)=L
        GOTO 190
180      CONTINUE
190      CONTINUE
200      CONTINUE
210      CONTINUE
220 CONTINUE
      IF(NNHCO.NE.0) THEN
        IF(INDEX(KEYWRD,'MMOK').NE.0) THEN
          WRITE(6,'(A)') ' MOLECULAR MECHANICS CORRECTION APPLIED TO PE
1PTIDELINKAGE'
          ELSEIF(INDEX(KEYWRD,'NOMM').NE.0) THEN
            WRITE(6,'(A,I2,2A)') ' THERE ARE ',NNHCO/2,' PEPTIDE LINKAGES
1',' IDENTIFIED IN THIS SYSTEM'
            WRITE(6,'(A)') ' IF YOU WANT MM CORRECTION TO THE CONH BARRIE
1R, ADD THE KEY-WORD "MMOK"'
            NNHCO=0
          ELSE
            WRITE(6,'(A)') ' THIS SYSTEM CONTAINS -HNCO- GROUPS.'
            WRITE(6,'(A)') ' YOU MUST SPECIFY "NOMM" OR "MMOK" REGARDING
1MOLECULAR MECHANICS CORRECTION'
            STOP
          ENDIF
        ENDIF
      ENDIF
      END
      SUBROUTINE DERIV(CRD,GRAD)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
      INCLUDE 'SIZES'
      DIMENSION GRAD(*), CRD(3,*)

```

```

*****
*
*   DERIV CALCULATES THE DERIVATIVES OF THE ENERGY WITH RESPECT TO THE
*   INTERNAL COORDINATES. THIS IS DONE BY FINITE DIFFERENCES.
*
*   THE MAIN ARRAYS IN DERIV ARE:
*       LOC      INTEGER ARRAY, LOC(1,I) CONTAINS THE ADDRESS OF THE ATOM
*               INTERNAL COORDINATE LOC(2,I) IS TO BE USED IN THE
*               DERIVATIVE CALCULATION.
*       GEO      ARRAY \GEO\ HOLDS THE INTERNAL COORDINATES.
*       GRAD     ON EXIT, CONTAINS THE DERIVATIVES
*
*****
COMMON / EULER/ TVEC(3,3), ID
COMMON /OKMANY/ ISOK
COMMON /GEOVAR/ NVAR, LOC(2,MAXPAR), IDUMY, DUMMY(MAXPAR)
COMMON /MOLKST/ NUMAT,NAT(NUMATM),NFIRST(NUMATM),NMIDDLE(NUMATM),
1          NLAST(NUMATM), NORBS, NELECS,NALPHA,NBETA,
2          NCLOSE,NOPEN,NDUMY,FRACT
COMMON /GEOKST/ NATOMS,LABELS(NUMATM),
1NA(NUMATM),NB(NUMATM),NC(NUMATM)
COMMON /GRAVEC/ COSINE
COMMON /GEOSYM/ NDEP, LOCPAR(MAXPAR), IDEPFN(MAXPAR),
1LOCDEP(MAXPAR)
COMMON /PATH / LATOM,LPARAM,REACT(200)
COMMON /UCELL / L1L,L2L,L3L,L1U,L2U,L3U
COMMON /XYZGRA/ DXYZ(9*NUMATM)
COMMON /ENUCLR/ ENUCLR
COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
COMMON /HMATRX/ H(MPACK)
COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
COMMON /KEYWRD/ KEYWRD
COMMON /ERRFN / ERRFN(MAXPAR), AICORR(MAXPAR)
COMMON /WORK3 / WORK2(4*MPACK)
COMMON /GENRAL/ COORD(3,NUMATM), COLD(3,NUMATM*3), GOLD(MAXPAR),
1 XPARAM(MAXPAR)
CHARACTER*241 KEYWRD, LINE*80, GETNAM*80
DIMENSION CHANGE(3), XJUC(3), AIDREF(MAXPAR)
SAVE SCF1, HALFE, IDELTA, SLOW
LOGICAL DEBUG, HALFE, SCF1, CI, PRECIS, SLOW, AIC, NOANCI,
1AIFRST, ISOK, GEOOK, INT
DATA ICALCN /0/
IF(ICALCN.NE.NUMCAL) THEN
    AIFRST= (INDEX(KEYWRD,'RESTART').EQ.0)
    DEBUG = (INDEX(KEYWRD,'DERIV') .NE. 0)
    PRECIS= (INDEX(KEYWRD,'PREC') .NE. 0)
    INT    = (INDEX(KEYWRD,' XYZ') .EQ. 0)
    GEOOK  = (INDEX(KEYWRD,'GEO-OK') .NE. 0)
    CI     = (INDEX(KEYWRD,'C.I.') .NE. 0)
    SCF1   = (INDEX(KEYWRD,'1SCF') .NE. 0)
    AIC=(INDEX(KEYWRD,'AIDER').NE.0)
    ICAPA=ICHAR('A')
    ILOWA=ICHAR('a')
    ILOWZ=ICHAR('z')
    ICALCN=NUMCAL
    HALFE = (NOPEN.GT.NCLOSE.AND.FRACT.NE.2.D0.AND.FRACT.NE.0.D0
1 .OR. CI)
ENDIF
c    WRITE (6,*) 'nvar = ',NVAR
    IF(NVAR.EQ.0) RETURN
    NOANCI=.FALSE.

```

```

      IF (HALFE) THEN
        NOANCI = (INDEX(KEYWRD, 'NOANCI') .NE. 0 .OR. NOPEN.EQ. NORBS)
      ENDIF
      DO I=1, NATOMS
        DO J=1, 3
          COORD(J, I) = CRD(J, I)
        enddo
      enddo

C
C   COORD NOW HOLDS THE CARTESIAN COORDINATES
C

      IF (HALFE.AND..NOT.NOANCI) THEN
        IF (DEBUG) WRITE(6, *) 'DOING ANALYTICAL C.I. DERIVATIVES'
        CALL DERNVO(COORD, DXYZ)
      ELSE
        IF (DEBUG) WRITE(6, *) 'DOING VARIATIONALLY OPTIMIZED DERIVATIVES'
        CALL DCART(COORD, DXYZ)
      ENDIF
      DO i=1, NATOMS
        DO J=1, 3
          GRAD(3*(I-1)+J) = DXYZ(3*(I-1)+J)
        ENDDO
      ENDDO

      RETURN
      END

      SUBROUTINE COMPPFG(XPARAM, INT, ESCF, FULSCF, GRAD, LGRAD)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H, O-Z)
      INCLUDE 'SIZES'
      DIMENSION XPARAM(MAXPAR), GRAD(MAXPAR)
      LOGICAL LGRAD, FULSCF
      COMMON /GEOVAR/ NVAR, LOC(2, MAXPAR), IDUMY, DUMY(MAXPAR)
      COMMON /GEOSYM/ NDEP, LOCPAR(MAXPAR), IDEPFN(MAXPAR), LOCDEP(MAXPAR)
      COMMON /GEOM / GEO(3, NUMATM)
      COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
      COMMON /WMATRX/ WJ(N2ELEC), WK(N2ELEC)
      COMMON /ENUCLR/ ENUCLR
      COMMON /NATYPE/ NZTYPE(107), MTYPE(30), LTYPE
      COMMON /ELECT / ELECT
      PARAMETER (MDUMY=MAXPAR**2-MPACK)
      COMMON /SCRACH/ RXYZ(MPACK), XDUMY(MDUMY)
      COMMON /HMATRX/ H(MPACK)
      COMMON /GEOKST/ NATOMS, LABELS(NUMATM),
1      NA(NUMATM), NB(NUMATM), NC(NUMATM)
      COMMON /ERRFN / ERRFN(MAXPAR), AICORR(MAXPAR)
      COMMON /VECTOR/ C(MORB2), EIGS(MAXORB), CBETA(MORB2), EIGB(MAXORB)
      COMMON /LAST / LAST
      COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
      COMMON /SCFTYP/ EMIN, LIMSCF
      COMMON /MOLMEC/ HTYPE(4), NHCO(4, 20), NNHCO, ITYPE
      1      /MOLKST/ NUMAT, NAT(NUMATM), NFIRST(NUMATM), NMIDDLE(NUMATM),
      2      NLAST(NUMATM), NORBS, NELECS, NALPHA, NBETA,
      3      NCLOSE, NOPEN, NDUMY, FRACT

C COSMO change A. Klamt
      LOGICAL ISEPS, USEPS, UPDA
      COMMON /ISEPS/ ISEPS, USEPS, UPDA
C end of COSMO change
C*****
C
C   COMPPFG CALCULATES (A) THE HEAT OF FORMATION OF THE SYSTEM, AND

```

```

C                               (B) THE GRADIENTS, IF LGRAD IS .TRUE.
C
C   ON INPUT  XPARAM = ARRAY OF PARAMETERS TO BE USED IN INTERNAL COORDS
C             LGRAD  = .TRUE. IF GRADIENTS ARE NEEDED, .FALSE. OTHERWISE
C             INT    = .TRUE. IF HEAT OF FORMATION IS TO BE CALCULATED
C             FULSCF = .TRUE. IF FULL SCF TO BE DONE, .FALSE. OTHERWISE.
C
C   ON OUTPUT ESCF  = HEAT OF FORMATION.
C             GRAD   = ARRAY OF GRADIENTS, IF LGRAD = .TRUE.
C*****
COMMON /KEYWRD/KEYWRD
CHARACTER*241 KEYWRD
LOGICAL DEBUG, INT, PRINT, ANALYT, LARGE, USEDCCI,
1FORCE, TIMES, AIDER
DIMENSION COORD(3,NUMATM), W(N2ELEC), DEGREE(3), XPAREF(MAXPAR)
1,DELTAP(NMECI**2), DELTA(NMECI*MAXORB)
SAVE DEGREE, PRINT, DEBUG
EQUIVALENCE (W,WJ)
DATA ICALCN /0/
C                               MNDO          AM1          PM3          MINDO/

DO I=1,NATOMS
  DO J=1,3
    COORD(J,I) = XPARAM((I-1)*3+J)
  ENDDO
ENDDO
IF (ICALCN.NE.NUMCAL) THEN
  WRITE(6,*)"counting the number of NH-C=O groups"
  CALL donhco(coord)
  ICALCN=NUMCAL
  HTYPE(1)=6.1737D0
  HTYPE(2)=3.3191D0
  HTYPE(3)=7.1853D0
  HTYPE(4)=1.7712D0
  LTYPE=0
  DO 30 I=1,NUMAT
    IF(NAT(I).LT.99) THEN
      DO 10 J=1,LTYPE
10        IF(NAT(I).EQ.MTYPE(J)) GOTO 20
        LTYPE=LTYPE+1
        MTYPE(LTYPE)=NAT(I)
        NZTYPE(NAT(I))=LTYPE
      CONTINUE
    ENDIF
  CONTINUE
  AIDER=(INDEX(KEYWRD,'AIDER').NE.0)
  TIMES=(INDEX(KEYWRD,'TIMES').NE.0)
  ANALYT=(INDEX(KEYWRD,'ANALYT').NE.0)
  IF(INT.AND.ANALYT)CALL SETUPG
  DEGREE(1)=1.D0
  IF(INDEX(KEYWRD,' XYZ').NE.0) THEN
    DEGREE(2)=1.D0
  ELSE
    DEGREE(2)=180.D0/3.141592652589D0
  ENDIF
  DEGREE(3)=DEGREE(2)
  USEDCCI=(NCLOSE.NE.NOPEN.AND.FRACT.NE.2.D0.AND.FRACT.NE.0.D0)

```

```

1          .OR. (INDEX(KEYWRD, 'C.I.').NE.0))
      FORCE=(INDEX(KEYWRD, 'FORCE').NE.0)
      LARGE=(INDEX(KEYWRD, 'LARGE') .NE. 0)
      PRINT=(INDEX(KEYWRD, 'COMPG') .NE. 0)
      DEBUG=(INDEX(KEYWRD, 'DEBUG') .NE. 0 .AND. PRINT)
      EMIN=0.D0
    ENDIF
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
    DO I=1,NATOMS
      DO J=1,3
        COORD(J,I) = XPARAM((I-1)*3+J)
      ENDDO
    ENDDO
    IF (INT.AND.ANALYT)REWIND 2

    IF (INT)CALL HCORE(COORD, H, W, WJ, WK, ENUCLR)

    IF (NORBS.GT.0.AND.NELECS.GT.0) THEN

      IF (INT) CALL ITER(H, W, WJ, WK, ELECT, FULSCF, .TRUE.)

    ELSE
      ELECT=0.D0
    ENDIF
    ESCF=(ELECT+ENUCLR)*23.061D0+ATHEAT
    IF (ESCF.LT.EMIN.OR.EMIN.EQ.0.D0)EMIN=ESCF
    DO 60 I=1,NNHCO
      CALL DIHED(COORD,NHCO(1,I),NHCO(2,I),NHCO(3,I),NHCO(4,I),ANGLE)
      ESCF=ESCF+HTYPE(ITYPE)*SIN(ANGLE)**2
60 CONTINUE
C
C FIND DERIVATIVES IF DESIRED
C
    IF (LGRAD) THEN
      CALL DERIV(COORD,GRAD)
    ENDIF
C
C REFORM DENSITY MATRIX, IF A C.I. DONE AND EITHER THE LAST SCF OR A
C FORCE CALCULATION
C
    IF (USEDCI.AND. (LAST.EQ.1 .OR. FORCE))
1CALL MECIP(C,NORBS,DELTAP,DELTA)
    RETURN
    END

    SUBROUTINE MOLDAT(MODE)
    IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
    INCLUDE 'SIZES'
    COMMON /GEOKST/ NATOMS,LABELS(NUMATM),
1      NA(NUMATM),NB(NUMATM),NC(NUMATM)
    COMMON /MOLMEC/ HTYPE(4),NHCO(4,20),NNHCO,ITYPE
    COMMON /MOLKST/ NUMAT,NAT(NUMATM),NFIRST(NUMATM),NMIDDLE(NUMATM),
1      NLAST(NUMATM), NORBS, NELECS,NALPHA,NBETA,
2      NCLOSE,NOPEN,NDUMY,FRACT
3      /KEYWRD/ KEYWRD
4      /NATORB/ NATORB(107)
    COMMON /CORE / CORE(107)
1      /BETAS / BETAS(107),BETAP(107),BETAD(107)
2      /MOLORB/ USPD(MAXORB),PSPD(MAXORB)
3      /VSIPS / VS(107),VP(107),VD(107)
4      /ONELEC/ USS(107),UPP(107),UDD(107)

```

```

COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
1      /POLVOL/ POLVOL(107)
2      /MULTIP/ DD(107),QQ(107),AM(107),AD(107),AQ(107)
3      /TWOELE/ GSS(107),GSP(107),GPP(107),GP2(107),HSP(107)
4              ,GSD(107),GPD(107),GDD(107)
5      /IDEAA / GUESA1(107,10),GUESA2(107,10),GUESA3(107,10)
6      /IDEAS / GUESS1(107,10),GUESS2(107,10),GUESS3(107,10)
7      /IDEAP / GUESP1(107,10),GUESP2(107,10),GUESP3(107,10)
COMMON /ALPHA / ALP(107)
1      /REFS/ ALLREF(107,4)
COMMON /MNDO/ USSM(107),UPPM(107),UDDM(107),ZSM(107),
1ZPM(107),ZDM(107),BETASM(107),BETAPM(107),BETADM(107),
2ALPM(107),EISOLM(107),DDM(107),QQM(107),AMM(107),
3ADM(107),AQM(107),GSSM(107),GSPM(107),GPPM(107),
4GP2M(107),HSPM(107),POLVOM(107)
COMMON /PM3 / USSPM3(107),UPPPM3(107),UDDPM3(107),ZSPM3(107),
1ZPPM3(107),ZDPM3(107),BETASP(107),BETAPP(107),BETADP(107),
2ALPPM3(107),EISOLP(107),DDPM3(107),QQPM3(107),AMPM3(107),
3ADPM3(107),AQPM3(107),GSSPM3(107),GSPPM3(107),GPPPM3(107),
4GP2PM3(107),HSPPM3(107),POLVOP(107)
COMMON /AM1BLO/USSAM1(107),UPPAM1(107),UDDAM1(107),ZSAM1(107),
1ZPAM1(107),ZDAM1(107),BETASA(107),BETAPA(107),BETADA(107),
2ALPAM1(107),EISOLA(107),DDAM1(107),QQAM1(107),AMAM1(107),
3ADAM1(107),AQAM1(107),GSSAM1(107),GSPAM1(107),GPPAM1(107),
4GP2AM1(107),HSPAM1(107),POLVOA(107)
COMMON /GEOM / GEO(3,NUMATM)
PARAMETER (MDUMY=MAXPAR**2-MPACK)
COMMON /SCRACH/ RXYZ(MPACK),XDUMY(MDUMY)
*
* COMMON BLOCKS FOR MINDO/3
*
COMMON /ONELE3 / USS3(18),UPP3(18)
1      /ATOMI3 / EISOL3(18),EHEAT3(18)
2      /EXPON3 / ZS3(18),ZP3(18)
*
* END OF MINDO/3 COMMON BLOCKS
*
COMMON /EXPONT/ ZS(107),ZP(107),ZD(107)
COMMON /ATOMIC/ EISOL(107),EHEAT(107)
DIMENSION COORD(3,NUMATM),ISWAP(2,20),ESTORE(107)
CHARACTER*241 KEYWRD,OLDE(20)*6,ALLREF*80
LOGICAL DEBUG,UHF,EXCI,TRIP,MINDO3,BIRAD,AM1,LPM3,
1LMNDO,HALFE,SLOW
DATA ESTORE(1)/0.DO/
IF(ESTORE(1).EQ.0.DO)THEN
DO 9 I=1,107
9 ESTORE(I)=EHEAT(I)
ENDIF
DO 8 I=1,107
8 EHEAT(I)=ESTORE(I)
DEBUG = (INDEX(KEYWRD,'MOLDAT').NE.0)
LPM3 = (INDEX(KEYWRD,'PM3').NE.0)
MINDO3= (INDEX(KEYWRD,'MINDO').NE.0)
UHF=(INDEX(KEYWRD,'UHF').NE.0)
AM1= (INDEX(KEYWRD,'AM1').NE.0)
LMNDO=(.NOT.AM1.AND..NOT.LPM3)
KHARGE=0
I=INDEX(KEYWRD,'CHARGE')
IF(I.NE.0) KHARGE=READA(KEYWRD,I)
ELECS=-KHARGE
NDORBS=0

```

```

ATHEAT=0.D0
EAT=0.D0
NUMAT=0
IF(MODE.EQ.1) GOTO 80
IF ( LMNDO ) THEN
*
*
*
C      ZERO OUT GAUSSIAN 1 FOR CARBON.  THIS WILL BE USED IN
C      ROTATE TO DECIDE WHETHER OR NOT TO USE AM1-TYPE GAUSSIANS
C
GUESS1(6,1)=0.D0
DO 10 I=1,107
    IF(.NOT.MINDO3) POLVOL(I)=POLVOM(I)
    ZS(I)=ZSM(I)
    ZP(I)=ZPM(I)
    ZD(I)=ZDM(I)
    USS(I)=USSM(I)
    UPP(I)=UPPM(I)
    UDD(I)=UDDM(I)
    BETAS(I)=BETASM(I)
    BETAP(I)=BETAPM(I)
    BETAD(I)=BETADM(I)
    ALP(I)=ALPM(I)
    EISOL(I)=EISOLM(I)
    DD(I)=DDM(I)
    QQ(I)=QQM(I)
    AM(I)=AMM(I)
    AD(I)=ADM(I)
    AQ(I)=AQM(I)
    GSS(I)=GSSM(I)
    GPP(I)=GPPM(I)
    GSP(I)=GSPM(I)
    GP2(I)=GP2M(I)
    HSP(I)=HSPM(I)
10   CONTINUE
    ELSEIF( LPM3 ) THEN
*
*
*
C      SWITCH IN MNDO-PM3 PARAMETERS
C
DO 30 I=1,107
    DO 20 J=1,10
        GUESS1(I,J)=GUESP1(I,J)
        GUESS2(I,J)=GUESP2(I,J)
20   GUESS3(I,J)=GUESP3(I,J)
    POLVOL(I)=POLVOP(I)
    ZS(I)=ZSPM3(I)
    ZP(I)=ZPPM3(I)
    ZD(I)=ZDPM3(I)
    USS(I)=USSPM3(I)
    UPP(I)=UPPPM3(I)
    UDD(I)=UDDPM3(I)
    BETAS(I)=BETASP(I)
    BETAP(I)=BETAPP(I)
    BETAD(I)=BETADP(I)
    ALP(I)=ALPPM3(I)
    EISOL(I)=EISOLP(I)
    DD(I)=DDPM3(I)
    QQ(I)=QQPM3(I)
    AM(I)=AMPM3(I)

```

```

        AD(I)=ADPM3(I)
        AQ(I)=AQPM3(I)
        GSS(I)=GSSPM3(I)
        GPP(I)=GPPPM3(I)
        GSP(I)=GSPPM3(I)
        GP2(I)=GP2PM3(I)
        HSP(I)=HSPPM3(I)
30      CONTINUE
      ELSE
*
*      SWITCH IN AM1 PARAMETERS
*
        DO 50 I=1,107
          DO 40 J=1,10
            GUESS1(I,J)=GUESA1(I,J)
            GUESS2(I,J)=GUESA2(I,J)
40      GUESS3(I,J)=GUESA3(I,J)
            POLVOL(I)=POLVOA(I)
            ZS(I)=ZSAM1(I)
            ZP(I)=ZPAM1(I)
            ZD(I)=ZDAM1(I)
            USS(I)=USSAM1(I)
            UPP(I)=UPPAM1(I)
            UDD(I)=UDDAM1(I)
            BETAS(I)=BETASA(I)
            BETAP(I)=BETAPA(I)
            BETAD(I)=BETADA(I)
            ALP(I)=ALPAM1(I)
            EISOL(I)=EISOLA(I)
            DD(I)=DDAM1(I)
            QQ(I)=QQAM1(I)
            AM(I)=AMAM1(I)
            AD(I)=ADAM1(I)
            AQ(I)=AQAM1(I)
            GSS(I)=GSSAM1(I)
            GPP(I)=GPPAM1(I)
            GSP(I)=GSPAM1(I)
            GP2(I)=GP2AM1(I)
            HSP(I)=HSPAM1(I)
50      CONTINUE
      ENDIF
C
C      SWAP IN OLD PARAMETERS FOR ELEMENTS.  OLDE CONTAINS THE
C      CHARACTER NAME OF THE ELEMENT, AND ISWAP(1,1:NEWELE) CONTAINS
C      THE ATOMIC NUMBER OF THE ELEMENT. ISWAP(2,1:NEWELE) CONTAINS
C      THE STORAGE ADDRESS OF THE OLD SET OF PARAMETERS.
C
      NEWELE=2
      OLDE(1)=' S1978'
      ISWAP(1,1)=16
      ISWAP(2,1)=91
      OLDE(2)='SI1978'
      ISWAP(1,2)=14
      ISWAP(2,2)=90
C$DOIT ASIS
      DO 60 K=1,NEWELE
        IF (INDEX(KEYWRD,OLDE(K)).NE.0) THEN
          I=ISWAP(1,K)
          J=ISWAP(2,K)
          ALLREF(I,3)=ALLREF(J,1)
          ALLREF(I,1)=ALLREF(J,1)

```

```

      ZS(I)=ZS(J)
      ZP(I)=ZP(J)
      ZD(I)=ZD(J)
      USS(I)=USS(J)
      UPP(I)=UPP(J)
      UDD(I)=UDD(J)
      BETAS(I)=BETAS(J)
      BETAP(I)=BETAP(J)
      BETAD(I)=BETAD(J)
      ALP(I)=ALP(J)
      EISOL(I)=EISOL(J)
      DD(I)=DD(J)
      QQ(I)=QQ(J)
      AM(I)=AM(J)
      AD(I)=AD(J)
      AQ(I)=AQ(J)
      IF(GSS(J).NE.0)GSS(I)=GSS(J)
      IF(GPP(J).NE.0)GPP(I)=GPP(J)
      IF(GSP(J).NE.0)GSP(I)=GSP(J)
      IF(GP2(J).NE.0)GP2(I)=GP2(J)
      IF(HSP(J).NE.0)HSP(I)=HSP(J)
    ENDIF
60  CONTINUE
    IF( MINDO3 ) THEN
      DO 70 I=1,17
        IF(I.NE.2.AND.I.NE.10) THEN
          USS(I)=USS3(I)
          UPP(I)=UPP3(I)
          EISOL(I)=EISOL3(I)
          EHEAT(I)=EHEAT3(I)
          ZS(I)=ZS3(I)
          ZP(I)=ZP3(I)
          GSS(I)=GSSM(I)
          GPP(I)=GPPM(I)
          GSP(I)=GSPM(I)
          GP2(I)=GP2M(I)
          HSP(I)=HSPM(I)
        ENDIF
70    CONTINUE
      ENDIF
80  CONTINUE
    IF(USS(1).GT.-1.D0) THEN
      WRITE(6,('( ' THE HAMILTONIAN REQUESTED IS NOT AVAILABLE IN '
1, ' THIS PROGRAM '))')
      STOP
    ENDIF
    IA=1
    IB=0
    NHEAVY=0
    DO 130 II=1,NATOMS
      IF(LABELS(II).EQ.99.OR.LABELS(II).EQ.107) GOTO 130
      NUMAT=NUMAT+1

      NAT(NUMAT)=LABELS(II)
      NFIRST(NUMAT)=IA
      NI=NAT(NUMAT)
      ATHEAT=ATHEAT+EHEAT(NI)
      EAT =EAT +EISOL(NI)
      ELECS=ELECS+CORE(NI)
      IB=IA+NATORB(NI)-1
      NMIDDLE(NUMAT)=IB

```

```

        IF (NATORB (NI) .EQ. 9) NDORBS=NDORBS+5
        IF (NATORB (NI) .EQ. 9) NMIDDLE (NUMAT)=IA+3
        NLAST (NUMAT)=IB
        IF (IA.GT.MAXORB) GOTO 270
        USPD (IA)=USS (NI)
        IF (IA.EQ.IB) GOTO 120
        K=IA+1
        K1=IA+3
C$DOIT ASIS
        DO 90 J=K,K1
            IF (J.GT.MAXORB) GOTO 270
            USPD (J)=UPP (NI)
    90    CONTINUE
        NHEAVY=NHEAVY+1
    100    IF (K1.EQ.IB) GOTO 120
        K=K1+1
C$DOIT ASIS
        DO 110 J=K, IB
    110    USPD (J)=UDD (NI)
    120    CONTINUE
    130    IA=IB+1
        IF (NUMAT.EQ.1) THEN
            IF (INDEX (KEYWRD, 'FORCE') .NE. 0) THEN
                WRITE (6, ' (///, A) ') '          A SINGLE ATOM HAS NO VIBRATIONAL MO
1DES'
                STOP
            ENDIF
        ENDIF
        ATHEAT=ATHEAT-EAT*23.061D0
        NORBS=NLAST (NUMAT)
        IF (NORBS.GT.MAXORB) THEN
            WRITE (6, ' (//10X, '***** MAX. NUMBER OF ORBITALS: ', I4, /
1          10X, 'NUMBER OF ORBITALS IN SYSTEM: ', I4) ')
2MAXORB, NORBS
            STOP
        ENDIF
        NLIGHT=NUMAT-NHEAVY
        N2EL=50*NHEAVY*(NHEAVY-1)+10*NHEAVY*NLIGHT+(NLIGHT*(NLIGHT-1))/2
        IF (N2EL.GT.N2ELEC) THEN
            WRITE (6, ' (//10X, '***** MAX. NUMBER OF TWO-ELECTRON INTEGRALS: '
1, I8, /
2          10X, 'NUMBER OF TWO ELECTRON INTEGRALS IN SYSTEM: ',
3I8) ')
4N2ELEC, N2EL
            STOP
        ENDIF
C
C  NOW TO CALCULATE THE NUMBER OF LEVELS OCCUPIED
        TRIP=(INDEX (KEYWRD, 'TRIP') .NE. 0)
        EXCI=(INDEX (KEYWRD, 'EXCI') .NE. 0)
        BIRAD=(EXCI.OR.INDEX (KEYWRD, 'BIRAD') .NE. 0)
        IF (INDEX (KEYWRD, 'C.I.') .NE. 0 .AND. UHF ) THEN
            WRITE (6, ' (//10X, 'C.I. NOT ALLOWED WITH UHF ') ')
            STOP
        ENDIF
C
C  NOW TO WORK OUT HOW MANY ELECTRONS ARE IN EACH TYPE OF SHELL
C
        NALPHA=0
        NBETA=0
C

```

```

C      PROTECT DUMB USERS FROM DUMB ERRORS!
C
NELECS=MAX(ELECS+0.5D0,0.D0)
NELECS=MIN(2*NORBS,NELECS)
NCLOSE=0
NOPEN=0
IF( UHF ) THEN
  FRACT=1.D0
  NBETA=NELECS/2
  IF( TRIP ) THEN
    IF(NBETA*2 .NE. NELECS) THEN
      WRITE(6,'(//10X,'TRIPLET SPECIFIED WITH ODD NUMBER',
1      ' OF ELECTRONS, CORRECT FAULT '))')
      STOP
    ELSE
      IF(MODE.NE.1)
1WRITE(6,'(//'' TRIPLET STATE CALCULATION''))')
      NBETA=NBETA-1
    ENDIF
  ENDIF
  IF(INDEX(KEYWRD,'QUAR').NE.0) THEN
    IF(NBETA*2 .EQ. NELECS) THEN
      WRITE(6,'(//10X,'QUARTET SPECIFIED WITH EVEN NUMBER',
1      ' OF ELECTRONS, CORRECT FAULT '))')
      STOP
    ELSE
      IF(MODE.NE.1)
1WRITE(6,'(//'' QUARTET STATE CALCULATION''))')
      NBETA=NBETA-1
    ENDIF
  ENDIF
  IF(INDEX(KEYWRD,'QUIN').NE.0) THEN
    IF(NBETA*2 .NE. NELECS) THEN
      WRITE(6,'(//10X,'QUINTET SPECIFIED WITH ODD NUMBER',
1      ' OF ELECTRONS, CORRECT FAULT '))')
      STOP
    ELSE
      IF(MODE.NE.1)
1WRITE(6,'(//'' QUINTET STATE CALCULATION''))')
      NBETA=NBETA-2
    ENDIF
  ENDIF
  IF(INDEX(KEYWRD,'SEXT').NE.0) THEN
    IF(NBETA*2 .EQ. NELECS) THEN
      WRITE(6,'(//10X,'SEXTET SPECIFIED WITH EVEN NUMBER',
1      ' OF ELECTRONS, CORRECT FAULT '))')
      STOP
    ELSE
      IF(MODE.NE.1)WRITE(6,'(//'' SEXTET STATE CALCULATION''))')
      NBETA=NBETA-2
    ENDIF
  ENDIF
  NALPHA=NELECS-NBETA
  IF(MODE.NE.1)
1WRITE(6,'(//10X,'UHF CALCULATION, NO. OF ALPHA ELECTRONS =',I
23,/27X,'NO. OF BETA ELECTRONS =',I3)')NALPHA,NBETA
  ELSE
C
C      NOW TO DETERMINE OPEN AND CLOSED SHELLS
C
  IELEC=0

```

```

ILEVEL=0
IF( TRIP .OR. EXCI .OR. BIRAD ) THEN
  IF( (NELECS/2)*2 .NE. NELECS) THEN
    WRITE(6,'(//10X,'SYSTEM SPECIFIED WITH ODD NUMBER'',
1      '' OF ELECTRONS, CORRECT FAULT '')')
    STOP
  ENDIF
  IF(MODE.NE.1) THEN
    IF(BIRAD)WRITE(6,'(//'' SYSTEM IS A BIRADICAL'')')
    IF(TRIP )WRITE(6,'(//'' TRIPLET STATE CALCULATION'')')
    IF(EXCI )WRITE(6,'(//'' EXCITED STATE CALCULATION'')')
  ENDIF
  IELEC=2
  ILEVEL=2
ELSEIF((NELECS/2)*2.NE.NELECS) THEN
  IELEC=1
  ILEVEL=1
ENDIF
IF( INDEX(KEYWRD,'QUAR').NE.0) THEN
  IF(MODE.NE.1)WRITE(6,'(//'' QUARTET STATE CALCULATION'')')
  IELEC=3
  ILEVEL=3
ENDIF
IF( INDEX(KEYWRD,'QUIN').NE.0) THEN
  IF(MODE.NE.1)WRITE(6,'(//'' QUINTET STATE CALCULATION'')')
  IELEC=4
  ILEVEL=4
ENDIF
IF( INDEX(KEYWRD,'SEXT').NE.0) THEN
  IF(MODE.NE.1)WRITE(6,'(//'' SEXTET STATE CALCULATION'')')
  IELEC=5
  ILEVEL=5
ENDIF
I=INDEX(KEYWRD,'OPEN(')
IF(I.NE.0) THEN
  IELEC=READA(KEYWRD,I)
  ILEVEL=READA(KEYWRD,I+7)
ENDIF
NCLOSE=NELECS/2
NOPEN = NELECS-NCLOSE*2
IF( IELEC.NE.0 ) THEN
  IF( (NELECS/2)*2.EQ.NELECS .NEQV.
1      (IELEC/2)*2.EQ.IELEC) THEN
    WRITE(6,'('' IMPOSSIBLE NUMBER OF OPEN SHELL ELECTR
1ONS'')')
    STOP
  ENDIF
  NCLOSE=NCLOSE-IELEC/2
  NOPEN=ILEVEL
  IF(NCLOSE+NOPEN.GT.NORBS) THEN
    WRITE(6,'(A)')' NUMBER OF DOUBLY FILLED PLUS PARTLY FILLE
1D LEVELS'
    WRITE(6,'(A)')' GREATER THAN TOTAL NUMBER OF ORBITALS.'
    STOP
  ENDIF
  FRACT=IELEC*1.D0/ILEVEL
  IF(MODE.NE.1)
1WRITE(6,'('' THERE ARE'',I3,'' DOUBLY FILLED LEVELS'')')NCLOSE
  ENDIF
  IF(MODE.NE.1)WRITE(6,'(//10X,'RHF CALCULATION, NO. OF '',
1''DOUBLY OCCUPIED LEVELS ='',I3)'')NCLOSE

```



```

        STOP
      ENDIF
    ENDIF
C
C   MAKE SURE ANALYT IS NOT USED WITH ANALYTICAL C.I. DERIVATIVES
C
      HALFE = (NOPEN.GT.NCLOSE.AND.FRACT.NE.2.D0.AND.FRACT.NE.0.D0
1  .OR. INDEX(KEYWRD,'C.I.').NE.0)
      SLOW=(INDEX(KEYWRD,'EXCI').NE.0.OR.
1 INDEX(KEYWRD,'ROOT').NE.0.AND.INDEX(KEYWRD,'ROOT=1').EQ.0)
      IF (HALFE) HALFE=(.NOT.SLOW)
      IF (INDEX(KEYWRD,'NOANCI').EQ.0.AND.
1 INDEX(KEYWRD,'ANALYT').NE.0.AND.HALFE) THEN
        WRITE(6,*)
        WRITE(6,'(A)') ' KEYWORD 'ANALYT' CANNOT BE USED HERE: ',
1 ' ANALYTICAL C.I. DERIVATIVES MUST USE FINITE DIFFERENCES',
2 ' TO CORRECT, REMOVE KEYWORD 'ANALYT' OR ADD 'NOANCI''
        STOP
      ENDIF
      YY=FLOAT(KHARGE)/(NORBS+1.D-10)
      L=0
      DO 160 I=1,NUMAT
        NI=NAT(I)
        XX=1.D0/(NLAST(I)-NFIRST(I)+1+1.D-10)
        W=CORE(NI)*XX-YY
        IA=NFIRST(I)
        IC=NMIDDLE(I)
        IB=NLAST(I)
C$DOIT ASIS
        DO 140 J=IA,IC
          L=L+1
140      PSPD(L)=W
C$DOIT ASIS
        DO 150 J=IC+1,IB
          L=L+1
150      PSPD(L)=0.D0
160 CONTINUE

      NNHCO=0

      ITYPE=1
      IF (INDEX(KEYWRD,'AM1').NE.0) ITYPE=2
      IF (INDEX(KEYWRD,'PM3').NE.0) ITYPE=3
      IF (INDEX(KEYWRD,'MINDO').NE.0) ITYPE=4
      RETURN
270 WRITE(6,'(//10X,' ' MAXIMUM NUMBER OF ATOMIC ORBITALS EXCEEDED')')
      WRITE(6,'( 10X,' ' MAXIMUM ALLOWED =',I4')')MAXORB
      END
      SUBROUTINE domldt(nrqmat,nucnum,STRING)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
      INCLUDE 'SIZES'
      COMMON /SCFTYP/ EMIN, LIMSCF
      COMMON /KEYWRD/ KEYWRD
      COMMON /OKMANY/ ISOK
      COMMON /GEOVAR/ NVAR,LOC(2,MAXPAR), IDUMY, XPARAM(MAXPAR)
      COMMON /GEOSYM/ NDEP,LOCPAR(MAXPAR), IDEPFN(MAXPAR), LOCDEP(MAXPAR)
      COMMON /GEOKST/ NATOMS,LABELS(NUMATM),
1 NA(NUMATM),NB(NUMATM),NC(NUMATM)
      COMMON /GEOM / GEO(3,NUMATM)
      COMMON /GRADNT/ GRAD(MAXPAR),GNORM
      COMMON /MOLKST/ NUMAT,NAT(NUMATM),NFIRST(NUMATM),NMIDDLE(NUMATM),

```

```

1          NLAST(NUMATM), NORBS, NELECS,NALPHA,NBETA,
2          NCLOSE,NOOPEN,NDUMY,FRACT
COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
COMMON /LAST / LAST
COMMON /ATOMIC/ EISOL(107),EHEAT(107)
COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
C ***** Modified by Jiro Toyoda at 1994-05-25 *****
C COMMON /TIME / TIME0
COMMON /TIMEC / TIME0
C ***** at 1994-05-25 *****
COMMON /PATH / LATOM,LPARAM,REACT(200)
C COSMO change
LOGICAL ISEPS, USEPS , UPDA
COMMON /ISEPS/ ISEPS, USEPS, UPDA
C end of COSMO change
CHARACTER*241 KEYWRD, GETNAM*80
CHARACTER*241 STRING
LOGICAL ISOK, LIMSCF
DIMENSION nucnum(NUMATM)
C NUMCAL=0
ISOK=.TRUE.
10 NUMCAL=NUMCAL+1
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
C
C INITIALIZATION FOR THE COMPGF
C
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
do i=1,nrqmat
labels(i) = nucnum(i)
enddo
NATOMS=nrqmat
KEYWRD=STRING
NVAR = 3*NATOMS
CALL MOLDAT(0)
RETURN
END

SUBROUTINE domop(nrqmat,qmcrd,nrmmat,mmchrg,mmcrd,qmgrad,mmgrad,
$ energy,QMCHRG)
C
C Gromacs - mopac interface routine
C
C Notice of Public Domain nature of MOPAC
C
C 'This computer program is a work of the United States
C Government and as such is not subject to protection by
C copyright (17 U.S.C. # 105.) Any person who fraudulently
C places a copyright notice or does any other act contrary
C to the provisions of 17 U.S. Code 506(c) shall be subject
C to the penalties provided therein. This notice shall not
C be altered or removed from this software and is to be on
C all reproductions.'
C
C
IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z)
INCLUDE 'SIZES'
COMMON /SCFTYP/ EMIN, LIMSCF
COMMON /KEYWRD/ KEYWRD
COMMON /OKMANY/ ISOK
COMMON /GEOVAR/ NVAR,LOC(2,MAXPAR), IDUMY, XPARAM(MAXPAR)
COMMON /GEOSYM/ NDEP,LOCPAR(MAXPAR),IDEPFN(MAXPAR),LOCDEP(MAXPAR)

```

```

COMMON /GEOKST/ NATOMS, LABELS (NUMATM),
1NA (NUMATM), NB (NUMATM), NC (NUMATM)
COMMON /GEOM / GEO (3, NUMATM)
COMMON /GRADNT/ GRAD (MAXPAR), GNORM
COMMON /MOLKST/ NUMAT, NAT (NUMATM), NFIRST (NUMATM), NMIDDLE (NUMATM),
1          NLAST (NUMATM), NORBS, NELECS, NALPHA, NBETA,
2          NCLOSE, NOPEN, NDUMY, FRACT
COMMON /ATHEAT/ ATHEAT
COMMON /LAST / LAST
COMMON /ATOMIC/ EISOL (107), EHEAT (107)
COMMON /NUMCAL/ NUMCAL
C ***** Modified by Jiro Toyoda at 1994-05-25 *****
C COMMON /TIME / TIME0
COMMON /TIMEC / TIME0
C ***** at 1994-05-25 *****
COMMON /PATH / LATOM, LPARAM, REACT (200)
COMMON /DENSITY/ P (MPACK), PA (MPACK), PB (MPACK)
COMMON /CORE / CORE (107)
C COSMO change
LOGICAL ISEPS, USEPS, UPDA
COMMON /ISEPS/ ISEPS, USEPS, UPDA
C end of COSMO change
CHARACTER*241 KEYWRD, GETNAM*80
LOGICAL ISOK, LIMSCF
integer nrqmat, nrmmat
DOUBLE PRECISION qmcrd, mmcrd, mmchrg, mmgrad, qmgrad, energy
DIMENSION qmcrd (3, numatm), mmcrd (3, NUMATM), mmchrg (NUMATM),
$          qmgrad (3, NUMATM), mmgrad (3, NUMATM)
DIMENSION Q (MAXORB), QMCHRG (MAXORB)
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
C
C      CACULATING THE ENERGY AND GRADIENTS
C
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
NVAR = 3*NATOMS

DO I=1, NATOMS

    DO J=1, 3
        XPARAM (J+3*(I-1)) = QMCRD (J, I)
    ENDDO
ENDDO
EMIN=0.D0
I=INDEX (KEYWRD, 'GRAD')
DO 39 J=1, NVAR
    GRAD (J)=0.D0
    CALL COMPPFG (XPARAM, .TRUE., ESCF, .TRUE., GRAD, I.NE.0)
    energy = ESCF
    do i=1, NATOMS
        do j=1, 3
            qmgrad (j, i) = GRAD (j+3*(i-1))
        enddo
    enddo
    CALL CHRGE (P, Q)
    DO I=1, NUMAT
        L=NAT (I)
        QMCHRG (I)=CORE (L) - Q (I)
    ENDDO
RETURN
END

```

LISTAGEM DO ARQUIVO RM1.RM1

USS	H	-11.96067697
ZS	H	1.08267366
BETAS	H	-5.76544469
GSS	H	13.98321296
ALP	H	3.06835947
FN11	H	0.10288875
FN21	H	5.90172268
FN31	H	1.17501185
FN12	H	0.06457449
FN22	H	6.41785671
FN32	H	1.93844484
FN13	H	-0.03567387
FN23	H	2.80473127
FN33	H	1.63655241
USS	C	-51.72556032
UPP	C	-39.40728943
ZS	C	1.85018803
ZP	C	1.76830093
BETAS	C	-15.45932428
BETAP	C	-8.23608638
GSS	C	13.05312440
GSP	C	11.33479389
GPP	C	10.95113739
GP2	C	9.72395099
HSP	C	1.55215133
ALP	C	2.79282078
FN11	C	0.07462271
FN21	C	5.73921605
FN31	C	1.04396983
FN12	C	0.01177053
FN22	C	6.92401726
FN32	C	1.66159571
FN13	C	0.03720662
FN23	C	6.26158944
FN33	C	1.63158721
FN14	C	-0.00270657
FN24	C	9.00003735
FN34	C	2.79557901
USS	N	-70.85123715
UPP	N	-57.97730920
ZS	N	2.37447159
ZP	N	1.97812569
BETAS	N	-20.87124548
BETAP	N	-16.67171853
GSS	N	13.08736234
GSP	N	13.21226834
GPP	N	13.69924324
GP2	N	11.94103953
HSP	N	5.00000846
ALP	N	2.96422542
FN11	N	0.06073380
FN21	N	4.58892946
FN31	N	1.37873881
FN12	N	0.02438558
FN22	N	4.62730519
FN32	N	2.08370698
FN13	N	-0.02283430
FN23	N	2.05274659

FN33	N	1.86763816
USS	O	-96.94948069
UPP	O	-77.89092978
ZS	O	3.17936914
ZP	O	2.55361907
BETAS	O	-29.85101212
BETAP	O	-29.15101314
GSS	O	14.00242788
GSP	O	14.95625043
GPP	O	14.14515138
GP2	O	12.70325497
HSP	O	3.93217161
ALP	O	4.17196717
FN11	O	0.23093552
FN21	O	5.21828736
FN31	O	0.90363555
FN12	O	0.05859873
FN22	O	7.42932932
FN32	O	1.51754610
USS	P	-41.81533184
UPP	P	-34.38342529
ZS	P	2.12240118
ZP	P	1.74327954
BETAS	P	-6.13514969
BETAP	P	-5.94442127
GSS	P	11.08059265
GSP	P	5.68339201
GPP	P	7.60417563
GP2	P	7.40265182
HSP	P	1.16181792
ALP	P	1.90993294
FN11	P	-0.41063467
FN21	P	6.08752832
FN31	P	1.31650261
FN12	P	-0.16299288
FN22	P	7.09472602
FN32	P	1.90721319
FN13	P	-0.04887125
FN23	P	8.99979308
FN33	P	2.65857780
USS	S	-55.16775121
UPP	S	-46.52930422
ZS	S	2.13344308
ZP	S	1.87460650
BETAS	S	-1.95910719
BETAP	S	-8.77430652
GSS	S	12.48828408
GSP	S	8.56910574
GPP	S	8.52301167
GP2	S	7.66863296
HSP	S	3.88978932
ALP	S	2.44015636
FN11	S	-0.74601055
FN21	S	4.81038002
FN31	S	0.59380129
FN12	S	-0.06519286
FN22	S	7.20760864
FN32	S	1.29492008
FN13	S	-0.00655977
FN23	S	9.00000180
FN33	S	1.80060151

USS	F	-134.18369591
UPP	F	-107.84660920
ZS	F	4.40337913
ZP	F	2.64841556
BETAS	F	-70.00000512
BETAP	F	-32.67982711
GSS	F	16.72091319
GSP	F	16.76142629
GPP	F	15.22581028
GP2	F	14.86578679
HSP	F	1.99766171
ALP	F	6.00000062
FN11	F	0.40302025
FN21	F	7.20441959
FN31	F	0.81653013
FN12	F	0.07085831
FN22	F	9.00001562
FN32	F	1.43802381
USS	Cl	-118.47306918
UPP	Cl	-76.35330340
ZS	Cl	3.86491071
ZP	Cl	1.89593144
BETAS	Cl	-19.92430432
BETAP	Cl	-11.52935197
GSS	Cl	15.36023105
GSP	Cl	13.30671171
GPP	Cl	12.56502640
GP2	Cl	9.66397083
HSP	Cl	1.76489897
ALP	Cl	3.69358828
FN11	Cl	0.12947108
FN21	Cl	2.97724424
FN31	Cl	1.46749784
FN12	Cl	0.00288899
FN22	Cl	7.09827589
FN32	Cl	2.50002723
USS	Br	-113.48398183
UPP	Br	-76.18720023
ZS	Br	5.73157215
ZP	Br	2.03147582
BETAS	Br	-1.34139841
BETAP	Br	-8.20225991
GSS	Br	17.11563074
GSP	Br	15.62419251
GPP	Br	10.73546293
GP2	Br	8.86056199
HSP	Br	2.23512762
ALP	Br	2.86710532
FN11	Br	0.98689937
FN21	Br	4.28484191
FN31	Br	2.00019696
FN12	Br	-0.92731247
FN22	Br	4.54005910
FN32	Br	2.01617695
USS	I	-74.89997837
UPP	I	-51.41023805
ZS	I	2.53003753
ZP	I	2.31738678
BETAS	I	-4.19316149
BETAP	I	-4.40038412

GSS	I	19.99974131
GSP	I	7.68957672
GPP	I	7.30488343
GP2	I	6.85424614
HSP	I	1.41602940
ALP	I	2.14157092
FN11	I	-0.08147724
FN21	I	1.56065072
FN31	I	2.00002063
FN12	I	0.05914991
FN22	I	5.76111270
FN32	I	2.20488800
END		

6.4 APÊNDICE D: Modificações feitas nos arquivos TOP e MDP de um peptídeo exemplo

Neste apêndice, tomou-se como exemplo um pequeno peptídeo, o His-Ala-Ala-Ser, por ser pequeno e para que a listagem pudesse ser delineada por inteira e sem quebras. Abaixo, encontra-se a listagem dos arquivos TOP e MDP.

6.4.1 Listagem e modificações no arquivo *.top

```

;
;
;   File 'qmmm.top' was generated
;   By user: arlan (1000)
;   On host: akenaton
;   This is your topology file
;   "Proceed, With Fingers Crossed" (TeX)
;
;
; Include forcefield parameters
#include "ffoplsaa.itp"

[ moleculetype ]
; Name          nrexcl
Protein          3

[ atoms ]
; nr      type  resnr residue  atom   cgnr      charge      mass  typeB      chargeB
massB
  1  opls_287   1  HISB     N     1     0.000    14.0067 ; qtot -0.3
  2  opls_290   1  HISB    H1     1     0.000     1.008 ; qtot 0.03
  3  opls_290   1  HISB    H2     1     0.000     1.008 ; qtot 0.36
  4  opls_290   1  HISB    H3     1     0.000     1.008 ; qtot 0.69
  5  opls_293B  1  HISB   CA     1     0.000    12.011 ; qtot 0.94
  6  opls_140   1  HISB   HA     1     0.000     1.008 ; qtot 1
  7  opls_505   1  HISB   CB     2     0.000    12.011 ; qtot 0.703
  8  opls_140   1  HISB  HB1     2     0.000     1.008 ; qtot 0.763
  9  opls_140   1  HISB  HB2     2     0.000     1.008 ; qtot 0.823
 10  opls_507   1  HISB   CG     3     0.000    12.011 ; qtot 1.327
 11  opls_511   1  HISB  ND1     3           0.000    14.0067 ; qtot 0.763
 12  opls_508   1  HISB  CD2     4           0.000    12.011 ; qtot 0.502
 13  opls_146   1  HISB  HD2     4           0.000     1.008 ; qtot 0.685
 14  opls_506   1  HISB  CE1     5           0.000    12.011 ; qtot 0.867
 15  opls_146   1  HISB  HE1     5           0.000     1.008 ; qtot 0.965
 16  opls_503   1  HISB  NE2     6           0.000    14.0067 ; qtot 0.674
 17  opls_235   1  HISB   C     7     0.000    12.011 ; qtot 1.5

```

18	opls_236	1	HISB	O	7	0.000	15.9994	; qtot 1
19	opls_238	2	ALA	N	8	0.000	14.0067	; qtot 0.5
20	opls_241	2	ALA	H	8	0.000	1.008	; qtot 0.8
21	opls_224B	2	ALA	CA	8	0.000	12.011	; qtot 0.94
22	opls_140	2	ALA	HA	8	0.000	1.008	; qtot 1
23	opls_135	2	ALA	CB	9	0.000	12.011	; qtot 0.82
24	opls_140	2	ALA	HB1	9	0.000	1.008	; qtot 0.88
25	opls_140	2	ALA	HB2	9	0.000	1.008	; qtot 0.94
26	opls_140	2	ALA	HB3	9	0.000	1.008	; qtot 1
27	opls_235	2	ALA	C	10	0.000	12.011	; qtot 1.5
28	opls_236	2	ALA	O	10	0.000	15.9994	; qtot 1
29	opls_238	3	ALA	N	11	0.000	14.0067	; qtot 0.5
30	opls_241	3	ALA	H	11	0.000	1.008	; qtot 0.8
31	opls_224B	3	ALA	CA	11	0.000	12.011	; qtot 0.94
32	opls_140	3	ALA	HA	11	0.000	1.008	; qtot 1
33	opls_135	3	ALA	CB	12	0.000	12.011	; qtot 0.82
34	opls_140	3	ALA	HB1	12	0.000	1.008	; qtot 0.88
35	opls_140	3	ALA	HB2	12	0.000	1.008	; qtot 0.94
36	opls_140	3	ALA	HB3	12	0.000	1.008	; qtot 1
37	opls_235	3	ALA	C	13	0.000	12.011	; qtot 1.5
38	opls_236	3	ALA	O	13	0.000	15.9994	; qtot 1
39	opls_238	4	SER	N	14	0.000	14.0067	; qtot 0.5
40	opls_241	4	SER	H	14	0.000	1.008	; qtot 0.8
41	opls_283	4	SER	CA	14	0.000	12.011	; qtot 0.84
42	opls_140	4	SER	HA	14	0.000	1.008	; qtot 0.9
43	opls_157	4	SER	CB	15	0.000	12.011	; qtot 1.045
44	opls_140	4	SER	HB1	15	0.000	1.008	; qtot 1.105
45	opls_140	4	SER	HB2	15	0.000	1.008	; qtot 1.165
46	opls_154	4	SER	OG	16	0.000	15.9994	; qtot 0.482
47	opls_155	4	SER	HG	16	0.000	1.008	; qtot 0.9
48	opls_271	4	SER	C	17	0.000	12.011	; qtot 1.6
49	opls_272	4	SER	O1	17	0.000	15.9994	; qtot 0.8
50	opls_272	4	SER	O2	17	0.000	15.9994	; qtot 0

[bonds]

; ai	aj	funct	c0	c1	c2	c3
1	2	5				
1	3	5				
1	4	5				
1	5	5				
5	6	5				
5	7	5				
5	17	5				
7	8	5				
7	9	5				
7	10	5				
10	11	5				
10	12	5				
11	14	5				
12	13	5				

Valores trocados de 1 para 5. O número 1, no campo de forças OPLS-AA, funciona para chamar rotinas referentes à ligações entre átomos clássicos e, o número 5 tem a função de tratar estes átomos como quânticos, chamando o programa MOPAC.

```

12 16 5
14 15 5
14 16 5
17 18 5
17 19 5
19 20 5
19 21 5
21 22 5
21 23 5
21 27 5
23 24 5
23 25 5
23 26 5
27 28 5
27 29 5
29 30 5
29 31 5
31 32 5
31 33 5
31 37 5
33 34 5
33 35 5
33 36 5
37 38 5
37 39 5
39 40 5
39 41 5
41 42 5
41 43 5
41 48 5
43 44 5
43 45 5
43 46 5
46 47 5
48 49 5
48 50 5

```

```

; Include Position restraint file

```

```

#ifdef POSRES

```

```

#include "posre.itp"

```

```

#endif

```

```

; Include water topology

```

```

#include "tip4p.itp"

```

```

#ifdef POSRES_WATER

```

```

; Position restraint for each water oxygen

```

```

[ position_restraints ]

```

```

; i funct      fcx      fcy      fcz

```

```

1 1      1000      1000      1000

```

```

#endif

; Include generic topology for ions
#include "ions.itp"

[ system ]
; Name
Protein in water

[ molecules ]
; Compound      #mols
Protein          1
SOL              1483

```

6.4.2 Listagem exemplo de modificações no arquivo *.mdp

```

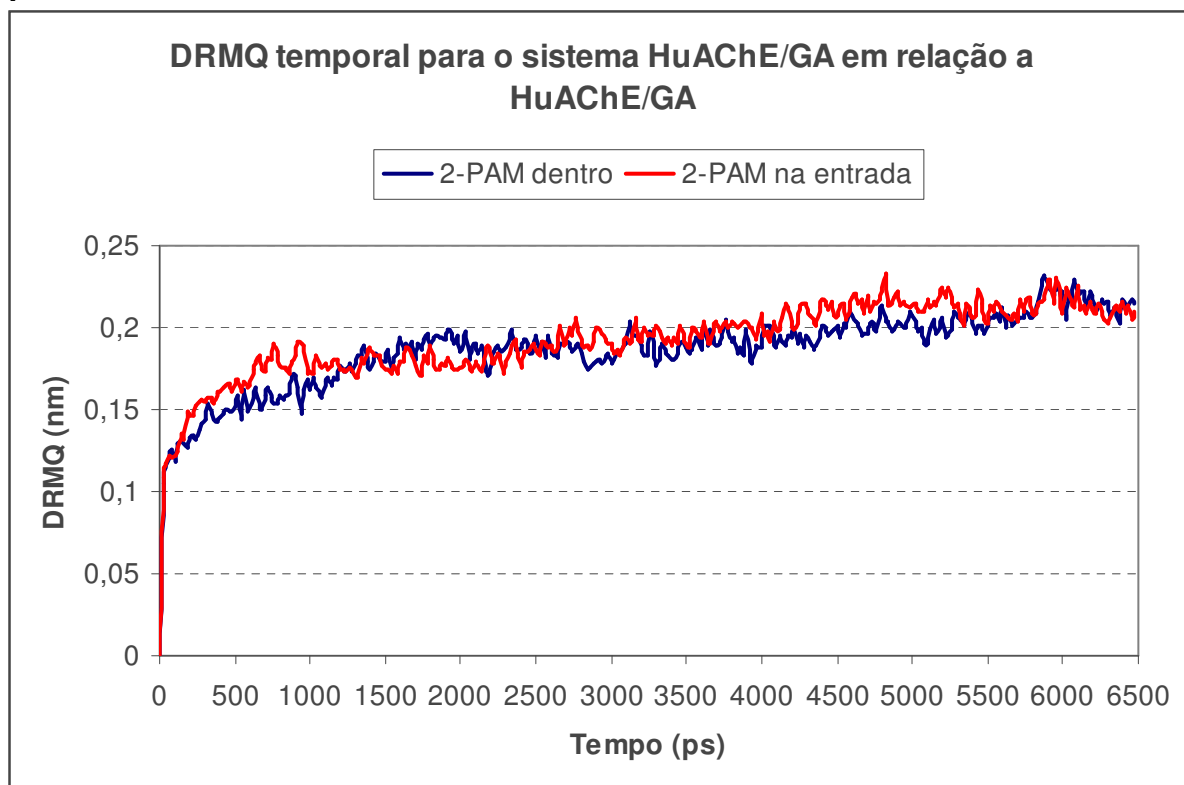
title           = min_steepest_descent
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
integrator      = steep
tinit          = 0
dt             = 0.001
nsteps         = 5000
nstcomm        = 1
comm_grps      = system
emtol          = 100.0
emstep         = 0.0001
nstxout        = 10
nstvout        = 10
nstfout        = 10
nstlog         = 1
nstenergy      = 1
nstxtcout      = 1
xtc-precision  = 1000
xtc_grps       = system
energy_grps    = Protein
nstlist        = 10
ns_type        = grid
pbc            = xyz
rlist          = 1.0
coulombtype    = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb       = 1.0
epsilon_r      = 1.0
vdwtype       = Cut-off
rvdw-switch    = 0
rvdw          = 1.0

```

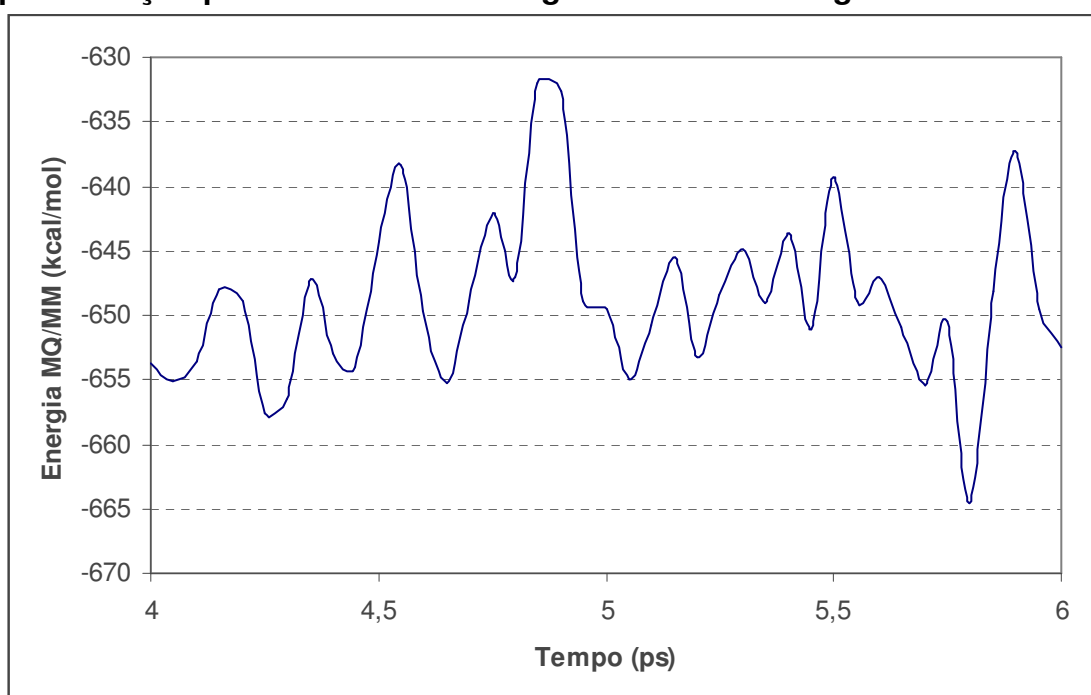
DispCorr = No
; PARA CHAMAR O MOPAC, FOI ADICIONADO
; O QUE SE SEGUE.
QMMM = yes
QMMM-grps = Protein
QMmethod = AM1
QMbasis = STO-3G
QMMMscheme = ONIOM
QMcharge = -1
QMmult = 1
constraints = none

6.5 APÊNDICE E: Resultados adicionais

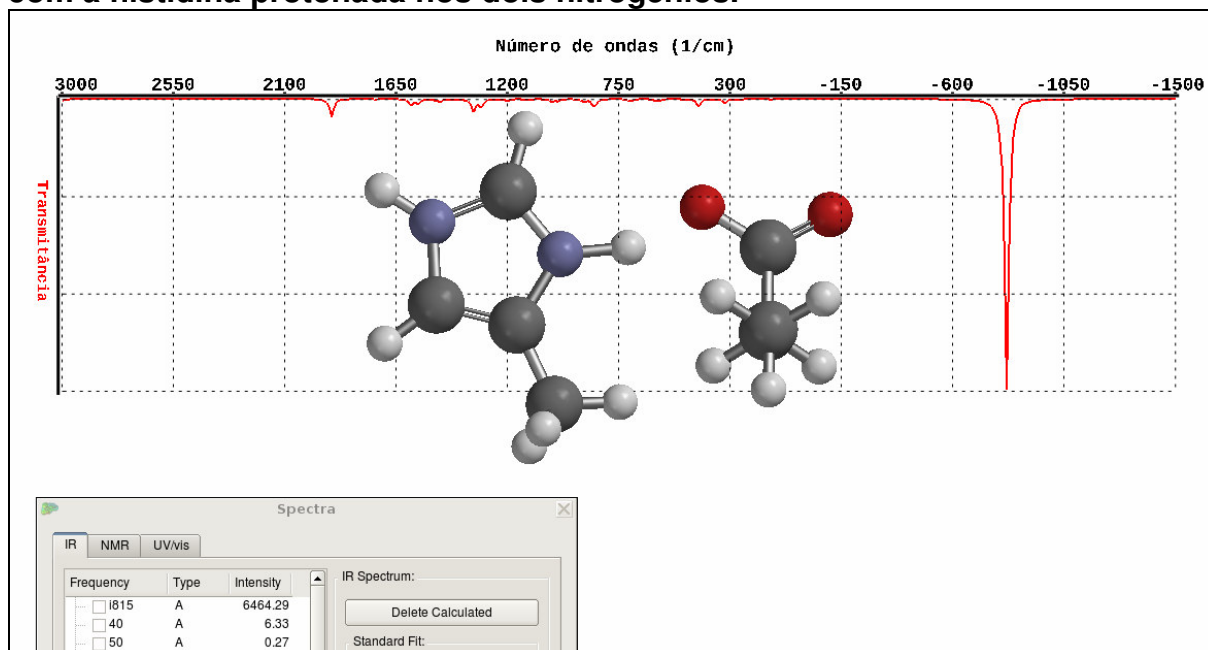
E.1 DRMQ das duas simulações por DM clássicas em relação ao primeiro quadro.



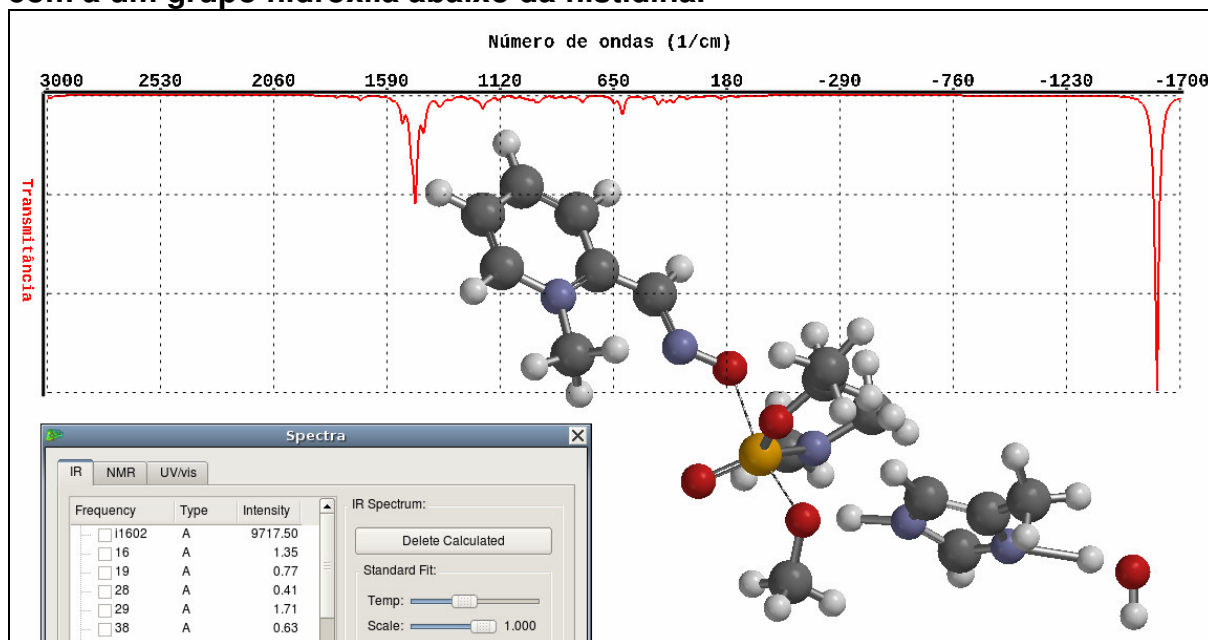
E.2 Extensão de mais 1 ps da simulação por DM/MQMM referente a segunda etapa de reação para o cálculo da energia MQ/MM dos reagentes.



E.3 Frequência imaginária no infravermelho para a primeira etapa de reação, com a histidina protonada nos dois nitrogênios.



E.4 Frequência imaginária no infravermelho para a terceira etapa de reação, com a um grupo hidroxila abaixo da histidina.



6.5 APÊNDICE F: Publicações geradas durante o doutorado

ARTIGO I

Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun

Arlan da S. Gonçalves,^a Tanos C. C. França,^a Alan Wilter^b and José D. Figueroa-Villar^{*,a}

^a*Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia, Pça General Tibúrcio 80, 22290-270 Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

^b*Biblioteca - Memória Técnico-Científica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE/MCT), Av. dos Astronautas, 1758 - Jardim da Granja, 12227-010 São José dos Campos-SP, Brazil*

Reativadores eficientes de Acetilcolinesterase são fundamentais para o desenvolvimento de antídotos contra o envenenamento por pesticidas neurotóxicos e agentes de guerra química. Todavia, o mecanismo da reação de reativação e as características estruturais dos reativadores conhecidos são pouco compreendidos. Com o objetivo de estudar o comportamento dinâmico e o efeito da carga líquida do antídoto na reativação desta enzima, foi conduzido um estudo por dinâmica molecular da acetilcolinesterase humana inibida por tabun em complexo com o antídoto pralidoxima e com seu análogo deazapralidoxima nas formas neutra e aniônica. Os resultados mostraram que a carga positiva da pralidoxima é importante para sua admissão e permanência dentro do sítio ativo. Além disso, os análogos, diferente da pralidoxima, quando colocados dentro do sítio ativo, se distanciam do resíduo serina fosforilado da enzima e são repelidos pelo potencial eletrostático na entrada do canal que conduz ao sítio ativo.

Efficient acetylcholinesterase reactivators are fundamental for the development of antidotes against poisoning by neurotoxic pesticides and chemical warfare agents. However, the mechanism of the reactivation reaction and the structural characteristics of the known reactivators are poorly understood. In order to study the dynamic behavior and the effect of the antidote net charge in the reactivation of this enzyme, we carried out a molecular dynamics study of human acetylcholinesterase inhibited by tabun in complex with the antidote pralidoxime and with its deaza analogues in the neutral and anionic forms. Results show that the positive charge of pralidoxime is important for its admission and permanence inside the active site. Also, the analogues, unlike pralidoxime, when forced inside the active site, move away from the phosphorylated serine residue of the enzyme and are repelled by the electrostatic potential at the entrance of the channel that conducts to the active site.

Keywords: acetylcholinesterase, molecular dynamics, tabun, antidotes, neurotoxic agents

Introduction

The intensive use of neurotoxic organophosphorous compounds as pesticides in agriculture, as well as their potential use as mass destruction agents in chemical warfare, has attracted attention to the development of efficient antidotes for this type of poisoning.^{1,2} However, the knowledge on the appropriate treatment for patients exposed to this kind of compounds is limited to few groups of physicians around the world.^{1,2}

One particularly important family of lethal tactical warfare chemicals is the group known as the nerve agents, which are closely related in chemical structure and biological action to many commonly used organophosphorous insecticides, but which are much more lethal.^{1,2}

The nerve agents are esters of phosphoric acid and are potent inhibitors of acetylcholinesterase, a fundamental enzyme for ending nervous impulses. These compounds inhibit all acetylcholinesterases, including the human enzyme (HuAChE), by phosphorylating a serine hydroxyl group (Ser203 in HuAChE), which is directly responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. This reaction occurs

*e-mail: figueroa@ime.eb.br

very rapidly and can lead to irreversible inhibition by a process called aging.³ Before aging, the inhibition of AChE can be reversed by dephosphorylation of the serine residue by a nucleophile, usually an oxime. In fact, it is believed that the hydroxyl group of the oxime carries out a nucleophilic attack on the phosphorylated serine residue, removing the phosphate moiety and reactivating the enzyme,³ as shown in Figure 1. Accordingly, the standard treatment for intoxication with nerve agents involves the administration of an anticholinergic drug, usually intravenous atropine, and a cationic oxime, like pralidoxime (2-PAM).³

In a previous work⁴ it was shown, by *ab initio* calculations, that considering the two forms of 2-PAM that are available in physiologic conditions, the protonated form is the most flexible and displays a greater negative charge at the oxime oxygen. Similar results were obtained for the bicationic oxime HI-6 (1-(2-hydroxyimino-1-methylpyridine)-1-(4-carboxyiminopyridine)-dimethyl ether hydrochloride).⁵

In this work, we have used docking and molecular dynamics studies to determine the role of the net charge of oximes as antidotes for tabun (GA) inhibition in HuAChE. For this, we carried out molecular dynamics simulations for 2-PAM and its deaza analogue in its neutral form (DZP) and its anionic form (DZP_{anion}), inside and outside the active site of HuAChE inhibited with GA.

Methodology

The crystallographic structure of HuAChE refined at 2.76 Å of resolution and complexed with fasciculin-II (PDB code 1B41) obtained by Kryger *et al.*,⁶ in early 1999, using X-ray Diffraction, left some missing residues between the amino acids Pro492 and Pro495 and Pro258 and Asn265. These missing residues were modeled using the complete FASTA format sequence

of HuAChE fitted over the incomplete 3D structure without the Fasciculin-II, by means of the Swiss-PdbViewer program.⁷ Further, this alignment was submitted to the Optimize mode of the Swiss-Model server^{8,9} that generated the initial complete model of the target enzyme. This model was minimized using the GROMOS 87 force field,¹⁰ implemented in the computational package GROMACS 3.2.1^{10,11} until a gradient of 418 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ (10 kcal mol⁻¹ Å⁻¹). The steepest descent algorithm was employed during this minimization procedure and the minimized model was further submitted to the BIOTECH server¹² for validation.

2-PAM, DZP and DZP_{anion} were manually fitted at a conformation proposed by Castro *et al.*⁴ as the best one for a good interaction with HuAChE inhibited with GA. After that, the coordinates of neutral DZP, DZP_{anion}, 2-PAM and SGA (Serine 203 bonded with GA) were submitted to the Dundee PRODRG Server¹³ in order to obtain the topologies needed for posterior MD simulations with the GROMACS 3.2.1 package.^{10,11} As the GROMOS 87 force field¹⁰ does not present topologies for other moieties than aminoacids or nucleotides, the parameters for the SGA atoms, bonded lengths, angles and dihedral angles were added to their databank (*ffgmx.rtp file*)¹⁴ in order to create a residue having a covalent bond between GA and Ser203 (*aminoacids.dat file*).¹⁴ Charge calculations for 2-PAM, DZP, DZP_{anion} and SGA atoms were carried out using the software GAMESS US¹⁵ at the Hartree-Fock/6-31G* level and using the CHELPG algorithm. These values are shown in Table 1. After parametrization and charge calculations, the HuAChE molecules with Ser203 replaced by SGA were manually docked with 2-PAM, DZP and DZP_{anion} inside and outside the active site, giving origin to nine enzyme-tabun-antidote systems, which were called HuAChE-GA-ANT systems. All

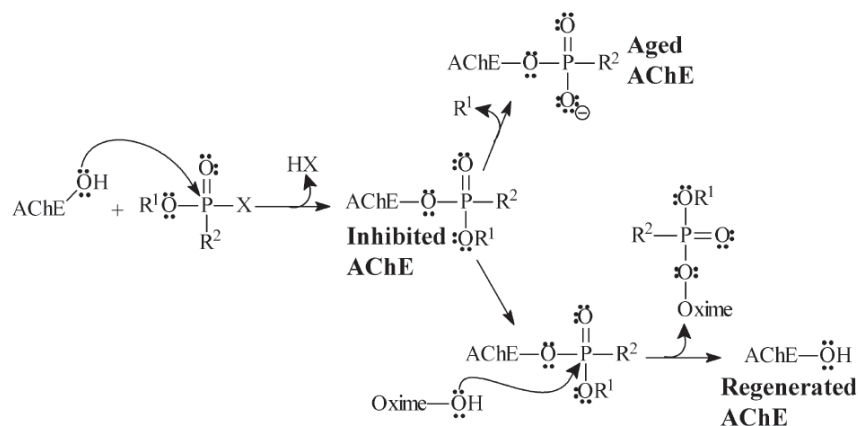
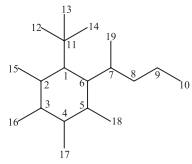


Figure 1. Inhibition, desinhibition and aging of acetylcholinesterase. X is the leaving group.

these systems were further submitted to energy minimizations and MD simulations steps. The structures of GA, 2-PAM, DZP and DZP_{anion} are presented in Figure 2.

Table 1. Calculated charges for 2-PAM, DZP and DZP_{anion} atoms using GAMESS US¹⁵ at the Hartree-Fock/6-31G* level with the CHELPG algorithm



Atom	Atom type	2-PAM	DZP	DZP _{anion}
1	C/N*	-0.4126	0.0117	-0.0729
2	C	0.2327	-0.1574	-0.1324
3	C	-0.2249	-0.0930	-0.2966
4	C	0.2208	-0.1111	-0.0134
5	C	-0.3217	-0.0713	-0.1145
6	C	0.4666	-0.0044	0.1421
7	C	0.2625	0.1374	-0.3039
8	N	-0.2124	-0.2845	0.0353
9	O	-0.3879	-0.5159	-0.6187
10	H	0.4626	0.4623	-
11	C	-0.0314	0.0627	0.0786
12	H	0.1400	0.0286	-0.0288
13	H	0.0861	-0.0361	-0.0294
14	H	0.0980	-0.0253	-0.0377
15	H	0.1356	0.1047	0.0904
16	H	0.1362	0.1030	0.1006
17	H	0.1049	0.0977	0.0446
18	H	0.1527	0.0920	-0.0015
19	H	0.0922	0.1988	0.1582

* In 2-PAM atom 1 is N. In DZP and DZP_{anion} atom 1 is C.

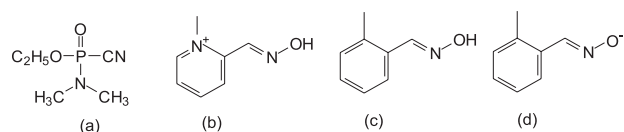


Figure 2. Chemical structures of: (a) GA (Tabun); (b) 2-PAM (Pralidoxime); (c) DZP (Deazapralidoxime); (d) DZP_{anion} (Anionic DZP).

Previous to the MD simulations each system was placed inside a 722.86 nm³ cubic box containing 21,332 water molecules and their energy minimized by the steepest descent algorithm, until reaching a gradient of 418 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ (10 kcal mol⁻¹ Å⁻¹). The subsequent MD steps were carried out according to the following procedure: first, 50 ps of molecular dynamics at 300 K, with all atoms having positions restrained except for the water molecules inside the box. This initial MD was necessary in order to allow for the equilibration of the solvent molecules around the protein. Then, there were carried out the full MD simulations of 1000 ps at 300K with no restrictions, using 2 fs of integration time,

PME^{16,17} for long-range electrostatic interactions, with 1.4 nm in the real space, and a cut-off of 1.4 nm for long-range van der Waals interactions. As a whole, 50 conformations were stored during each simulation. The pair-lists were updated every 1000 steps. For each compound there were carried out three MD simulations. The first one with an initial position of the compound inside the inhibited enzyme active site, at 0.3 nm between the phosphorous atom of SGA and the oxygen atom of the oximes, the second also inside the active site but with an O-P distance of 0.5 nm, and the last one with the compound at the entrance of the well that leads to the active site (O-P distance of 1.2 nm).

The electrostatic potential surfaces of HuAChE, 2-PAM, DZP and DZP_{anion} were calculated with the APBS software,^{18,19} which may be added as a plugin to PYMOL.²⁰ The method of Poisson-Boltzmann,^{19,21-23} with a dielectric constant equal to 20, was used for calculation of the electrostatic potential surfaces of 2-PAM, DZP, DZP_{anion} and the protein active site. The temperature was set to 310 K for all the calculations and the variation of electrostatic potential was between -1 and + 1 kT e⁻¹ for the active site of HuAChE and for the compounds. Finally, the softwares MOLMOL,²⁴ PYMOL²⁰ and GRACE,²⁵ were used to visualize and analyze the results of the MD simulations.

The hardware resources used in this work were a PC AMD Athlon 2,000 MHz and a cluster of computers composed by five 2.4 GHz Pentium IV CPUs and the real time of each MD simulation was of about 10 days.

Results and Discussion

Homology modeling and active site determination

After incorporating the missing residues from the initial crystallographic structure of HuAChE,⁶ the SWISS-MODEL server^{8,9} produced our complete HuAChE model where the first loop was completed by residues Pro259, Gly260, Gly261, Thr262, Gly263 and Gly264 and the second loop was completed by residues Arg493 and Asp494. The complete enzyme model is shown in Figure 3.

The Ramachandram plot for the model (see Supplementary Information) obtained from the PROCHECK site,²⁶ presented 98.7 % of the residues at the most favorable regions and only 1.3 % of the residues in the other regions. Regarding the main chain properties of the modeled loops, no considerable bad contacts, nor C_α tetrahedron distortion, nor hydrogen-bond energy problems, were found. Moreover, the average G factor, the measure of the normality degree of the protein properties, was 0.1, which is within the permitted values for homology models. Also,

there were not found any distortions of the side chain torsion angles. Accordingly, and since our complete model was based on the crystallographic structure, the model was considered appropriate to study the dynamics of the compounds inside the active site of the enzyme.

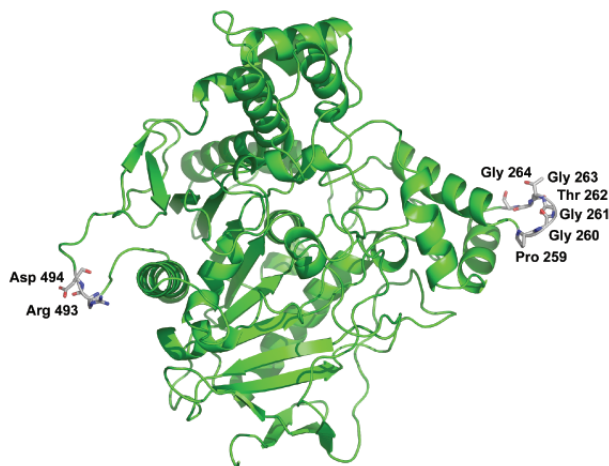


Figure 3. Human acetylcholinesterase with the two modeled loops. Figure prepared with the program PYMOL.²⁰

The identification of the residues belonging to the active site of HuAChE was obtained by the sequence alignment between HuAChE and the crystallographic structure of AChE from *Torpedo californica* (TcAChE, PDB code 1EA5)²⁷ and also by comparison with the residues reported by Shafferman *et al.*,²⁸ Enyedy *et al.*²⁹ and Ariel *et al.*³⁰ For example, 84% of the aminoacids of the active site of HuAChE were identical to the residues of the TcAChE active site as shown in Table 2.

Table 2. Comparison between the active site's aminoacids of HuAChE and TcAChE

TcAChE	HuAChE	TcAChE	HuAChE
Gln-69	Gln-71	Ala-201	Ala-204
Tyr-70	Tyr-72	Trp-233	Trp-236
Asp-72	Asp-74	Trp-279	Trp-286
Gln-74	Leu-76	Leu-282	Leu-289
Ser-81	Thr-83	Ser-286	Ser-293
Trp-84	Trp-86	Ile-287	Val-294
Asn-85	Asn-87	Phe-288	Phe-295
Gly-117	Gly-120	Arg-289	Arg-296
Gly-118	Gly-121	Phe-290	Phe-297
Gly-119	Gly-122	Glu-327	Glu-334
Phe-120	Phe-123	Phe-330	Tyr-337
Tyr-121	Tyr-124	Phe-331	Phe-338
Ser-122	Ser-125	Tyr-334	Tyr-341
Gly-123	Gly-126	Gly-335	Gly-342
Ser-124	Ala-127	Trp-432	Trp-439
Leu-127	Leu-130	His-440	His-447
Tyr-130	Tyr-133	Gly-441	Gly-448
Glu-199	Glu-202	Tyr-442	Tyr-449
Ser-200	Ser-203	—	Glu-450

* Non matching residues are shown in bold.

Molecular dynamics simulations

In order to have an insight on the behavior of the three compounds inside and outside the inhibited active site of HuAChE, there were carried out manual dockings of 2-PAM, DZP and DZP_{anion} inside the active site of HuAChE bound to GA, halfway inside the well that conducts to the active site, and at the entrance of the well. It is important to notice here that in a previous work, Castro and Figueroa-Villar,⁴ performed a complete conformational and docking study of 2-PAM inside TcAChE active site inhibited by GA and established the conformation used in that work as the most favorable for interaction with SGA. Accordingly, the optimal complex of that work was used as starting position for the dynamics studies inside the active site of HuAChE in the present work. The position of the compounds during the different MD simulations was monitored using the distance between the phosphorous atom of SGA and the oxygen atom of the oximes. The initial distances for the three different MD simulations for each compound were 0.30 nm, 0.50 nm and 1.26 nm. These nine HuAChE-GA-ANT systems were submitted to 50 ps of position-restrained MD (PRMD) followed by 1000 ps of MD simulations with no restriction, as described in the methodology section. Then, there were conducted calculations of temporal RMSD on each system for 1000 frames generated at each 1 ps of MD simulation. In this case the result is a unique general value for each system monitored throughout time. Taking into account that the complexes could float inside the water box, each frame was adjusted to the former by the minimum squares method when calculating the standard deviation. In Figure 4, one can see the system equilibration after 250 ps by the stabilization of the RMSD for the systems HuAChE-GA-ANT. This behavior was common to all MD simulations, with deviations never over 0.25 nm after stabilization. We also observed that, for all simulations, the temporal RMSD of HuAChE-GA-ANT practically does not change with time, thus indicating the dynamic stability of the systems.

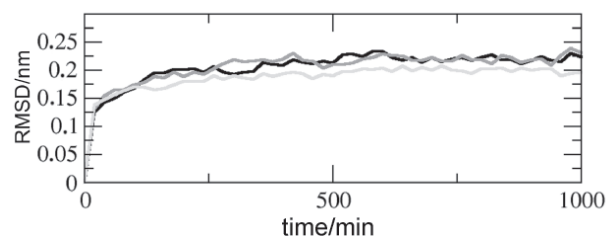


Figure 4. Temporal RMSD of inhibited HuAChE with 2-PAM (black), DZP (dark gray) and DZP_{anion} (gray). Figure prepared with the program GRACE.²⁵

The spatial RMSD on each aminoacid residue was also calculated in the time range of 0 to 1000 ps, at each 20 ps, totalizing 50 frames. Figure 5 shows the qualitative illustration, in the sausage representation, of the spatial RMSD for the HuAChE-GA-ANT system. Analyzing Figure 5 we can observe that the most mobile regions along the MD simulations (major values of RMSD and major thickness in the sausage representation) correspond to the residues near the N and C-terminal of each monomer and to the loops. On the other hand, the residues in the active site region and at the α -helixes and β -sheets present lower values, revealing to be more stable regions, as expected.

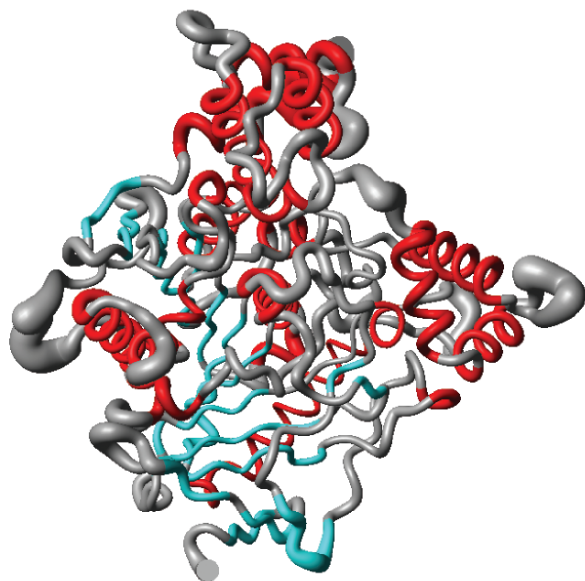


Figure 5. Sausage representation of the spatial RMSD for the system HuAChE-GA-ANT. Figure prepared with the program MOLMOL.²⁴

Analysis of the dynamic behavior of 2-PAM, DZP and DZP_{anion} inside and outside the active site of HuAChE

In order to analyze and compare the dynamic behavior of 2-PAM and the neutral and anionic forms of DZP, inside and outside the active site of HuAChE along the MD simulations, we extracted one frame at each 20 ps of MD simulation totalizing 50 frames for each system. The interactions of each compound with HuAChE active site were analyzed by evaluating the distance variation between the phosphorous atom of SGA and the oxime oxygen atoms of 2-PAM and the neutral and anionic forms of DZP. As described in the experimental section, this procedure afforded, for each compound, three HuAChE-GA-ANT systems further submitted to 1000 ps of MD simulations.

Our results showed that, when placed inside the active site (O-P distance 0.3 nm) 2-PAM and DZP move

away from SGA, stabilizing at 0.5 nm, while DZP_{anion} moves further away, stabilizing at 0.7 nm (Figure 6a). When the initial position is 0.5 nm away from SGA, 2-PAM remains at that distance while DZP shows a tendency to move further apart, stabilizing at 0.7 nm and DZP_{anion} clearly moves away to 0.8 nm. (Figure 6b). The plot in Figure 6c show the distance variations when the compounds are placed outside the active site at 1.26 nm from SGA. It is clear that in this case 2-PAM approaches the active site moving about 0.50 nm inside the well. On the other hand, DZP and DZP_{anion} move away from SGA by 0.30 and 0.60 nm, respectively, showing that these molecules are being expelled from the entrance of the HuAChE active site conducting well.

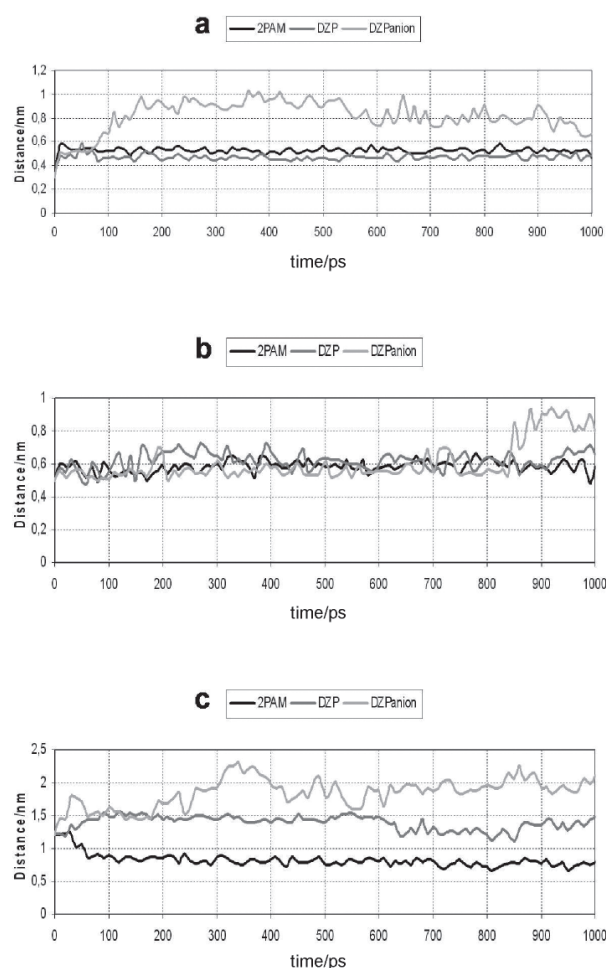


Figure 6. Distance variations between the phosphorous atom of GA and the oxygen of 2-PAM (black), DZP (dark gray) and DZP_{anion} (gray) when docked: a) Inside the HuAChE active site; b) Halfway inside the well that conducts to the active site and c) At the entrance of the well. Figures prepared with softwares PYMOL²⁰ and GRACE.²⁵

When the compounds are placed the closest to SGA, all move away. The fact that even 2-PAM moves away from SGA in this case simply indicates that 0.30 nm is

too close to the phosphorylated serine and that some steric hindrance repulsions are active. However, 2-PAM is able to periodically approach SGA during the MD simulation, thus showing that it could be able to react with SGA to free the serine residue. When all the compounds are at an initial 0.50 nm from SGA, 2-PAM remains close to that position while DZP and its anionic form moves away. In this case, the aromatic rings of 2-PAM, DZP and anionic DZP remain, along the MD simulations, buried in a negative pocket defined by the side chains of Asp74, Trp86, Tyr124, Ser125, Tyr337, Tyr341 and Tyr449. 2-PAM remained all the time inside the active site, as it was located at the proper position for interaction with Trp86 (Figure 7a). On the other hand, DZP was located in a favorable position for hydrogen bond formation with Tyr337, thus also remaining most of the time inside the active site (Figure 7b). Despite its great oscillations, we believe that the anionic form of DZP was not further moved away from the active site simply because it was able to establish electrostatic interactions with Tyr341 and Phe297, and a hydrogen bond with Tyr124 (Figure 7c), but the clear tendency of this compound is to eventually leave the well of access to the active site of HuAChE. In fact, when all the compounds are set just outside the well, only 2-PAM moves inside the well while DZP and DZP_{anion} are completely expelled.

To explain the differences in the dynamic behavior observed for 2-PAM and its deaza analogues, we

decided to compute the electrostatic contours for HuAChE, 2-PAM, DZP and DZP_{anion} using the APBS software.^{18,19} In those results, presented in Figure 8, the blue surface connects all points having a positive potential and the red surface connects all points having a negative potential while the light gray surfaces are neutral. The analysis of Figure 8 reveals that the active site cavity of HuAChE is a continuous region of negative electrostatic potential while 2-PAM presents a totally positive electrostatic potential surface, DZP_{anion} is almost totally negative and DZP is practically neutral. This suggests that molecules with a net positive charge like 2-PAM could be attracted to the active site cavity of HuAChE while neutral or negative molecules, like its DZP analogues, could be repelled, in perfect agreement with the results of the MD simulations. However, since some neutral molecules are able to enter the active site of this enzyme it is still possible that DZP could, by other means than simple electrostatic interactions, reach the active site of HuAChE.

The calculation of the relative binding affinities for the complexes would provide a more quantitative measure of the electrostatics, desolvation and apolar contributions of the interaction of the antidotes with the inhibited enzyme, however, in this work we used the electrostatic contours in a qualitative way, and the binding affinities were not calculated but will be discussed in detail in another article.³¹

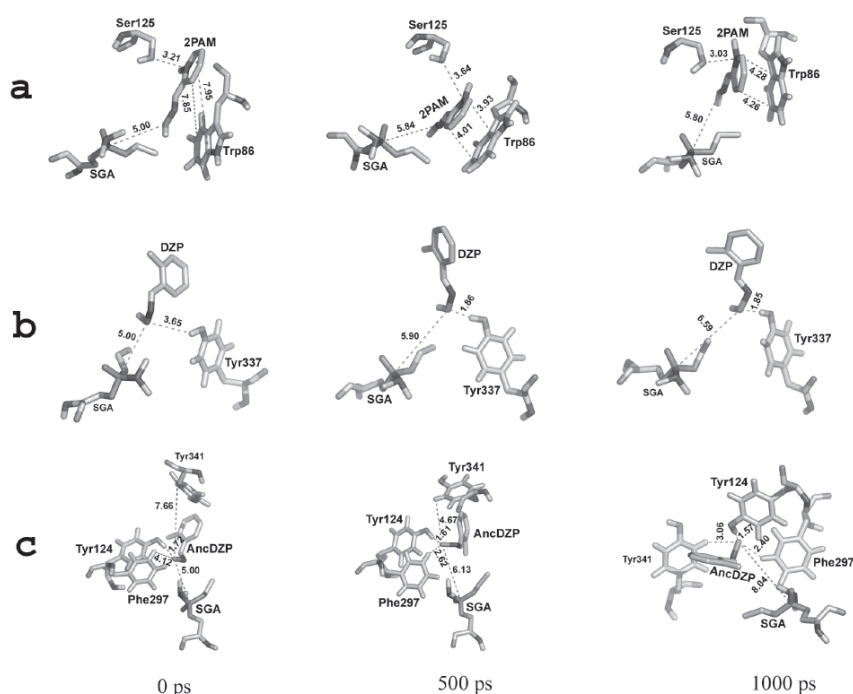


Figure 7. Interactions of: a) 2-PAM, b) DZP and c) DZP_{anion} with residues of the active site of HuAChE when docked at 0.5 nm from SGA. Figure prepared with the software PYMOL.²⁰

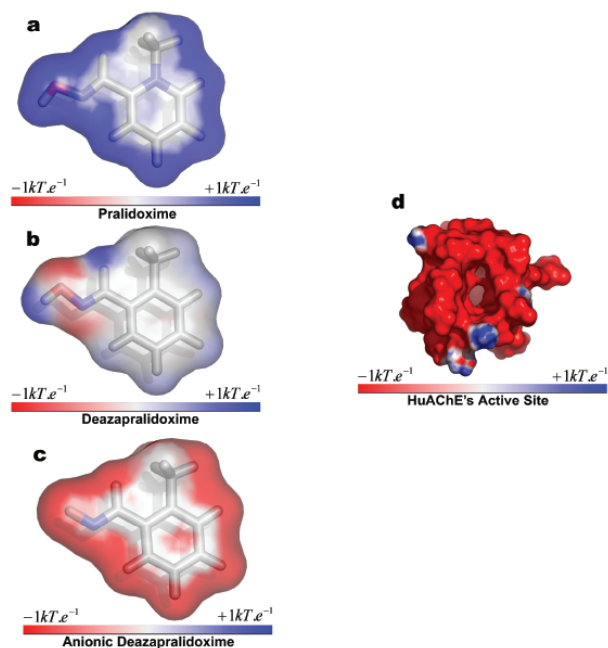


Figure 8. Electrostatic surface of: a) 2-PAM, b) DZP and c) DZP_{anion} and d) HuAChE. Negative regions are shown in red, positive regions in blue and neutral in gray. Figure prepared with the software PYMOL.²⁰

Conclusions

The molecular dynamics simulations of 2-PAM, DZP and DZP_{anion} at different positions in relation to the phosphorylated Ser203 of HuAChE inhibited with the neurotoxic warfare agent tabun, showed that the positive charge of 2-PAM is very important for the transportation of this compound to the active site of this enzyme. It was shown that the neutral analogue DZP and its anion have a tendency to leave the active site of HuAChE, a process that, in this study, was interrupted by the establishment of intermolecular interactions of those compounds with some side chain residues of aminoacids in the gorge. Tai *et al.*³² report an opening and closing movement of the gorge in studies of MD simulations with mouse AChE. Bui *et al.*³³ have shown that this local conformational fluctuations of the gorge residues and large scale collective motions of the protein correlate highly with the crossing of tetramethylammonium by the AChE gorge. Those fluctuations could also be involved in the retention of DZP inside the gorge.

Despite the possibility of neutral compounds being able to reach the active site of AChE, our results show that the neutral and the anionic analogues of 2-PAM would not be able, or would be seriously hindered in relation to 2-PAM, to enter the well that conducts to the active site of HuAChE, due to their electrostatic repulsion or the lack of electrostatic attraction with the well. We believe

that those results could be extrapolated to all other cationic oximes used as antidotes for organophosphorous compounds intoxication.

According to our results, when 2-PAM is initially set at 0.3 nm from the phosphorylated serine residue it moves 0.2 nm away, to what it looks to be its most stable position inside the active site of tabun-inhibited HuAChE. At this new position, the oxygen atom of 2-PAM is 0.5 nm away from the phosphorous atom of the phosphorylated serine, thus making necessary that the antidote moves to a distance of about 0.3 nm in order to start the dephosphorylation reaction. This proximity between 2-PAM and the phosphorylated serine is periodically reached after the dynamic stabilization of the system.

The results obtained in this work suggest that oximes that could change their charge from positive to neutral or negative after phosphorylation would be able to more effectively leave the active site of AChE. This behavior would minimize the reversion of the dephosphorylation of AChE, a phenomenon that is a real problem with the actual antidotes. Those results are now being used to design new and potentially more effective antidotes for organophosphate intoxication.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian agencies CNPq, FAPERJ and CAPES (Pró-Defesa) for financial support.

Supplementary Information

The Ramachandram plot for the model obtained from the PROCHECK site is available free of charge at <http://jbc.ssbq.org.br>, as PDF file.

References

1. Tafuri, J.; Roberts, J.; *Ann. Emerg. Med.* **1987**, *16*, 193.
2. Koelle, G.B.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1981**, *1*, 129.
3. Eddleston, M.; Szinicz, L.; Eyer P.; Buckley, N.; *QJM-Ass. Int. J. Med.* **2002**, *95*, 275.
4. Castro, A.T.; Figueroa-Villar, J.D.; *Int. J. Quant. Chem.* **2002**, *89*, 143.
5. da Silva, G.R.; Júnior, I.B.; Figueroa-Villar, J.D.; *Int. J. Quant. Chem.* **2005**, *105*, 260.
6. Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Acta Crystallogr.* **2000**, *56*, 1385.
7. Guex, N.; Peitsch, M. C.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714.

8. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C.; *Nucl. Ac. Res.* **2003**, *31*, 3381.
9. Peitsch, M. C.; *Biotechnology* **1995**, *13*, 656.
10. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R.; *Comp. Phys. Comm.* **1995**, *91*, 43.
11. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. J.; *Mol. Mod.* **2001**, *7*, 306.
12. <http://biotech.ebi.ac.uk:8400/>, accessed in August 2004.
13. Schuettelkopf, A.W.; van Aalten, D. M. F.; *Acta Crystallogr.* **2004**, *D60*, 1355.
14. van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C.; *Gromacs User Manual*, version 3.1.1, Groningen, The Netherlands, 2002.
15. Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A.; *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347.
16. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
17. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G.; *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577.
18. Baker, N. A.; *APBS 0.3.2 User Guide. Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, Washington University in St. Louis Department of Biochemistry and Molecular Biophysics Center for Computational Biology, Washington University, St. Louis, 2004.
19. Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10037.
20. DeLano, W. L.; Bromberg, S.; *PyMOL User's Guide*, DeLano Scientific LLC: San Francisco-CA, 2004.
21. Holst, M.; Baker, N.; Wang, F.; *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1319.
22. Baker, N.; Holst, M.; Wang, F.; *J. Comput. Chem.*, **2000**, *21*, 1343.
23. Baker, N. A.; Sept, D.; Holst, M. J.; McCammon, J. A.; *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 427.
24. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51.
25. Turner, P. J.; Grace Development Team [<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>], Copyright (c) 1996-2004 accessed in august 2004.
26. Laskowski, R. A.; Macarthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.; *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283.
27. Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T.; *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 713.
28. Shafferman, A.; Ordentlich, A.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Velan, B.; *Biochem. J.* **1996**, *318*, 833.
29. Enyedy, I. J.; Kovach, I. M.; Bencsura, A.; *Biochem. J.* **2001**, *353*, 645.
30. Ariel, N. Ordentlich, A.; Barak, D.; Bino, T.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Biochem. J.* **1998**, *335*, 95.
31. We thank the referee for this suggestion.
32. Bui, J. M.; Henchman, R. H.; McCammon, J. A.; *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2267.
33. Tai, K.; Shen, T.; Börjesson, U.; Philipoulos, M.; McCammon, J. A.; *Biophys. J.* **2001**, *81*, 715.

Received: September 12, 2005

Published on the web: July 6, 2006

FAPESP helped in meeting the publication costs of this article.

ARTIGO II

Conformational Analysis of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 using PM6 and RM1 Methods

Arlan da Silva Gonçalves,^a Tanos C. C. França,^b
José D. Figueroa-Villar^b and Pedro G. Pascutti^{*,a}

^aInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
21941-902 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^bDivisão de Ensino e Pesquisa, Seção de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia,
22290-270 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Neste trabalho, após validação por comparação com resultados obtidos por DFT, os métodos semi-empíricos PM6 e RM1 foram utilizados para análise conformacional de três oximas usadas em defesa química. Os resultados sugerem conformações de menor energia destes compostos que poderão ser utilizadas em futuras parametrizações para estudos por modelagem molecular.

In this work, after validation by comparison with results obtained by DFT, the semi-empirical methods RM1 and PM6 were employed to perform conformational analysis of three oximes employed in chemical defense. The results suggested low energy conformations for those compounds that could be useful in further parameterizations for molecular modeling studies.

Keywords: acetylcholinesterase, conformational analysis, oximes, neurotoxic agents

Introduction

The intensive use of neurotoxic organophosphorous compounds (OPCs) as pesticides in agriculture, as well as their potential use as chemical warfare agents, has attracted the attention of the scientific community to develop efficient antidotes for this class of poisons.

One particularly important family of chemicals used in tactical warfare is the group broadly defined as nerve agents. They are closely related in chemical structure and biological action to many commonly used organophosphorous insecticides, but they are much more lethal.

Nerve agents are esters of phosphoric acid that act as potent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), a fundamental enzyme for terminating neurotransmissions in all living animals. These compounds inhibit all AChEs, including the human enzyme (HuAChE), by phosphorylating a serine hydroxyl group (Ser203 in HuAChE), which is directly responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. This reaction occurs very rapidly and can lead to irreversible inhibition by a process called aging.¹ Before aging, the inhibition of AChE

can be reversed through dephosphorylation of the serine residue by a nucleophile, usually an oxime (Figure 1).

Despite the existence of many different oximes in use today as antidotes against intoxication by neurotoxic agents, the literature has yet to report a universal oxime that is able to act efficiently against all existing neurotoxic agents. What has been observed experimentally is that oximes efficient in the treatment of intoxication by one specific nerve agent can be completely ineffective against another.²⁻⁵ This probably happens because the mechanism of these compounds inside the AChE active site has not been fully elucidated yet. Some relevant factors required for obtaining a better understanding of this mechanism, like the orientation of the phosphoryl bond inside the active site, the proper charge and conformation of the oxime and the optimal angle for attacking the phosphorylated serine, remain unknown.⁶ Theoretical studies have shown, for example, that the appropriate conformation is a fundamental requirement for the oxime to enter into the AChE active site's gorge,⁶⁻¹⁰ reinforcing the importance of conformational analysis studies of these compounds.

Several models of the mechanism and differences in activities among oximes have been proposed in the literature.⁶⁻¹² A docking energy calculation by Castro *et al.*¹¹ showed that

*e-mail: pascutti@biof.ufrj.br

pralidoxime (2-PAM), one of the oximes most commonly used as an antidote against neurotoxic agents, in its lowest energy conformation, E-anti-anti, remained in a possible reactivation region in the AChE active site. This observation was confirmed by molecular dynamics simulations, where the E-anti-anti conformation and the positive charge of 2-PAM (+1) were shown to be fundamental for its permanence inside HuAChE's active site.¹²

In the present work, we performed conformational analysis studies using semi-empirical methods for the determination of possible global and local minima in each of the three different oximes: Toxogonine,¹³ TMB-4^{14,15} and HI-6.¹⁶ The results obtained will be useful in parameterizing these molecules for further molecular modeling studies of their potential as AChE reactivators.

Methodology

The structures of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 were built manually with GHEMICAL 2.10¹⁷ using the TRIPOS 5.2 force field.¹⁸ Classical optimizations were carried out followed by a random conformational search using GHEMICAL 2.10,¹⁷ in order to find structures near possible global minima. Then, the semi-empirical methods RM1¹⁹ and PM6²⁰ implemented in MOPAC 2007²⁰ were used in two principal dihedral angles in those molecules, denoted Φ_1 and Φ_2 in Figure 2, which could cause further steric effects between two or more groups (*i.e.*, aromatic rings) after optimizing the other degrees of freedom in the molecules.

The validations of RM1 and PM6 for conformational analysis were performed by calculations using the GAUSSIAN 2003 software package.²¹

Both dihedral angles, Φ_1 and Φ_2 , were scanned from 0 to 360 degrees in 5-degree steps. This was performed with the MOPAC 2007²⁰ software package using the following

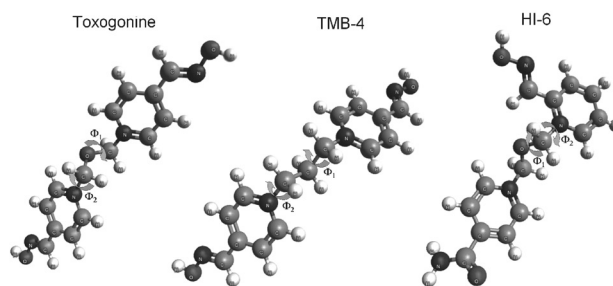


Figure 2. Oximes used in this work with dihedrals Φ_1 and Φ_2 in focus.

keywords in the input file: PRECISE CHARGE=+2 RM1 (or PM6) STEP=5 POINT=72 EF NOXYZ COMPGF GEO-OK GRADIENTS, where CHARGE is the total charge of the system and the STEP and POINT keywords describe a coordinate as a dynamical coordinate, *i.e.*, bond, angle and/or dihedral variation. In our case, the number of steps multiplied by the number of points gave us the total number of scanned angles ($5 \times 72 = 360$). For each compound, we created two input files, one using the RM1 method and the other using the PM6 method. Each output file was parsed by a custom FORTRAN program (see supplementary information) to extract the XY coordinates in order to facilitate the comparison of the dihedral angle and ΔH_f .

Results and Discussion

It is important to mention here that the decision to only perform the conformational analysis on the dihedrals Φ_1 and Φ_2 described in this work was supported by the following reasons: (i) Energetically, Φ_1 and Φ_2 are the dihedrals related to the highest energy points in Toxogonine, TMB-4 and HI-6 and, consequently, to the highest barriers of energy; (ii) Variations of these dihedrals intensify repulsions between two or more groups with the same charge, like aromatic rings; (iii) In order to avoid poor parameterizations and, consequently, trapping the molecule in local minima, it

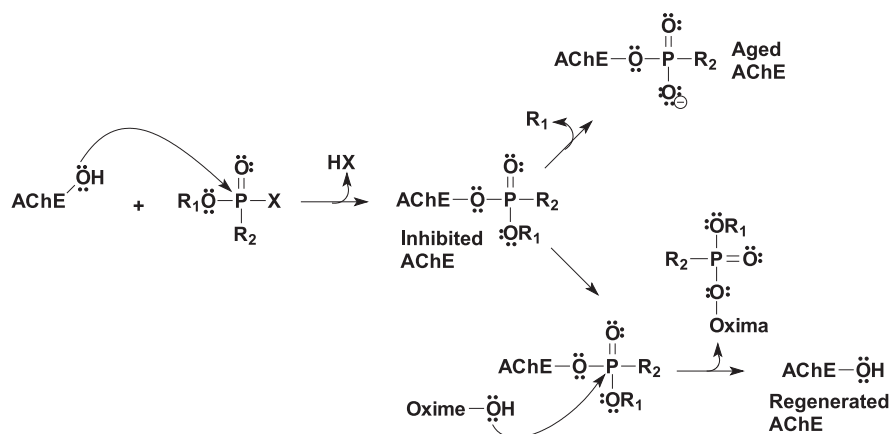


Figure 1. Inhibition, disinhibition and aging of acetylcholinesterase. X is the leaving group.

is of fundamental importance to obtain information about putative minima obtained by the conformational analysis of those dihedrals; (iv) Variations in the other dihedrals in Toxogonine, TMB-4 and HI-6 do not cause enough steric effects to cause problems in further parameterizations.

In order to validate the RM1 and PM6 methods for the conformational search, we have performed the Φ_2 dihedral variation of HI-6 from 0 to 180 degrees using DFT,^{22,23} with B3LYP^{24,25} and 6-31 G (d,p) basis sets and the RM1 and PM6 methods and compared the energy values and the energetic barriers found with each.²⁶ In this case, despite small differences in the minimal and maximal energies, the RM1, PM6 and DFT methods presented similar profiles, as can be seen in Figure 3. The highest and lowest energy points were located, respectively, at 20 and 140 degrees with DFT, 60 and 170 degrees with RM1 and at 40 and 160 degrees with PM6.

The energetic barriers computed from each method are presented in Table 1. The difference in the barriers calculated by DFT and RM1 was 1.41 kcal mol⁻¹ (11.38-9.97 in Table 1), and that between DFT and PM6 was 1.78 kcal mol⁻¹ (11.38-9.60 in Table 1). These deviations are consistent with data already reported in the literature.^{19,20}

After searching the points of maximal energy, it was also necessary to perform a vibrational analysis of the

Table 1. Energetic barriers acquired from the methods DFT, RM1 and PM6 for the dihedral ϕ_2 in HI-6

Method	Energetic barriers*
DFT/B3LYP 6-31G**	11.38
RM1	9.97
PM6	9.60

*kcal mol⁻¹.

stationary points found in the conformational analysis, in order to unequivocally characterize them as true energy maxima.²⁶ This was done for $\Phi_2 = 140^\circ$ using DFT/B3LYP 6-31G(d,p), $\Phi_2 = 170^\circ$ using RM1 and $\Phi_2 = 160^\circ$ using PM6. The single negative frequency vibrations found for DFT, RM1 and PM6 were 62.94i cm⁻¹, 55.70i cm⁻¹ and 42.2i cm⁻¹, respectively. The occurrence of a single imaginary frequency indicated that a good transition state (TS) had been located, and the vibrational analysis confirmed it as a true saddle point.

For a final validation of the RM1 and PM6 methods for use in our conformational analysis, we calculated the root mean square deviations (RMSD) of the three TS geometries of HI-6 acquired by the RM1, PM6 and DFT methods. As shown in Figure 4, the three geometries presented a very good superimposition, with an RMSD of 0.269 Å

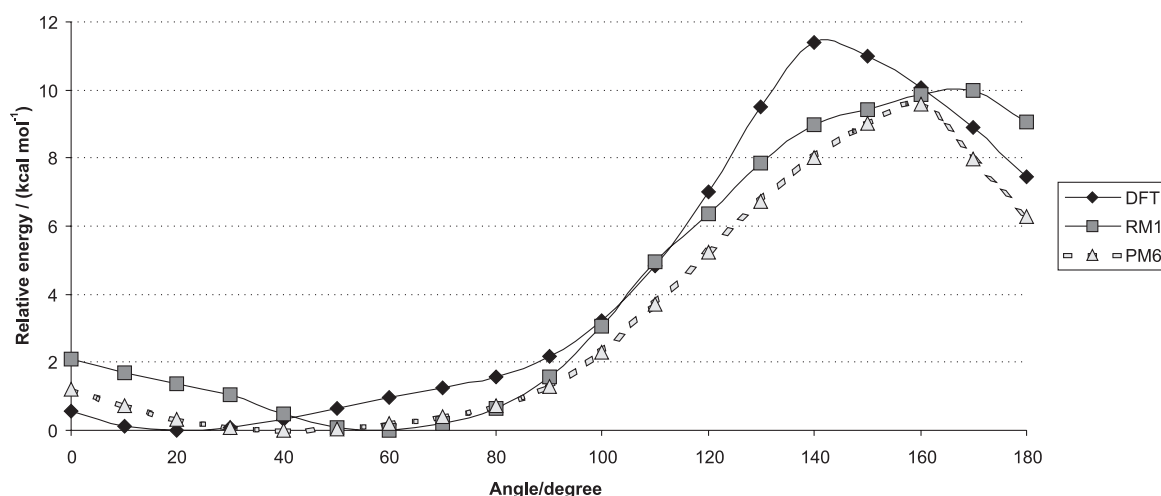


Figure 3. ϕ_2 dihedral variation of HI-6, from 0 to 180 degrees, using DFT, B3LYP and the 6-31 G (d,p) basis set for the RM1 and PM6 methods.

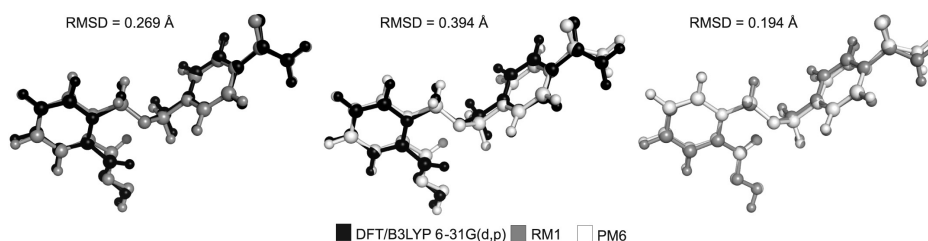


Figure 4. Superimposition of the three transition state (TS) geometries of HI-6 acquired by the RM1, PM6 and DFT methods.

between DFT and RM1, 0.394 Å between DFT and PM6 and 0.194 Å between DFT and PM6.

After the validation of these methods, conformational analyses of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 were performed using the RM1 and PM6 methods by varying the dihedrals Φ_1 and Φ_2 from 0 to 360 degrees following the procedure already described in the methodology section. As can be seen in Figure 5, our results showed that, for the dihedral Φ_1 of Toxogonine, the lowest energy conformation was the one that presented torsion between 260 and 280 degrees. For dihedral Φ_2 (Figure 6), two conformations were found, one between 120 and 140 degrees and the other between 300 and 320 degrees. The energetic barriers for Φ_1 were

about 14.00 kcal mol⁻¹ when using the PM6 method and 16.31 kcal mol⁻¹ when using the RM1 method. For the dihedral Φ_2 , the barriers determined with the PM6 and RM1 methods were 3.5 and 3.9 kcal mol⁻¹, respectively, suggesting that it is easier to turn Φ_2 than Φ_1 .

When rotating the TMB-4 dihedral Φ_1 , even though the energy needed to transpose the barrier between the maximal and minimal energies was shown in this study to be about 5.81 kcal mol⁻¹ with PM6 and 7.2 kcal mol⁻¹ with RM1, intermediate conformational states were observed between the angles 60 and 100 and 200 and 300. The barriers to rotating dihedral Φ_2 were 2.28 kcal mol⁻¹ with PM6 and 2.05 kcal mol⁻¹ with RM1 (Figure 6).

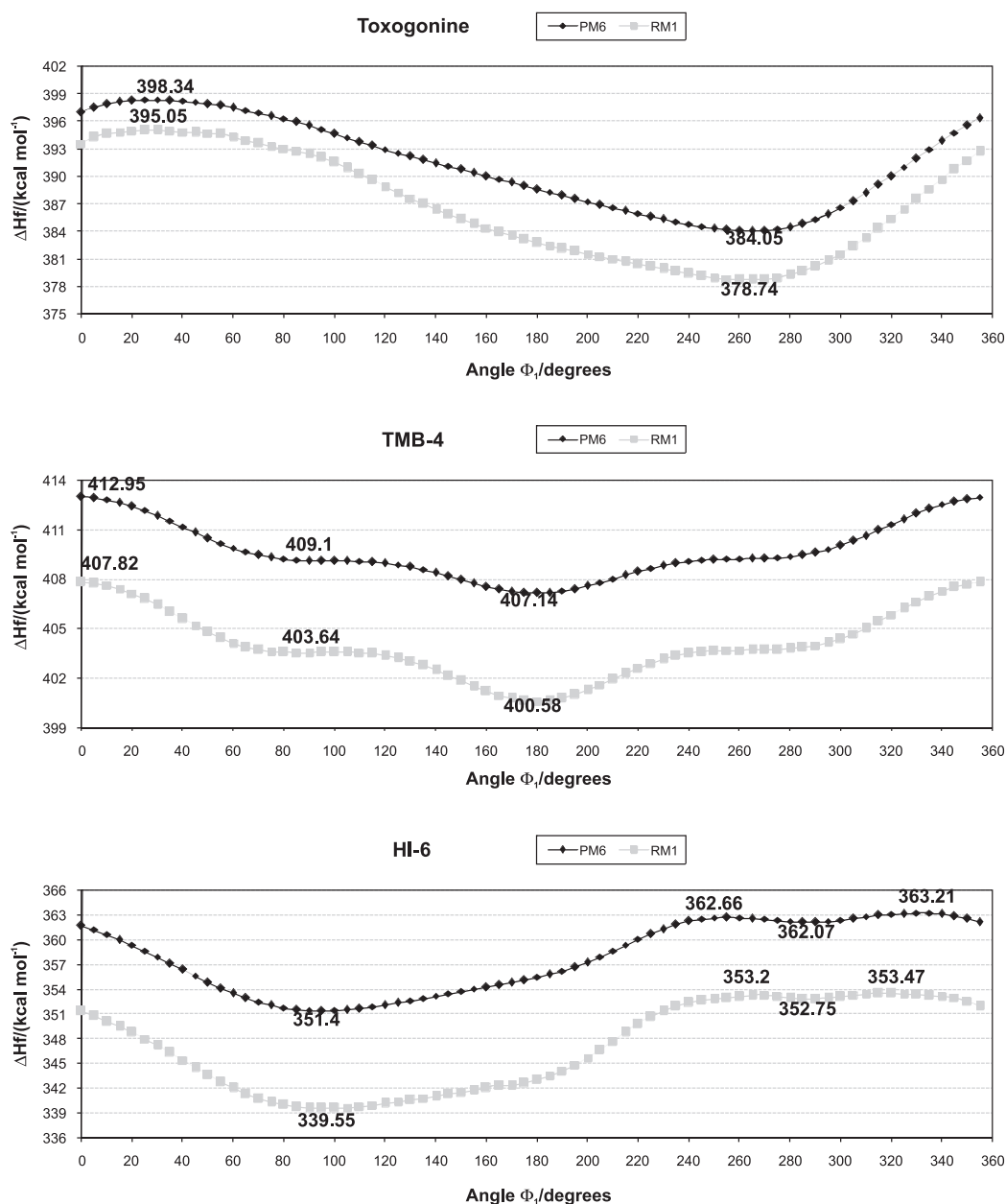


Figure 5. Plots of $\Delta H_f \times \phi_1$ for the oximes Toxogonine, TMB-4 and HI-6.

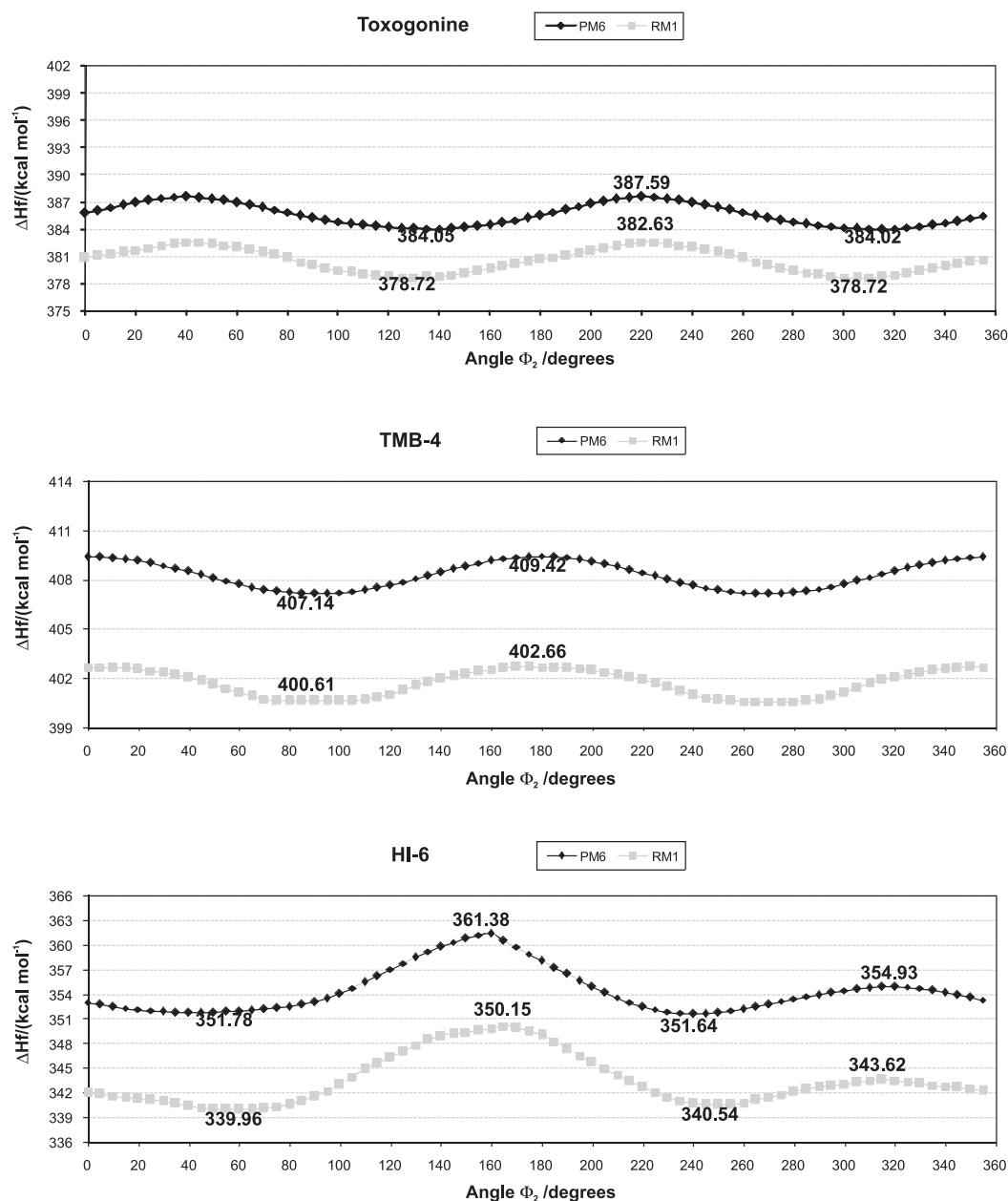


Figure 6. Plots of $\Delta H_f \times \Phi_2$ for the oximes Toxogonine, TMB-4 and HI-6.

The results of the conformational analysis for HI-6 showed that, when varying both dihedral angles, Φ_1 and Φ_2 , there were found, respectively, values with low (less than 3.0 kcal mol⁻¹) and considerable (about 10.0 kcal mol⁻¹) magnitudes, in terms of energetic barriers. As can be seen in Figure 5, the difference between the minima between 80 and 120 degrees and, for example, one of the maxima, located between 240 and 280 degrees, for the dihedral Φ_1 was about 11.30 kcal mol⁻¹ using PM6 and about 13.65 kcal mol⁻¹ using RM1. This result suggests that, despite the existence of a local minimum between 280 and 320 degrees, it is difficult to cross the barrier with a magnitude between 11.00 and 14.00 kcal mol⁻¹ and that the most stable conformation

for Φ_1 in HI-6 is the one valued at 351.40 kcal mol⁻¹ with PM6 and at 339.55 kcal mol⁻¹ with RM1. For the analysis of the variation of the HI-6 angle Φ_2 (Figure 6), it was shown that, for both PM6 and RM1, the major energetic barrier was about 10.00 kcal mol⁻¹, suggesting that the most stable conformations are localized between the dihedral angles of 40 and 80 degrees and 240 and 260 degrees.

Conclusions

In the present work, we validated the conformational analysis of the dihedrals Φ_1 and Φ_2 of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 employing the semi-empirical methods PM6 and

RM1, by comparison with the energetic barriers obtained for the Φ_2 dihedral angle of the oxime HI-6 calculated using DFT, B3LYP and the 6-31 G (d,p) basis sets. The energetic profiles obtained with the semi-empirical methods were very similar to the one obtained by DFT. Additionally, the superimposition of TSs obtained with the three methods did not present significant variations.

Further application of the RM1 and PM6 methods to the conformational analysis of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 suggested that the ideal values for the dihedral angles Φ_1 and Φ_2 could lead to the reduction of steric effects in future parameterizations in posterior molecular modeling studies. Using RM1 and PM6 methods for conformational analysis provides more accuracy when compared to the other semi-empirical methods like AM1^{19,20} and PM3^{19,20} and, at the same time, is much less time consuming when compared with DFT.

Acknowledgments

The Authors wish to thank the Brazilian agencies CNPq, FAPERJ and CAPES/PRODEFESA for financial support.

Supplementary Information

Supplementary data are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br>, as PDF file.

References

- Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 1385.
- Somani, S. M.; Solana, R. P.; Dube, S. N.; *Chemical Warfare Agents*, Academic Press: San Diego, 1992.
- Black, R. M.; Harrison, J. M. In *The Chemistry of Organophosphorus Compounds, Volume 4, Ter- and Quinque-Valent Phosphorus Acids and Their Derivatives*; Hartley, F. R. ed., John Wiley & Sons: New York, 1996.
- Sidell, F. R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R. In *Textbook of Military Medicine*; Office of the Surgeon General, US Army, Washington D.C., 1997, p. 129.
- Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R. In *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2007.
- Wong, L.; Radic, Z.; Brüggemann, R. J. M.; Hosea, N.; Berman, H. A.; Taylor, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5750.
- Ekström, F.; Yuan-Ping, P.; Boman, M.; Artursson, E.; Akfur, C.; Börjegen, S.; *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 597.
- Ashani, Y.; Radic, Z.; Tsigelny, I.; Vellom, D. C.; Pickering, N. A.; Quinn, D. M.; Doctor, B. P.; Taylor, P.; *J. Biol. Chem.* **1995**, *11*, 6370.
- Ekström, F. J.; Astot, C.; Pang, Y. P.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 282.
- Worek, F.; Aurbek, N.; Koller, M.; Becker, C.; Eyer, P.; Thiermann, H. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1807.
- Castro, A. T.; Figueroa-Villar, J. D.; *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *89*, 135.
- Goncalves, A. D.; Franca, T. C. C.; Wilter, A.; Figueroa-Villar, J. D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 968.
- Smirnova, O. I.; Gurina, E. I.; Zhigalova, L. V.; Arestova, L. S.; *Farmakologiya i Toksikologiya* **1975**, *38*, 467.
- Bay, E.; *Federation Proceedings* **1959**, *18*, 366.
- Bay, E.; Krop, S.; Yates, L. F.; *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1958**, *98*, 107.
- Bartosova, L.; Kuca, K.; Jun, D.; Kunesova, G.; *Int. J. Toxicol.* **2005**, *24*, 399.
- Hassinen, T.; Peräkylä, M.; *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1229.
- Shih, J. H.; Chen, C. L.; *Macromolecules* **1995**, *28*, 4509.
- Rocha, G. B.; Freire, R. O.; Simas, A. M.; Stewart, J. J.; *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1101.
- Stewart, J. J.; *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.; *Gaussian*, Gaussian Inc.: Wallingford CT, 2004.
- Hohenberg, P.; Kohn, W.; *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
- Kohn, W.; Sham, L. J.; *Phys. Rev.* **1965**, *140*, 4A.
- Becke, A. D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 7.
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G.; *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 2.
- We thank the referee for this suggestion.

Received: January 17, 2009

Web Release Date: October 9, 2009

ARTIGO III

Dissociation of Molecular Aggregates under High Hydrostatic Pressure: The Influence of Water Structure on Benzene Cluster Solubility

Arlan S. Gonçalves,^a Ernesto R. Caffarena^b and Pedro G. Pascutti^{*,b}

^a*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular, Bloco D, Sala 030, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-902 Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

^b*Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

Em condições críticas, a água pode solvatar moléculas hidrofóbicas, tornando-se um solvente poderoso para agentes apolares. Para discutir o efeito da pressão em agregados de benzeno em água, foram executadas seis simulações consecutivas de 5000 ps (picossegundos) por modelagem e dinâmica molecular de moléculas de benzeno inseridas em caixas d'água cúbicas em diferentes condições de pressão, de 1 bar a 5 kbar. O raio de giro, o coeficiente de difusão, a função de distribuição radial, o número de ligações hidrogênio entre as moléculas de água e a área acessível ao solvente, foram monitorados. Os resultados mostraram que acima de 3 kbar, a estrutura da segunda camada de solvatação desaparece e os agregados de benzeno desmembram-se gradualmente. Até 2 kbar, a solubilidade e a difusão das moléculas de benzeno são inversamente proporcionais ao aumento da pressão e acima de 3 kbar o comportamento é o inverso.

In some critical conditions water can solvate hydrophobic molecules, becoming a powerful solvent for nonpolar agents. To discuss the pressure effect on hydrated benzene clusters we carried out six consecutive 5000 ps (pico seconds) molecular dynamics simulations of benzene molecules in water cubic boxes at different pressure conditions, ranging from 1 bar to 5 kbar. Radius of gyration, diffusion coefficient, radial atomic pair distribution functions, number of hydrogen bonds between water molecules and the solvent accessible surface were monitored. Results showed that above 3 kbar the second hydration layer structure vanishes and the benzene clusters start to break up gradually. Up to 2 kbar, the solubility and diffusion of benzene molecules are inversely proportional to the increase of the pressure and above 3 kbar this behavior is inverted.

Keywords: benzene, molecular dynamics, hydrophobic effect, pressure effect

Introduction

The solvation effect of non-polar substances, as well as the importance of water for stabilization of biomolecular systems such as proteins, DNA, and membranes has been extensively studied.^{1,2} The restructuring of liquid water during the process of transferring non-polar molecules into aqueous phase produces interesting phenomena such as the decrease of partial molar entropy, partial molar volume, and enthalpy of solute, along with the increase of heat capacity in normal conditions of temperature and pressure.³ The stability of biological macromolecules is mainly due to the control that ordered water exerts around hydrophobic molecules.⁴

In general, under normal conditions of temperature and pressure, the solubility of hydrophobic compounds in

water is low, favoring their segregation and organization. Accordingly, the number of water molecules packed around hydrocarbon molecules can be an important measure of the partition coefficient for this solute in solution.⁵ However, it is possible to solvate hydrophobic compounds in aqueous solutions by changing physical conditions, since it has been shown that solubility of benzene molecules in water-benzene mixtures is enhanced by increasing of temperature and pressure in two different supercritical regions, the first one at 573 K and 324 bar and the second at 673 K.⁶

The change in the solvation capacity of water at higher pressures might be explained by the distortion of the hydrogen bond network structure, along with the reduction of its dielectric constant.⁶

In view of these properties, industrial processes at such high pressure and temperature conditions are of particular interest. Examples of them are: supercritical

*e-mail: pascutti@biof.ufrj.br

water oxidation (SCWO) and supercritical extraction, among others.⁷ For instance, SCWO becomes an important application because it provides a reliable way to destroy biochemical and pharmacological hazardous waste from industrial process, for example, the degradation of steam currents with aromatic compounds.⁶

The effect of pressure on the hydration of non-polar molecules is an interesting matter not only because of the so-called 'abnormal' behavior but also because its strong influence on different biological systems, like proteins,⁸ and organic solutions. In particular, its effect on the water self-diffusion coefficient and the solubility of hydrophobic solute is remarkable.⁹

Experimental techniques such as fluorescence spectroscopy,¹⁰ Raman spectroscopic studies of compressed liquid water,^{11,12} neutron diffraction¹³ and X-ray diffraction¹⁴ indicated modifications in the structure of water surrounding hydrophobic compounds. Furthermore, the steady-state fluorescence anisotropy methodology has been widely employed by Gregorio Weber's laboratory to study the dissociation of protein subunits by dilution or by application of high hydrostatic pressure.¹⁵ Additionally, extensive experimental studies on the effect of pressure and temperature on the solubility of benzene and alkyl benzenes in water have been carried out by Sawamura *et al.*¹⁶⁻¹⁸

Among the techniques employed to understand water behavior at higher pressures, computer simulation methods, such as Monte Carlo (MC) and molecular dynamics (MD), have become powerful tools. They have extensively contributed to the analysis of the microscopic structure of the hydration shells, from a dynamical point of view, presenting the additional advantage of focusing the interest on some particular effects of an isolated system. Several reports^{19,20} have shown that water molecules, when surrounding a hydrophobic solute, are able to order themselves, invoking an analogy to the clathrate hydrate. Previous studies of hydration of non-polar compounds have utilized quasi-hydrophobic solutes combined with a polar or ionic compound acting as a solubility anchor.²¹ The disadvantage of this approach is that hydrophobic effects may be mixed up with hydrophilic ones, hindering the investigation. In this work we carried out MD simulations of eighteen benzene molecules immersed in a water box aiming to show the external pressure effect on the solubility and hydrophobicity of benzene.

Methodology

Atomic coordinates of benzene molecules were obtained from the GHEMICAL²² software and minimized with TRIPOS5.2 force field²³ and their atomic partial charges were

computed using *ab initio* calculation (Hartree-Fock method) with the GAMESS US²⁴ program, 6-31G** basis sets along with the CHELPG²⁵ approach. The benzene molecule was modeled using parameters of the OPLS-AA force field^{26,27} included in GROMACS (version 3.2.1) package.^{28,29}

Eighteen benzene molecules were initially immersed in a cubic box (52.23 nm³) containing 1648 SPC³⁰ water molecules with periodic boundary conditions and this was the starting configuration. The system was then energy minimized using 1923 Steepest Descent steps along with 538 Conjugate Gradient steps. Particle Mesh Ewald^{31,32} (PME, Fourier spacing 1.2 Å, 4th order and tolerance 10⁻⁵) and 6-12 Lennard-Jones potentials were applied to account for Coulomb and van der Waals interactions, using a cut-off of 0.9 nm for both interactions. The LINCS algorithm³³ was applied over all covalent bonds intending to preserve the covalent character linkage between atoms.

Once the system was equilibrated after 500 ps of MD simulation, i.e. temperature reached 280 K and pressure 1 bar; six consecutive long runs (5000 ps) were carried out at different pressures, starting from 1 bar and gradually increased (1 kbar step) to 5 kbar. Trajectories were saved every 10 ps, resulting in 500 snapshots for statistic analysis. The time step was chosen to be 0.002 ps for all simulations.

To analyze possible modifications of water structure with pressure in presence of hydrophobic solute, structural and dynamical functions such as solute radius of gyration, solvent accessible surface (SAS), self-diffusion coefficient and correlation functions of pairs such as: solute-solute, solute-solvent and solvent-solvent were computed. To better understanding the orientation properties of water hydration layers, the radial and angular distribution functions $g(r, \theta)$ were investigated.

The geometric parameters for $g(r, \theta)$ function are shown in Figure 1, where r is the distance between oxygen atoms and the θ angle is defined by the vector normal to the plane containing the water molecule and the vector connecting the oxygen atom of this water molecule with another oxygen atom. Additionally, the angle between three neighboring oxygen atoms belonging to the second hydration shell was computed aiming to evaluate the pressure effect on the directional characteristics of the hydrogen bond network.

For each analysis we considered only the data corresponding to the last 3000 ps of simulations for each pressure condition.

Results and Discussion

The formation of benzene clusters in aqueous solution at different values of hydrostatic pressures was analyzed through MD simulations. According to them, this system

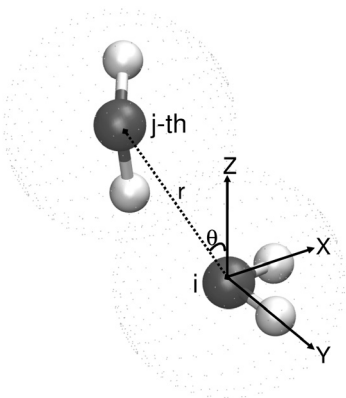


Figure 1. Geometric parameters for $g(r, \theta)$ function, where θ is the angle between the vector normal to the plane containing the water molecule centered on the oxygen atom (i) and the vector connecting the oxygen atom (i) and the oxygen atom of the j -th molecule.

presented two different behaviors as a result of increasing hydrostatic pressure. At pressures below 2 kbar was observed the formation of benzene clusters with some isolated solvated benzene molecules. At 2 kbar, the aggregation of benzene reached its maximum while above 3 kbar the benzene clusters progressively diminishes until 5 kbar, when they were no longer detected (Figure 2).

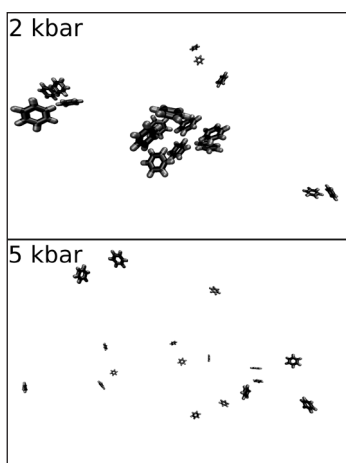


Figure 2. Last frame of molecular dynamics simulations at 2 and 5 kbar, respectively.

One way to quantify the effects of the pressure on the hydration of benzene is by calculating the distribution of mass of the eighteen benzene molecules as a whole using the radius of gyration, according to equation (1), where m_i is the mass of atom i and x_i the position of atom i with respect to the center of mass of the group of molecules and $\|x_i\|$ is the norm of x_i .

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|x_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Figure 3 shows that the radius of gyration of benzene arrangement presented lower values at 2 kbar than at other evaluated pressures. From equation (1), the increase of benzene-benzene separation results in larger values of the gyration radius, and thus it can be used as a measure of benzene aggregation.

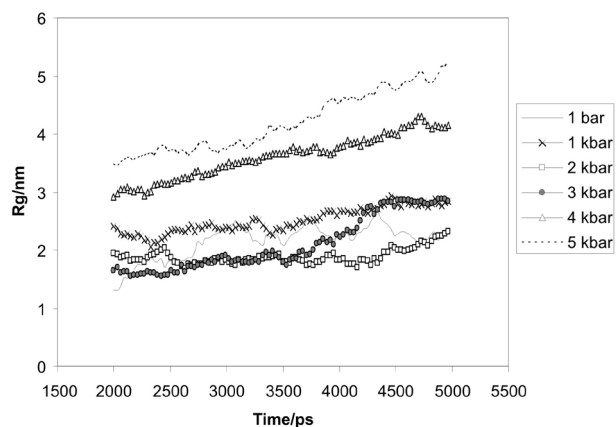


Figure 3. Radius of gyration for benzene molecules, computed at the time interval between 2000 and 5000 ps.

Self-diffusion coefficient

To further analyze the change in aggregation as a result of increasing pressure, the Einstein diffusion coefficient³⁴ was computed according to equation 2, taking into account only the last 3000 ps for calculations, where N is the number of particles and $x_j(t)$ stands for the position of the j -th particle at time t .

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{6t} \left\langle \sum_j^N [x_j(0) - x_j(t)]^2 \right\rangle \quad (2)$$

The self-diffusion coefficient of benzene molecules in aqueous solution decreases as the pressure increases up to 2 kbar, then it increases with the pressure reaching values of that at 1 bar. This minimum coefficient is in agreement with the larger clustering of benzene at 2 kbar. In addition, we observed that water self-diffusion coefficients decrease almost linearly with the increase of the pressure (Figure 4). This result is supported by experimental data, given that dielectric constant and NMR measurements showed similar dependence for water diffusivity with pressure.³⁵

SAS

The analysis of the hydrophobic SAS showed a clear drift towards higher exposure values resulted of an

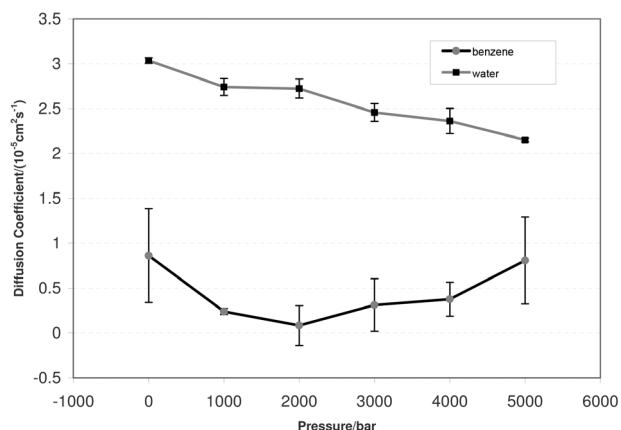


Figure 4. Dependence of diffusion coefficients with the pressure. The error bars correspond to the standard deviations for each simulation.

increment of the solubility of benzene in water, which may also be related to a change of the hydrophobic pattern. A plausible explanation for this observation might be achieved by assuming that pressure acts basically modifying the solvent structure through reducing the solvent capacity to effectively stabilize the molecular structure through the solvophobic effect. Figure 5 shows that a minimum of SAS is achieved at a pressure of 2 kbar, which coincides with the largest benzene clustering.

Clustering of benzene molecules was also observed at 2 kbar during a hysteresis cycle. Hence, it is plausible that this pressure condition would favor the aggregation of hydrophobic compounds.³⁶

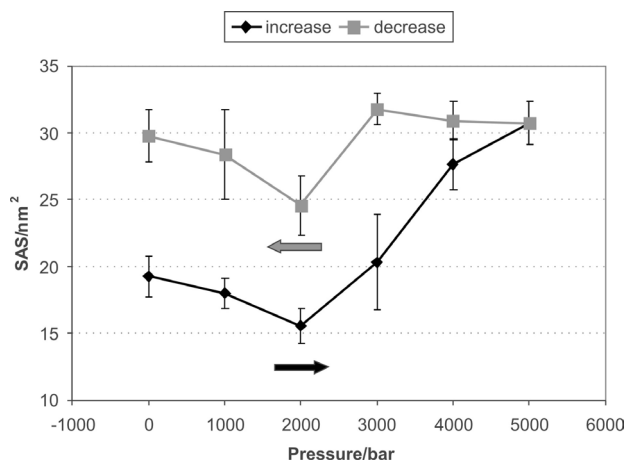


Figure 5. Average of solvent accessible surface in function of hydrostatic pressure, where the average in each point was computed between 2000 and 5000 ps of simulations and the error bar correspond to standard deviation.

Structural features

The change of benzene solubility in aqueous solution may be probably associated with the re-arrangement and

distortion of the hydrogen bond (Hbond) network in the vicinity of the solute. Raman spectroscopic study¹² of compressed liquid water have indicated that there is little, if any, Hbond breakage in response to the increased of hydrostatic pressure.

The maximum number of bonds that a water molecule can form is 4 at all the applied hydrostatic pressures. This number of interactions means that water in the vicinity of benzene molecules preserve its tetrahedral feature. It is noticeable that the total number of bonds was smaller at pressures between 2 and 3 kbar, returning to its normal value at higher pressures (4 and 5 kbar). This might be due to a lesser capability of solute access to solvent molecules. All histograms in Figure 6 were normalized according to the overall number of bonds found in the volume encompassing the solute and considering only the water molecules from up to 0.5 nm of any carbon atom of benzene molecules.

As pressure increases, water molecules in the vicinity of each solute re-accommodate themselves at closer distances bringing on a marked decrease of the intensities of the peaks (Figure 7). A combination of two factors might explain this behavior: the first one is that the number of atoms in the vicinity of benzene becomes larger due to the more packed structure resulting from the hydrostatic compression and bending of the hydrogen bond network; the second one might be due to the solubility change of benzene in aqueous solution.

However, it seems that the typical distance for hydrogen bonding remains unchanged as pressure increases. This fact shows that the connection between atoms involved in this type of interactions do not change considerably, but produces a reorganization of water molecules in the vicinity of solute, distorting rather than disrupting the hydrogen bond network.

The analysis of the angular distribution between water molecules involved in hydrogen bonds reinforces this statement. At lower pressures, the average angle for donors and acceptors for a single water molecule could be observed approximately at 120° (Figure 8). At higher pressures, a symmetry breaking was seen resulting in a more heterogeneous angular distribution. The maximum at 120° at lower pressures was split up into two peaks, differentiating the angle 110° (for donors) and 130° (for acceptors). It is important to note that the intensities of the peaks at higher pressures were higher, probably due to the larger amount of water molecules in the vicinity of the benzene molecules.

The effect of pressure on the association of benzene molecules and molecular packing of water in the vicinity of solute can also be directly obtained from the analysis of

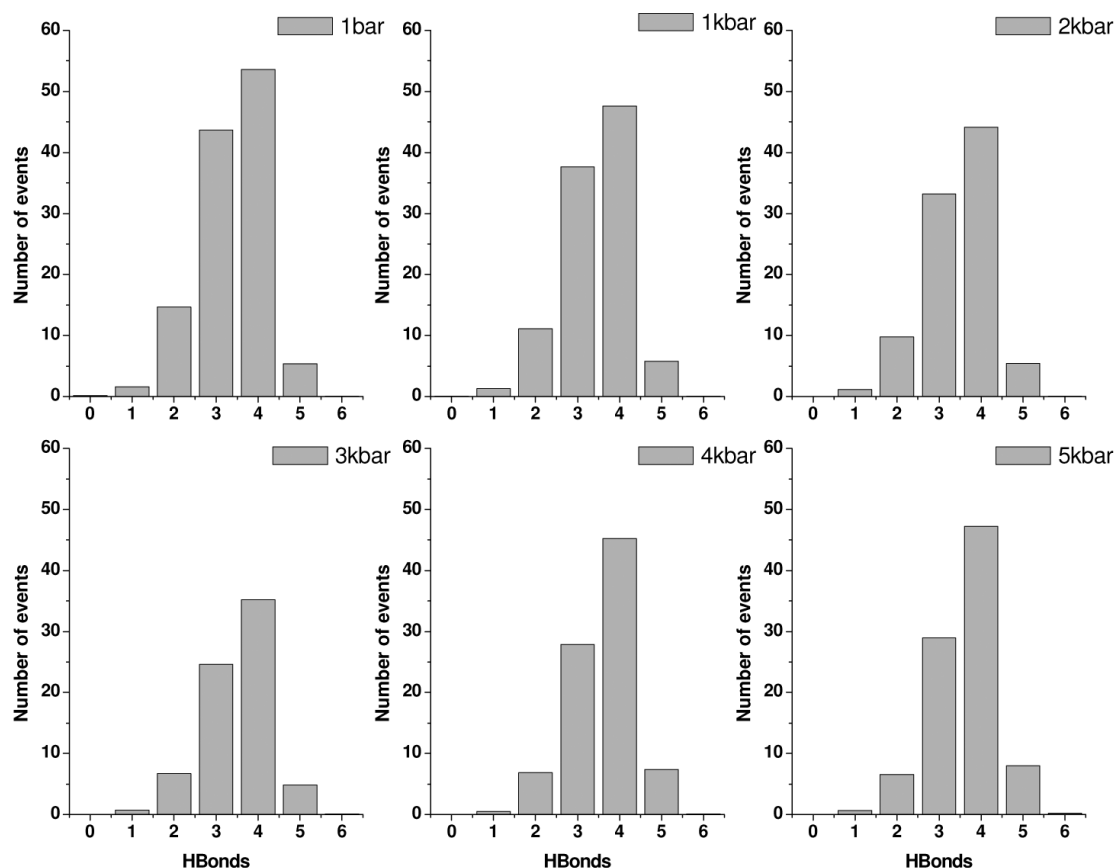


Figure 6. Distribution of hydrogen bonds between water molecules from up to 5 Å of any carbon atom of the solute.

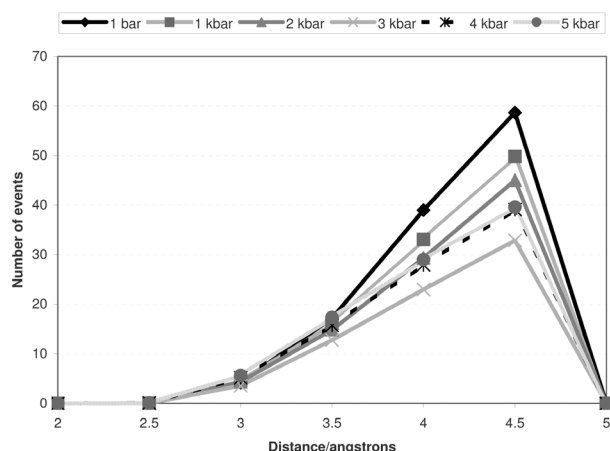


Figure 7. Relative number of water molecules as a function of the distance between two neighboring oxygen atoms at different pressures.

radial distribution functions. Neutron and X-ray diffraction experiments are a good source of structural data of water at high pressures and correlation functions can be built from the study of near neighbor distances between oxygen atoms.¹⁴

Solute-solute radial distribution function was then calculated between the geometric centers of benzene heavy atoms, and the solute-solvent radial distribution function

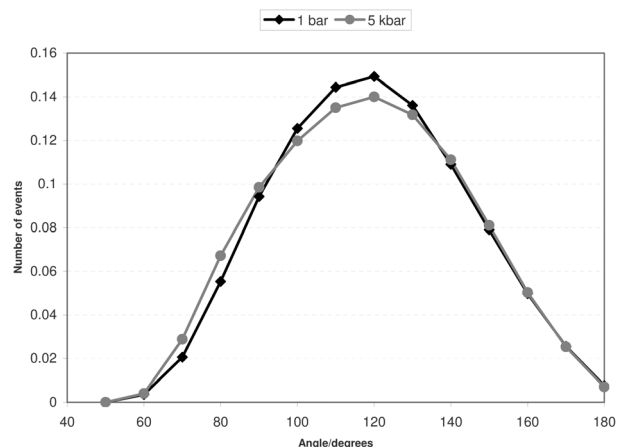


Figure 8. Average of events between three neighboring oxygen atoms as a function of their angle. The values are normalized according to the total number of computed HBonds within 5 Å from any carbon atom of the solute.

was calculated, where the distance between the center of mass of benzene and oxygen atom of water molecules was used in this calculation.

It can be observed (Figure 9a) that in the low-pressure regime (≤ 2 kbar), the probability of finding a benzene molecule near to another one is larger than at high-pressures (≥ 3 kbar). This indicates a desegregation of the benzene

clusters as the pressure increases. Figure 9b shows that the local density of water molecules near a solute also increases due to the more compact molecular packing under further compression.

At pressures higher than 3 kbar, a possible explanation for the difference between correlation functions might be due to the increment of the entropy of benzene molecules as an effect of its hydration. The solvation of benzene above 3 kbar was due to the weakening of the water structure, suggesting possible changes of the mean orientation of water molecules³⁷ dipoles and extinction of the second solvation layer. From the analysis of the radius of gyration it is possible to observe that there is a restructuring of water molecules.

The location of the maximum of the peaks of the first hydration shell is sharper and slightly left-shifted, indicating a more compact structure. Also, the peak intensities are higher for higher pressures, showing a large number of water molecules in the vicinity of the solute. All these results suggest a more compact distribution of the solvent around the solute. Figures 9c and 9d show a reorganization of water molecules in the first solvation shell with the consequent vanishing of the second hydration shell as the pressure increases.

Some degree of reorganization of the hydrogen bond network towards more angularly bent and weakened bonds can be implicated. This can be readily seen in Figure 10

where the results show normal behavior at 1 bar and a complete loose of the second hydration shell at 5 kbar. As long as the reference of the hydrostatic bath reference pressure gets higher, a more homogeneous distribution of the second hydration shell is produced, as a consequence of a reorganization of water molecules whereas the first hydration shell of water remains the same for all hydrostatic pressures throughout the MD simulations. It can be clearly observed that the former irregular surface at lower pressure suffers gradual smoothing with rising pressure, resulting in a more homogeneous distribution, and consequently undergoes important dependency with orientation.

Conclusion

The possibility of solvating non-polar molecules (such as benzene) in a very polar solvent (such as water) at high hydrostatic pressures has been shown in this work.

This observation is reasonable and attributable to the unique property of water that becomes less compressible with increasing pressure that drastically modify its liquid structure, but not losing it. We suggest that as pressure increases the entropy of the system does, which depends on angular features of the net and is grounded on the analysis of clustering of benzene molecules at different pressures.

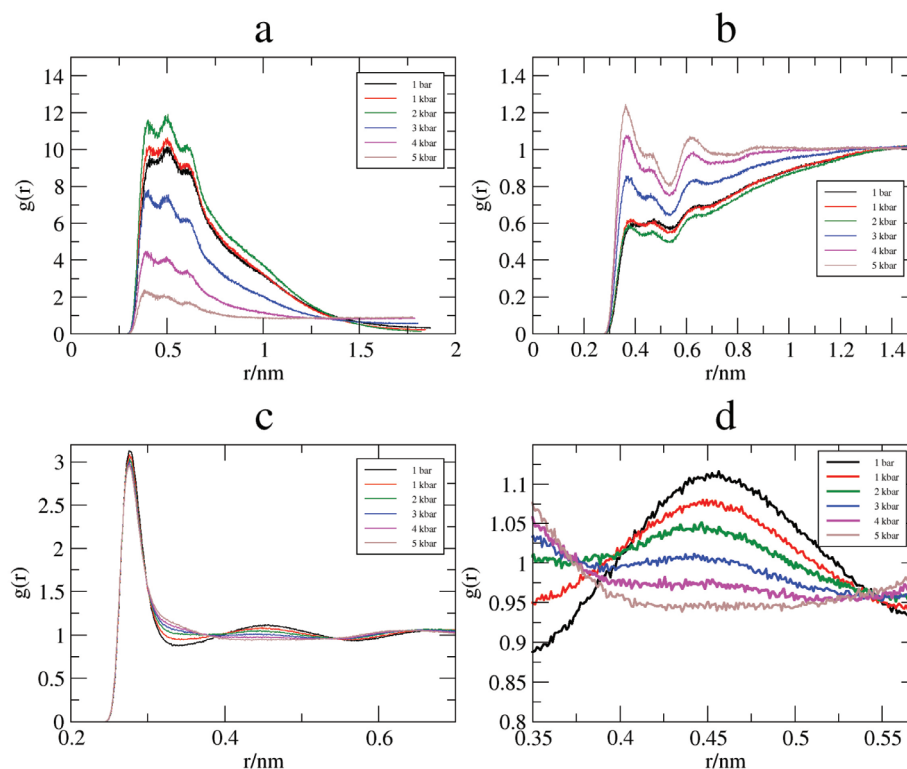


Figure 9. (a) Benzene-benzene radial distribution functions; (b) Benzene-water radial distribution functions; (c) Water-water radial distribution functions; (d) Magnification of (c).

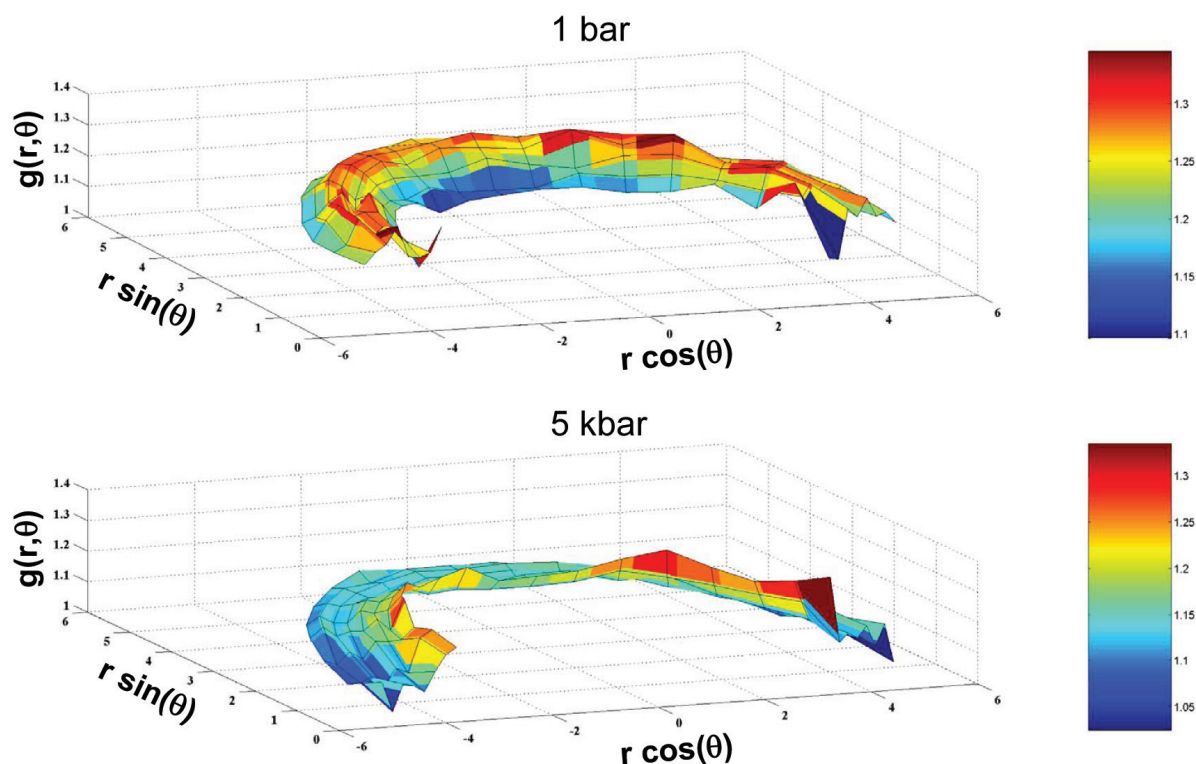


Figure 10. The function $g(r, \theta)$ of second solvate layer at (a) 1 bar and (b) 5 kbar, respectively.

Acknowledgments

The Authors wish to thank the Brazilian agencies CNPq, FAPERJ and CAPES for financial support and MSc Samuel Silva Pita to help in manuscript's revision.

References

- Shoemaker, B. A.; Wolynes, P. G.; *J. Mol. Biol.* **1999**, 287, 657.
- Onuchic, J. N.; Nymeyer, H.; García, A. E.; Chahine, J.; Socci, N. D.; *Adv. Protein Chem.*, **2000**, 53, 87.
- Frank, H. S.; Evans, M. W.; *J. Chem. Phys.* **1945**, 13, 507.
- Kauzmann, W.; *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1.
- Hermann, R. B.; *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2754.
- Draghi, C. N.; Àvalos, J. B.; Contreras, O.; Ungerer, P.; Ridard, J.; *J. Chem. Phys.* **2004**, 121, 10566.
- Eugenia, G. P.; Danielle, B.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 1287.
- Borges, R. M.; Silva, J. L.; Gay, G. P.; *J. Bio. Chem.* **1999**, 12, 7732.
- Grigera, J. R.; Caffarena, E. R.; *Physica A* **2004**, 342, 34.
- Royer, C. A.; *Biophys. J.* **1995**, 68, 1191.
- Karger, K.; Ludeman, D.; Sceats, B. B.; *Phys. Chem.* **1995**, 99, 1104.
- Cavaille, D.; Combes, D.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, 799, 212.
- Bellissent-Funel, M. C.; *J. Chem. Phys.* **1995**, 102, 3727.
- Ohtaki, H.; Radnai, T.; Yamaguchi, T.; *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 41.
- Lakowicz, J. R.; Weber, G.; *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
- Sawamura, S.; Kitamura, K.; Taniguchi, Y.; *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 4931.
- Sawamura, S.; Nagaoka, K.; Machikawa, T.; *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, 2429.
- Sawamura, S.; Tsuchiya, M.; Ishigami, T.; Taniguchi, Y.; Suzuki, K.; *J. Solution Chem.* **1993**, 22, 727.
- Mancera, R. L.; Buckingham, A. D.; *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 14632.
- San Román Zimbrón, M. L.; Ortega Blake, I.; *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, 3253.
- Schurhammer, R.; Wipff, G.; *New J. Chem.* **2002**, 26, 229.
- Hassinen, T.; Peräkylä, M.; *J. Comput. Chem.* **2001**, 22, 1229.
- Shih, J. H.; Chen, C. L.; *Macromolecules* **1995**, 28, 4509.
- Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; *J. Comput. Chem.* **1993**, 14, 1347.
- Brenemann, C. M.; Wiberg, K. B. J.; *Comp. Chem.* **1990**, 11, 361.
- Rizzo, R. C.; Jorgensen, W. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4827.

27. Damm, W.; Frontera, A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; *J. Comp. Chem.* **1997**, 18, 1955.
28. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R.; *Comp. Phys. Comm.* **1995**, 91, 43.
29. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D.; *J. Mol. Mod.* **2001**, 7, 306.
30. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J.; *B. Pullman* **1981**, 331.
31. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.; *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089.
32. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G.; *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 8577.
33. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M.; *J. Comp. Chem.* **1997**, 18, 1463.
34. Einstein, A.; *Ann. Phys.* **1905**, 17, 549.
35. Calandrini, V.; Deriu, A.; Onori, G.; Paciaroni, A.; *ISIS Facility Annual Report 2001-2002* **2002**.
36. *We thank the referee for this suggestion.*
37. Cowan, M. L.; Bruner, B. D.; Huse, N.; Dwyer, J. R.; Chugh, B.; Nibbering, E. T.; Elsaesser, T.; Miller, R. J.; *Nature* **2005**, 434, 199.

Received: June 18, 2008

Web Release Date: May 15, 2009

ARTIGO IV

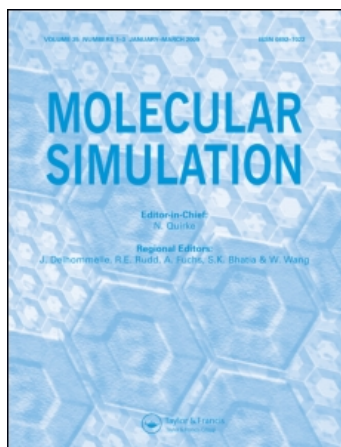
This article was downloaded by: [Franca, Tanos Celmar Costa]

On: 29 July 2009

Access details: Access Details: [subscription number 913469266]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Molecular Simulation

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713644482>

Design, docking studies and molecular dynamics of new potential selective inhibitors of Plasmodium falciparum serine hydroxymethyltransferase

Manuela Leal da Silva ^a; Arlan da Silva Gonçalves ^b; Paulo Ricardo Batista ^b; José Daniel Figueroa-Villar ^a; Pedro Geraldo Pascutti ^b; Tanos Celmar Costa França ^a

^a Divisão de Ensino e Pesquisa, Seção de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, CEP, Brazil ^b Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Rio de Janeiro, UFRJ, CEP, Brazil

First Published on: 28 July 2009

To cite this Article da Silva, Manuela Leal, da Silva Gonçalves, Arlan, Ricardo Batista, Paulo, Figueroa-Villar, José Daniel, Pascutti, Pedro Geraldo and França, Tanos Celmar Costa(2009)'Design, docking studies and molecular dynamics of new potential selective inhibitors of Plasmodium falciparum serine hydroxymethyltransferase',Molecular Simulation,99999:1,

To link to this Article: DOI: 10.1080/08927020903051580

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/08927020903051580>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Design, docking studies and molecular dynamics of new potential selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase

Manuela Leal da Silva^a, Arlan da Silva Gonçalves^b, Paulo Ricardo Batista^b, José Daniel Figueroa-Villar^a, Pedro Geraldo Pascutti^b and Tanos Celmar Costa França^{a*}

^aDivisão de Ensino e Pesquisa, Seção de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro, Brazil; ^bInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Edifício do CCS, Bloco D, Sala D1-030, Ilha do Fundão, UFRJ, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

(Received 8 February 2009; final version received 12 May 2009)

In this paper, former studies on the interactions of the natural substrate and potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase (*Pf*SHMT) were used to design five new potential selective inhibitors to this enzyme. Results of the docking energies calculations of these structures inside the active sites of *Pf*SHMT and human SHMT were used to select a more suitable structure as a potential selective inhibitor to *Pf*SHMT. Further molecular dynamics studies of this molecule and 5-formyl-6-hydrofolic acid (natural substrate) docked inside these enzymes' active sites revealed important features for additional refinements of this structure and also additional residues in the *Pf*SHMT active site to be considered further for designing selective inhibitors.

Keywords: malaria; *Pf*SHMT; docking; molecular dynamics; selective inhibitors

1. Introduction

According to the World Health Organization, malaria is by far the tropical disease causing most of the social and economic problems in the world today, being passed in the number of deaths only by AIDS [1].

Also known as paludisme, malaria is a public health problem in more than 90 countries, where about 2.4 billion people are under the risk of contamination [2]. This disease affects about 300–500 million people annually causing about 2.5 million deaths, mostly among children. Today the threat is worst in Latin American countries, African countries and in vast areas of the Meridian, Asia and Oceania [3,4]. This means that 40% of the world's population is at risk of developing malaria [3,5].

In Brazil, malaria is concentrated in the Amazonian region with more than 99% of registered cases in the country. In other states, the registered cases are almost totally imported from the Amazonian region or other countries where the transmission also occurs [1].

Two aspects that have currently stimulated new efforts regarding the development of chemotherapy, vaccines and sanitary studies about malaria are: the rapid emergence of *Plasmodium falciparum* strains that are resistant to currently available antimalarial drugs [6–9] and the inefficacy of antimalarial vaccines [3]. Since a vaccine for malaria seems to be far in the future, a more immediate solution would be the development of new anti-malarial chemotherapy. Still, we have to assume that the ability of *Plasmodium* to adapt to new chemotherapy under the pressure of the drugs would

eventually render any new antimalarial drug less efficient, thus making all research on the aspects of malaria even more important. Many strategies have been adopted to develop new drugs for malaria. Among them, we have been interested in the design of new inhibitors for the three enzymes involved in the parasite methylenetetrahydrofolate cycle using molecular modelling and dynamics studies, and have already performed several studies focussed on the design of new potential inhibitors for the enzymes dihydrofolate reductase–thymidylate synthase (DHFR-TS) and serine hydroxymethyltransferase (SHMT) from *P. falciparum* [10–13].

In a former work the first multiple-alignment homology model of dimeric *P. falciparum* SHMT (*Pf*SHMT) was proposed with the coenzyme piridoxal 5'-fosfato bound to glycine (PLG) and its natural substrate, 5-formyl-6-hydrofolic acid (FFO), and anchored into its active sites [12]. This model was further used to build seven holoenzymes docked with FFO analogues designed according to the differences observed in the behaviour of the FFO tail along molecular dynamics (MD) simulations, in the active sites of *Pf*SHMT and human SHMT (*Hs*SHMT) [13]. Further MD simulations and interaction energy estimations of the compounds positioned in the active sites of both enzymes showed that compounds with a negative net charge and possessing either shorter tails or longer amphoteric tails would be more selective towards *Pf*SHMT [13]. Based on this information, we designed, in this work, five new potential selective inhibitors to

*Corresponding author. Email: tanos@ime.eb.br

*Pf*SHMT and calculated their docking energies inside the active sites of *Hs*SHMT and *Pf*SHMT. From the data obtained, the more suitable structure as a potential selective inhibitor to *Pf*SHMT was selected. Further MD studies of this molecule and PLG docked inside the active sites of both enzymes revealed important insights for additional refinements that were needed on this structure in order to increase its efficiency as a potential *Pf*SHMT selective inhibitor and, also, additional residues in the *Pf*SHMT active site to be considered further for designing selective inhibitors.

2. Methodology

2.1 Docking studies

The structures of PLG, FFO and the five compounds to be studied as potential *Pf*SHMT inhibitors were first built using the Gaussian View software from the Gaussian 98 package[®] [14]. After that, the molecules had their atomic partial charges calculated at the Hartree-Fock level with the 6-31G* basis set using the CHELPG approach of the Gaussian 98 package[®] [14] and their topological files generated at the Dundee PRODRG server [15].

The calculation of the docking energies of FFO and the five new compounds inside the active sites of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT was performed using the software, AutoDock-Tools and AutoDock 3.0.5 [16]. The input files of the ligands in the format suitable for AutoDock 3.0.5 [16] (.pdbq) were generated at the Dundee PRODRG server [15]. The input files of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT used for the docking calculations were the output files after the 1000 ps of MD simulations reported by França et al. [12].

The grid sizes used for the dockings inside the enzymes' active sites were defined as $60 \times 70 \times 60 \text{ \AA}$ for both the enzymes with $0.375 \text{ \AA}$ as space between the grid points or about a quarter of a C—C bond. As a parameter for the molecular docking, the Lamarckian genetic algorithm [16], a combination between the Genetic algorithm and the Local Search Pseudo-Solis and Wets algorithm, was employed [16]. The number of predicted conformations for the simulations was 100 and the maximum number of generations performed by the genetic algorithm was 27,000. The 100 lowest-energy conformations were selected by the software as the best ligand conformations in the receptor site.

2.2 Molecular simulations studies

The insertions of the proposed inhibitor, FFO and PLG into the *Pf*SHMT and *Hs*SHMT active sites for the MD simulations were performed by superposition of FFO and PLG in the same conformations as present in the 3D structure of *Pf*SHMT reported by França et al. [12] and the *Hs*SHMT 3D structure used for this task was the one

reported by Renwick et al. [17] (PDB entry 1BJ4, resolution = $2.65 \text{ \AA}$, R -value = 0.210).

The MD steps were carried out according to the following procedure: first, a 50 ps of MD at 300 K in the water molecules inside the box in order to allow for the equilibration of the solvent around the protein residues. In this simulation, all protein atoms had their positions restrained. Then, a full MD simulation of 3000 ps at 300 K with no restrictions was carried out, using 1 fs of integration time and a cut-off of $14 \text{ \AA}$ for long-range interactions.

Because these proteins have only a residual net charge, which was balanced by counter-ions for these simulations, it was possible to use the direct cut-off for long-range interactions without smoothening functions. The effects of the electrostatic potential truncation are minor at $14 \text{ \AA}$, and the cut-off procedure makes the calculations faster than the other methods. Considering that the protein and the water molecules inside the simulation box are composed of about 100,000 atoms, this method can save significant computational time.

As a whole, 3000 conformations were stored during each simulation. In this step the pair lists were updated for every 500 time steps and all the Lys and Arg residues were positively charged while the Glu and Asp residues were negatively charged.

Also, in order to obtain a neutral net charge for all the systems, the charges were neutralised by the addition of Na^+ ions. The programme calculates the electrostatic potential to find the best positions for ion insertion by replacing water molecules that are at least at $3.50 \text{ \AA}$ from the protein surface. Periodic boundary conditions were employed and the water model used was the single point charge water, the default solvent of the GROMACS 3.2 package [18,19].

3. Results and discussion

3.1 Proposition of potential selective inhibitors for *Pf*SHMT

The first step of this work consisted of simplifying the structures of the potential *Pf*SHMT inhibitors formerly proposed by França et al. [13] (Figure 1) in order to propose simpler structures from a synthetic point of view and, also, to try to correlate the features of those structures with the known antimalarial drugs. The studies performed by França et al. [13] showed that, to act as selective ligands for the *Pf*SHMT active site, the tails of the FFO analogues should be short, in order to avoid the repulsive interactions with residues Lys138, Lys139 and Lys140 of the active site of *Pf*SHMT, as is the case for compounds **3** and **7** in Figure 1. On the other hand, the tails may also be longer, but in this case they must possess both negative and positive charges at specific positions in order to explore their interactions with Lys138, Lys139, Lys140 and Glu137.

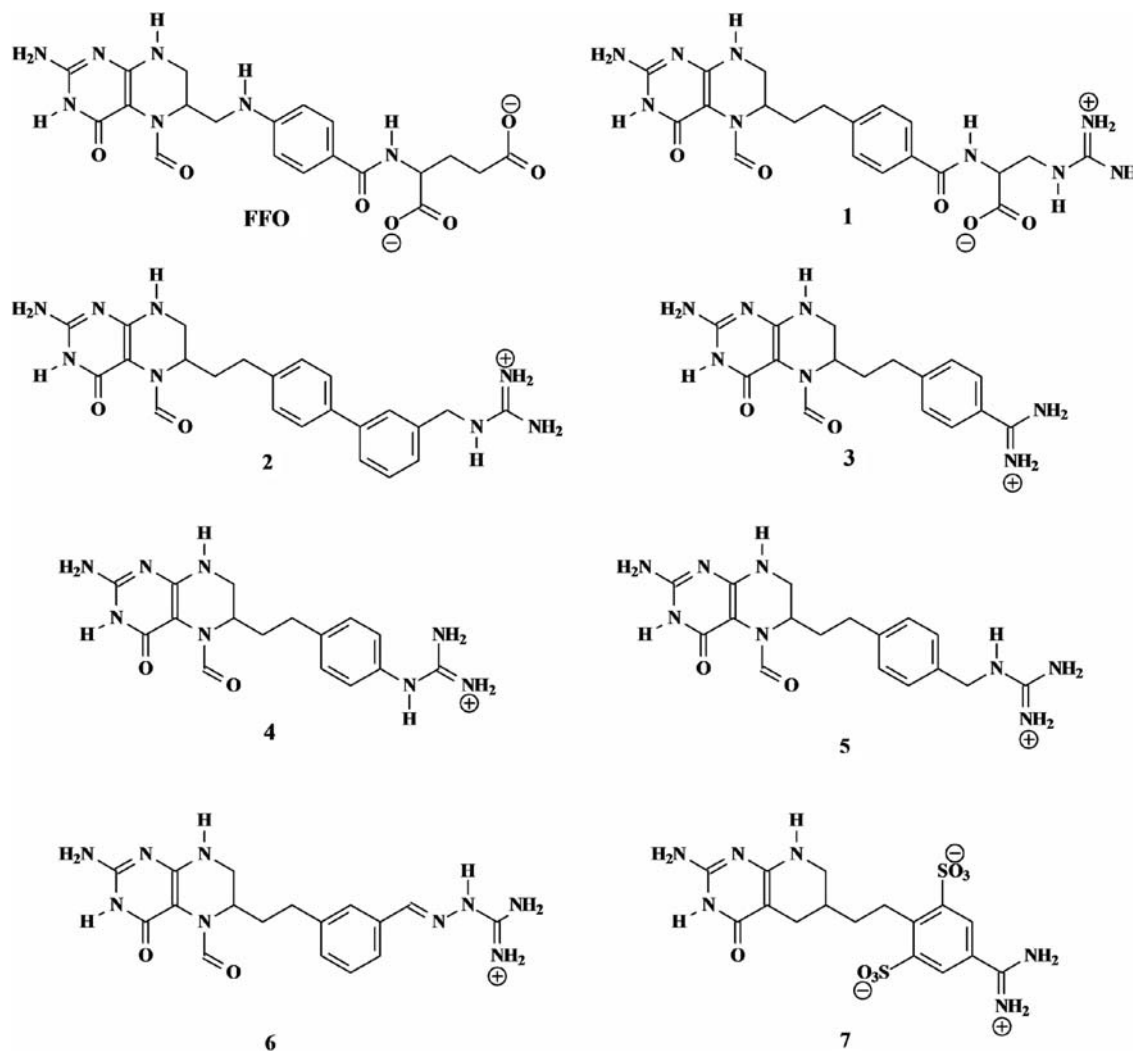


Figure 1. Structures of FFO and the seven compounds proposed by França et al. [13].

Figure 2 shows the structures of the five compounds proposed in this work. Compounds **1** and **2** are two additional derivatives of folate similar to the compounds already studied by França et al. [13] and presented in Figure 1. Compounds **3–5**, on the other hand, are derivatives of trimetopima, a known antimalarial drug belonging to the class of the 2,4-diaminopyrimidines. The study of these compounds, besides giving continuity to the studies started by França et al. [13], also makes a correlation of the features suggested in that work, to improve the drug affinities to our target (SHMT), with the structures of a class of antimalarial drugs, already commercially available, in order to propose new structures of derivatives of those drugs that could be even more active. Another important contribution is the fact that literature describes 2,4-diaminopyrimidines as specific DHFR inhibitors [20–22]. The proposition of molecules of this class, also able to target SHMT, could afford new antifolates that are eventually more efficient in the fight

against resistance, once SHMT is an enzyme less susceptible to mutation [12,13].

In compounds **1** and **2**, the pteridinic ring was replaced by a pyrimidinic one and the only modification on the *para*-amino benzoic acid (PABA) portion of these molecules related to FFO was the replacement of the N atom in the bridge linking the PABA portion to the pteridinic ring by an O atom, in compound **1**, and by changing the positions of the N and C atoms in the same bridge in compound **2**. These modifications had the goal of avoiding the ligand acting as an enzyme agonist once that N atom in FFO participates in the mechanism of action of SHMT by forming an aldimine [23].

In compounds **3–5** the FFO pteridinic ring was replaced by a 2,4,6-triamino-pyrimidinic ring in order to afford the trimetopime derivatives already mentioned above. In the same way as for compounds **1** and **2**, the N atom in the bridge linking the rings was substituted to avoid agonism. The tails of all compounds are positives

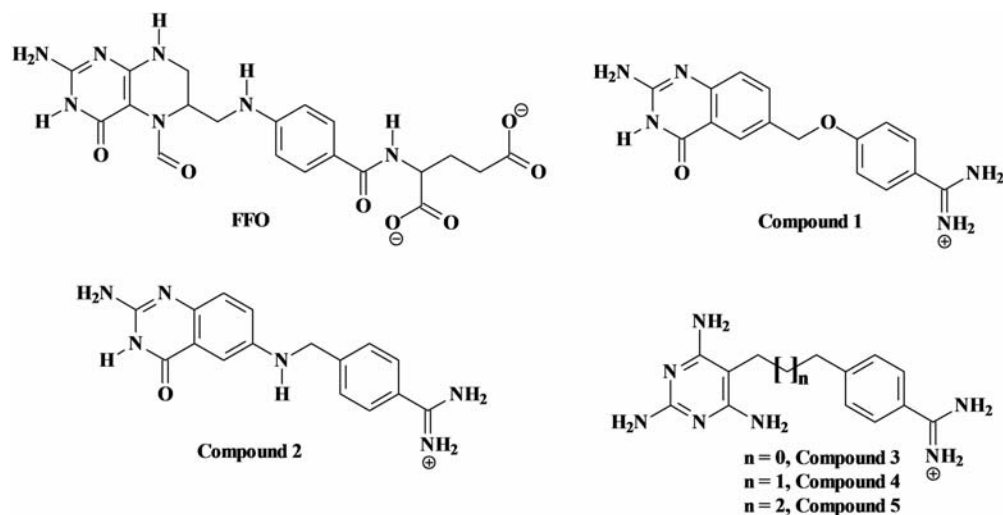


Figure 2. Structures of FFO and compounds 1–5.

with a diamine substituent in order to potentialise interactions with Glu137 in *Pf*SHMT.

In compounds 3–5 we also modified the size of the linking bridge in order to verify how the tail length would influence the interaction with the active sites in both enzymes and define the ideal length to maximise interactions with the active-site residues.

As already mentioned, all modifications had the goal of facilitating the synthetic process and preserving the features considered important to a selective inhibitor of *Pf*SHMT. Figure 3 illustrates this by showing proposals of generic synthetic routes for compounds 1–5.

The hypotheses that such compounds could also interact with the other enzymes of the folate cycle provoking a collateral and toxic effect to the human host is not forgotten. Metabolic and toxicological studies, however, are part of a step subsequent to finding a prototype in the drug design [24]. Our proposal in this work was just to propose structures with potentially more affinity by *Pf*SHMT taking into account a feasible synthetic route.

3.2 Docking studies of the proposed inhibitors

After optimisation and generation of the .pdbq files in the PRODRG Dundee server [15], FFO and compounds 1–5 were docked, using the software AutoDock 3.0.5 [16], inside the active sites of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT, already anchored with PLG, in order to compare their docking energies and also to estimate their selectivity related to *Hs*SHMT. This same computational procedure has been already employed in literature for similar systems, with good results [25,26].

For the docking energies calculations we used the .pdbq files of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT, anchored with PLG

and FFO, generated by França et al. [12] after 1000 ps of MD simulations. The FFO coordinates were removed from each active site in order to liberate space for the docking grid. The docking energies of FFO and compounds 1–5 were calculated according to the procedure described in the methodology section and the best 100 conformations generated for each compound, inside each active site, by the final docking energies (FDE) were analysed. The FDE are calculated by adding the final intermolecular energies (FIE) to the final internal energy of ligand (FIEL).

Table 1 presents the values of the lowest docked energies (LDE) among the 100 conformations and the mean docked energies (MDE) among the values of FDE for each molecule in *Pf*SHMT and *Hs*SHMT active sites, respectively. Besides, Table 1 also presents the Boltzmann relationship [27,28] for each ligand in *Pf*SHMT and *Hs*SHMT. Boltzmann launched the basis of the statistical mechanics by introducing statistics in the explanation of the natural phenomena [28–30]. One of the Boltzmann relationships [Equation (1)] helps us to create a relationship between two populations when analyzing their energy levels

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\Delta E/kT}. \quad (1)$$

In Equation (1), ΔE is the energy variation for each system, k is the Boltzmann constant ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) and T is the system temperature in Kelvin degrees. In this relationship if, by any way, we increase the concentration of one of the populations, the concentration of the other will be reduced. The bigger the relationship N_2/N_1 , bigger would be the affinity for one enzyme related to another.

The Boltzmann relationships for each ligand in *Pf*SHMT and *Hs*SHMT were calculated from the MDE

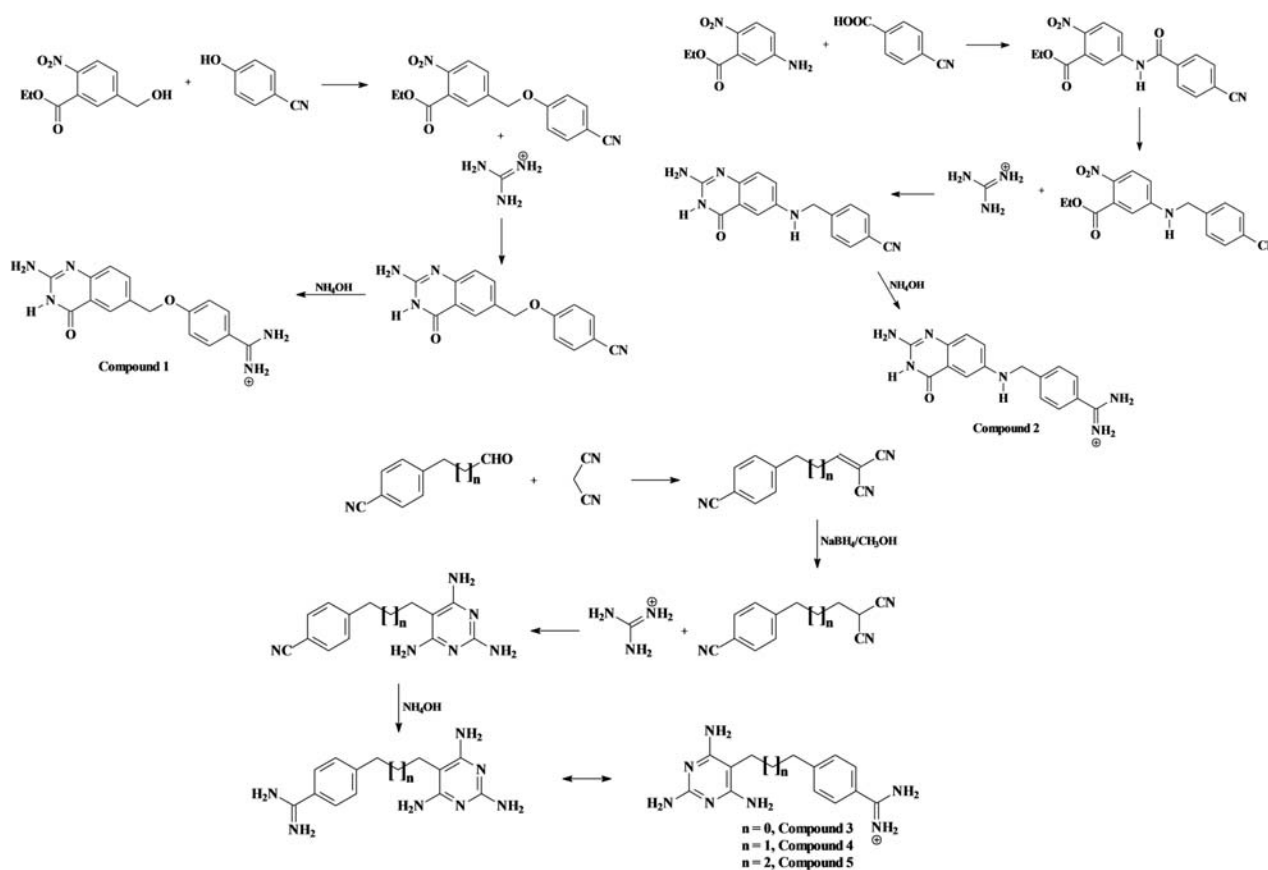


Figure 3. Possible synthetic routes for compounds 1–5.

Table 1. LDE, MDE (kcal mol⁻¹) and Boltzmann relationship for the ligands docked in *Hs*SHMT and *Pf*SHMT active sites.

Ligand	<i>Hs</i> SHMT [N_1 (kcal mol ⁻¹)]		<i>Pf</i> SHMT [N_2 (kcal mol ⁻¹)]		$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\Delta E/kT}$
	LDE	MDE	LDE	MDE	
FFO	-16.02	-12.43	-14.51	-12.75	—
Compound 1	-12.83	-11.30	-11.89	-10.40	18.03:81.97
Compound 2	-13.30	-11.30	-12.69	-11.40	54.07:45.93
Compound 3	-11.57	-10.10	-11.35	-9.70	34.25:65.75
Compound 4	-10.75	-9.53	-11.91	-11.74	97.35:2.65
Compound 5	-9.03	-7.74	-10.60	-8.85	85.93:14.07

at a temperature of 310 K considering *Hs*SHMT as N_1 and *Pf*SHMT as N_2 . Table 1 presents the values of the Boltzmann relationships obtained together with the LDE and the MDE for each ligand.

From Table 1 one can see that FFO, as already expected, presents better docking energy (DE) values (more negative) for both enzymes. Besides, the difference observed in the DE values between each compound in the active sites is about 2.0 kcal mol⁻¹, which makes difficult to choose the best compound based only on the DE analysis. On the other hand, using Boltzmann relationships we can have an idea of what those differences mean.

As can be seen by the Boltzmann relationship, compounds 4 and 5 are the only ones that would present

bigger populations of molecules inside the *Pf*SHMT active site with 97.35 and 85.95%, respectively. Compounds 1 and 3 would present more affinity for *Hs*SHMT while the molecules of compound 2 would practically be distributed equally between the two enzymes. These preliminary results suggest that compounds 4 and 5 would be potentially more selective to *Pf*SHMT.

Once compound 4 was found to be the most promising according to the Boltzmann relationship calculations [28], we decided to choose it in order to perform an initial qualitative analysis on its possible interactions with the active sites of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT by comparing its physiological behaviour with FFO through MD simulations studies.

3.3 MD simulations

In order to perform the MD simulation steps, FFO and compound **4** were docked, together with the PLG, inside the active sites of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT, affording four enzyme/PLG/ligand complexes. This docking was accomplished using, as reference, the *Pf*SHMT structure docked with PLG and FFO reported by França et al. [12]. Each complex was submitted to 50 ps of position-restrained MD followed by 3000 ps of MD simulations with no restriction, as described in the methodology section, and following the same technique already employed in the former molecular modelling studies involving the enzymes *Pf*DHFR [11] and *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase [31].

Calculations of the temporal root mean square deviation (RMSD) were carried out for all the atoms in all the systems for 500 frames generated at each 2 ps of MD simulation. In this case the result is a unique general value for each enzyme monitored throughout the whole simulation time. Taking into account that the complexes could float inside the water box, each frame was adjusted to the former by the minimum squares method when calculating the SD. In Figure 4, where the variation of the energy with time is monitored for the systems *Hs*SHMT/PLG/FFO and *Pf*SHMT/PLG/FFO, it can be observed that the systems equilibrate along the first 500 ps of the MD simulation. This behaviour was common to all the four MD simulations. We also observed that, for all

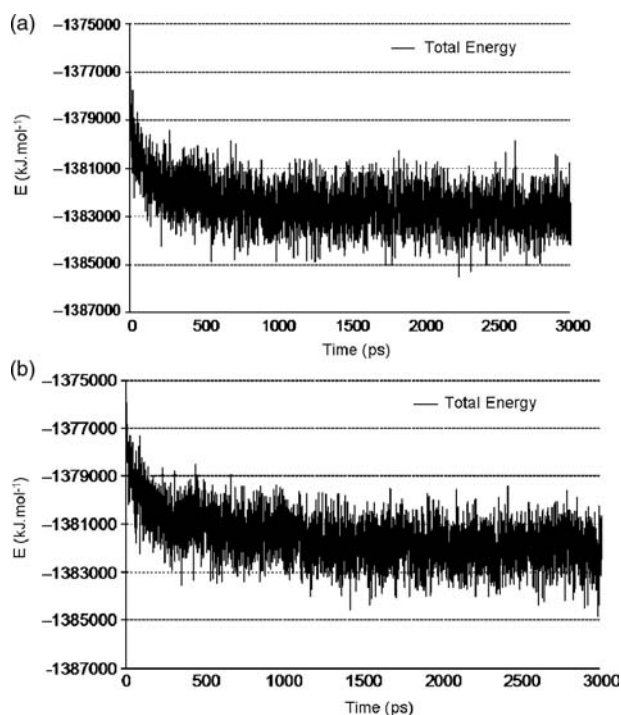


Figure 4. Energy variation along the 3000 ps of MD simulation of: (a) system *Hs*SHMT/PLG/FFO and (b) system *Pf*SHMT/PLG/FFO.

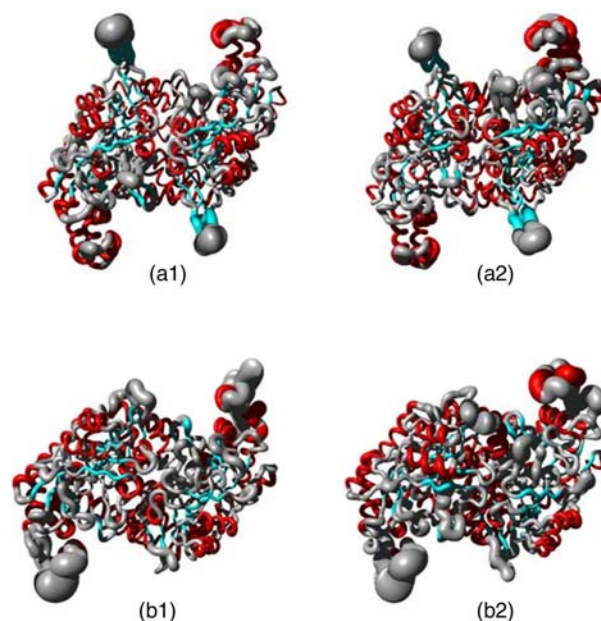


Figure 5. Qualitative illustrations of RMSF for the MD simulations of: (a1) *Hs*SHMT/PLG/FFO; (a2) *Hs*SHMT/PLG/compound **4**; (b1) *Pf*SHMT/PLG/FFO; (b2) *Pf*SHMT/PLG/compound **4**. Red tubes correspond to α -helix; blue tubes correspond to β -sheets and light grey tubes correspond to loops. (Colour available in online version).

simulations, the temporal RMSD of the SHMTs as apoenzymes practically fits the temporal RMSD of the complexes (data not shown). Also, as expected, the ligands display a greater fluctuation than the whole complexes but with a smaller RMSD, thus confirming the stability of the MD simulations.

The spatial RMSD (RMSF) of each amino acid residue was also calculated in the time range of 100–3000 ps, at each ps, totaling 2900 frames. In Figure 5 are shown the qualitative illustrations in the tube representation of the RMSF for the systems. Analyzing this figure it can be determined that the most mobile regions along the MD simulations are the regions with major thickness of the tubes. These regions correspond to the residues near the two terminuses of each monomer and to the loops regions. On the other hand, the residues at the active site regions, as well as those at the α -helix and β -sheet regions, present lower RMSF values, revealing to be the most stable regions of the system. Along the MD simulations, very few fluctuations exceeded 0.2 nm and even less over passed 0.4 nm.

3.3.1 Behaviour of FFO and compound **4** along the MD simulations

In MD simulations it is possible to analyse the atoms' fluctuations inside the enzymes' active sites. The superposition of the ligand structures recorded at each 100 ps of MD simulations affords a visual idea of the stability of each part of the molecule along the simulation.

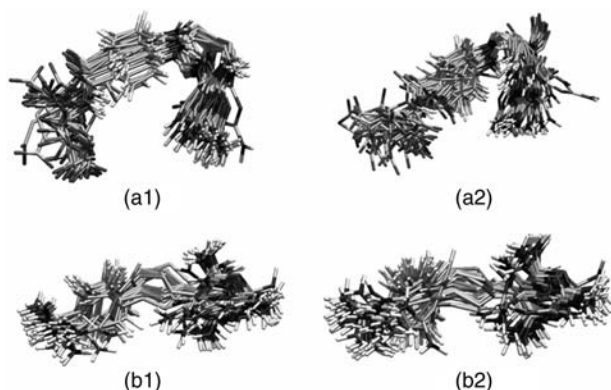


Figure 6. Superposition of the structures of FFO and structures of compound **4** along the MD simulation. (a1) FFO in the system *HsSHMT*/PLG/FFO; (a2) FFO in the system *PfSHMT*/PLG/FFO; (b1) compound **4** in the system *HsSHMT*/PLG/compound **4**; (b2) compound **4** in the system *PfSHMT*/PLG/compound **4**.

The superposition of the structures of FFO and structures of compound **4** obtained along all the simulation are shown in Figure 6, where one can see that both the ligands stabilise well in both systems with major fluctuations occurring only in their extremities.

3.3.2 Analysis of the hydrogen bonds (HBs) along the MD simulation

Non-covalent interactions are essential for the maintenance of the protein structure, for recognising processes and for the enzyme–ligand interactions. The HB is a special kind of interaction between non-bonded atoms with a very important role in the affinity of a molecule for an enzyme. In this work we investigated only the HBs formed and maintained between each enzyme and each ligand. These HBs were classified as direct HBs (dHB) and water intermediated HBs (wHB). In order to evaluate qualitatively the nature of each HB, we calculated the prevalence (temporal occurrence) of each interaction along the 3000 ps of MD simulation for the systems SHMT/PLG/FFO and SHMT/PLG/compound **4**. The results obtained are presented in Tables 2 and 3. These tables report only those HBs with more than 10% of prevalence.

From Table 2 one can see the existence of 10 HBs in the system *HsSHMT*/PLG/FFO versus 08 HBs in the system *HsSHMT*/PLG/compound **4**. Besides, there exists only one important wHB (FFO with Asn375) that occurred in 45.2% of the simulation time. This result suggests a better affinity of FFO for *HsSHMT*.

For the system *PfSHMT*/PLG/FFO, one can observe the existence of 11 dHBs versus 13, when compared to the system *PfSHMT*/PLG/compound **4**, plus some additional wHBs (Table 3). Also, for *PfSHMT*/PLG/FFO there is a HB between Hys129 and FFO occurring in 46.4% of the simulation time and 03 wHBs between Lys237 and FFO. For the system *PfSHMT*/PLG/compound **4** few wHBs

Table 2. Prevalence of HBs of *HsSHMT* with FFO and compound **4**.

Donor	Receptor	<i>HsSHMT</i> / FFO		<i>HsSHMT</i> / compound 4	
		dHB	wHD	wHB	wHD
Leu139	FFO	29.9	–	–	–
Asn375	FFO	0.2	45.2	–	–
Asn375	FFO	27.2	0.5	–	–
Lys376	FFO	22.6	3.7	–	–
Thr378	Compound 4	–	–	15.7	–
Thr378	Compound 4	–	–	19.0	0.2
Arg392	FFO	13.1	0.1	–	–
Tyr57	FFO	16.4	0.1	–	–
Tyr57	FFO	13.3	0.5	–	–
Compound 4	Thr378	–	–	15.3	–
Compound 4	Thr378	–	–	10.5	–
Compound 4	Thr378	–	–	14.1	0.1
FFO	Tyr62	19.1	2.1	–	–
Compound 4	Tyr543	–	–	3.5	14.9
Compound 4	Gln281	–	–	9.1	3.4
Compound 4	Gly283	–	–	10.2	–
FFO	Gly137	66.7	–	–	–
FFO	Leu139	25.8	–	–	–

were observed while some dHB remained for more than 20% of the simulation time. Those results suggest a slight preference of compound **4** for the *PfSHMT* active site.

Table 3. Prevalence of HBs of *PfSHMT* with FFO and compound **4**.

Donor	Receptor	<i>PfSHMT</i> / FFO		<i>PfSHMT</i> / compound 4	
		dHB	wHD	dHB	wHD
Leu130	FFO	13.0	–	–	–
Lys237	FFO	3.4	19.5	–	–
Lys237	FFO	2.8	12.6	–	–
Lys237	FFO	3.2	16.0	–	–
Asn354	Compound 4	–	–	13.5	–
Asn354	Compound 4	–	–	20.0	–
Asn354	Compound 4	–	–	22.9	–
Asn354	Compound 4	–	–	15.2	–
Arg371	FFO	15.2	5.9	–	–
Arg371	Compound 4	–	–	10.7	–
Arg371	Compound 4	–	–	16.7	–
FFO	Gly128	14.9	0.1	–	–
FFO	Hys129	12.5	0.2	–	–
INB4	Lys139	–	–	19.1	–
Compound 4	Lys139	–	–	17.4	0.7
FFO	Ser142	37.6	–	–	–
Compound 4	Asn354	–	–	23.6	–
Compound 4	Tyr63	–	–	11.8	–
Compound 4	Hys129	–	–	11.1	4.3
Compound 4	Asn354	–	–	24.3	–
Compound 4	Tyr63	–	–	12.2	0.1
FFO	Thr357	5.3	10.2	–	–
FFO	Arg371	18.0	–	–	–
FFO	Hys129	46.4	4.5	–	–

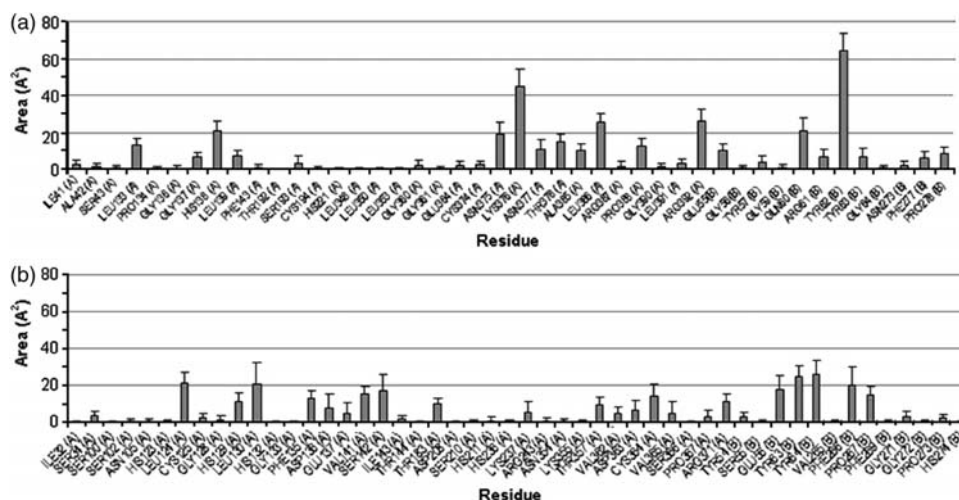


Figure 7. Residues implicated in the surface of intermolecular contact between: (a) *HsSHMT* and FFO; (b) *PfSHMT* and FFO. The parenthesis after each residue indicates the chain to which the residue belongs.

3.4 Analysis of the surfaces of intermolecular contact

In order to provide a better understanding of the ligand–enzyme interactions, the surfaces of intermolecular contact of each enzyme with FFO and compound **4** were calculated, discriminated by each residue present in the interfaces SHMT/FFO and SHMT/compound **4**. In this way, it is possible to verify standards of interaction and identify the residues evolved in this interface as well as the residues forming HBs with the ligand.

Analysis of Figures 7 and 8(a) reveals the residues responsible for the intermolecular surface areas in each active site for the systems *HsSHMT*/ligand. One can notice that the interaction areas for several residues stay above 10 Å^2 suggesting a good interaction of FFO with the enzymes, as already expected. Table 4 present the residues

responsible for the surface of intermolecular contact for both enzymes.

In the same way as for *HsSHMT*, Figures 7 and 8(b) reveal the residues responsible by the intermolecular surface areas in each active site for the systems *PfSHMT*/ligand. We can see that the areas of interaction for several residues stay above 6 Å^2 suggesting a good interaction of each enzyme with compound **4**. Also, Table 4 presents the residues responsible for the surface of intermolecular contact around compound **4** for both enzymes. As the active sites of dimmeric SHMTs are shared by residues of both the monomers [12], Figures 7 and 8 indicate to which chain each residue belongs.

Comparisons of the interaction surfaces also reveal little differences in the affinity of compound **4** for

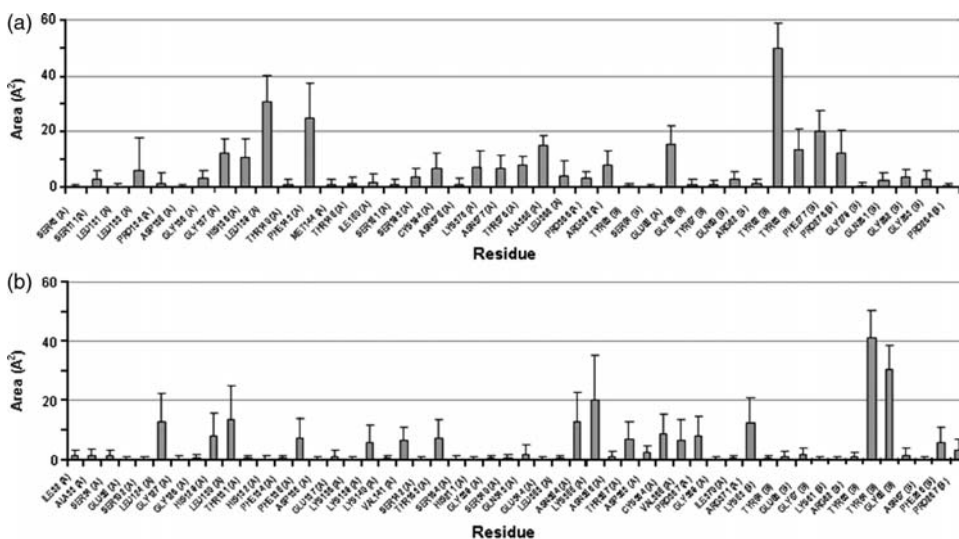


Figure 8. Residues implicated in the surface of intermolecular contact between: (a) *HsSHMT* and compound **4**; (b) *PfSHMT* and compound **4**. The parenthesis after each residue indicates the chain to which the residue belongs.

Table 4. Main residues responsible for the surface of contact of SHMT/ligand.

<i>Hs</i> SHMT/ FFO	<i>Pf</i> SHMT/ FFO	<i>Hs</i> SHMT/ compound 4	<i>Pf</i> SHMT/ compound 4
Glu55	Glu56	Glu93	Tyr63
Gln60	Tyr63	Tyr100	Tyr64
Tyr62	Tyr64	Tyr101	Leu124
Leu133	Leu124	Leu133	Hys129
Gly137	Hys129	Gly137	Leu130
Hys138	Leu130	Hys138	Phe135
Leu139	Phe135	Leu139	Lys139
Pro278	Asp136	Phe143	Val141
Asn375	Val141	Cys194	Thr183
Lys376	Ser142	Phe315	Asn354
Asn377	Thr183	Pro316	Lys355
Thr378	Phe266	Lys376	Thr357
Ala385	Pro267	Asn377	Cys364
Leu386	Thr357	Thr378	Val365
Pro388	Cys364	Ala385	Pro367
Arg392	Arg371	Arg392	Arg371

*Pf*SHMT and *Hs*SHMT. In Tables 2 and 3 we can see the dHBs formed along the MD simulations between the main residues of the contact surface and compound **4**. In this way one can notice that *Hs*SHMT formed dHBs only between residue Thr378 and compound **4** while in *Pf*SHMT compound **4** formed dHBs with the residues Tyr63, Hys129, Lys139, Asn354 and Arg371.

Another important achievement of the analysis of the surfaces of intermolecular contacts is the fact that it was possible to observe some important residues in the enzymes, interaction sites not reported earlier by França et al. [12]. For *Hs*SHMT we observed the residues Pro278, Lys376 and Ala385 interacting with FFO as well as with compound **4** and for *Pf*SHMT there were observed the residues Phe135, Val141, Thr357 and Cys364. This information could be very useful for additional studies of selective inhibitors to *Pf*SHMT.

4. Conclusion

In the first step of this work, we performed docking studies of five potential *Pf*SHMT selective inhibitors conceived and designed from the insights into selective inhibition of *Pf*SHMT reported by França et al. [12] and having in mind the correlation to structures of a known antifolate besides the proposition of simpler structures from a synthetic point of view. Docking results suggested that the fused rings on the pteridinic portion of FFO could not be an essential feature for a good interaction of the ligands with the *Pf*SHMT active site and, also, that the tail size could be an important factor to be considered, once the more flexible and big-tailed compounds **4** and **5** were more selective related to the more rigid compounds **1** and **2** and the short-tailed compound **3**. These results also suggest that the derivatives of DHFR inhibitors such as compounds **4** and **5**

could also be potential SHMT inhibitors affording new antifolates eventually more efficient in the fight against resistance, if we take into account that SHMT is an enzyme less susceptible to mutation [12,13].

In the second step we performed 3000ps of MD simulations of compound **4** and FFO anchored in the active sites of *Pf*SHMT and *Hs*SHMT in order to make a qualitative investigation of its interactions with the *Pf*SHMT and *Hs*SHMT active sites. The analysis of the dynamic behaviour of FFO and compound **4** along the MD simulations allied to the HB analysis suggested the following. (1) Compound **4**, despite stabilising well inside both active sites, forms and maintains more HBs with *Pf*SHMT than with *Hs*SHMT along the MD simulations. (2) These results suggest that structures like compound **4** could be potential candidates for selective inhibitors of *Pf*SHMT. (3) Finally, the analysis of the residues present in the interaction surfaces of intermolecular contact in both enzymes revealed important residues in the active sites not reported in the former studies by França et al. [12]. For *Hs*SHMT the residues Pro278, Ala358, Lys376 and Thr378 were involved in interactions with FFO and with compound **4**. For *Pf*SHMT the new residues were Phe135, Val141, Thr357 and Cys364. The studies of the potential interactions of these residues with new ligands could bring important improvements in the design of selective inhibitors for *Pf*SHMT.

Further studies are now on course in our lab in order to investigate the relevance of the new residues for selective inhibition and, also, to explore structures of 2,4-diaminopyrimidines analogues as potentially more efficient selective inhibitors of *Pf*SHMT.

Acknowledgements

We are grateful to IME, CNPq, FAPERJ and CAPES for funding this work.

References

- [1] Available at http://portalweb02.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm (accessed December 2008).
- [2] Available at <http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/malaria.htm> (accessed December 2008).
- [3] I.S. Soares and M.M. Rodrigues, *Malaria vaccine: road-blocks and possible solutions*, Braz. J. Med. Biol. Res. 31 (1998), pp. 317–332.
- [4] Available at <http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html> (accessed December 2008).
- [5] *The World Health Organization Report*, WHO Publications, Geneva, 1997.
- [6] W. Peters, *Drug resistance in malaria parasites of animals in man*, Adv. Parasitol. 41 (1998), pp. 1–62.
- [7] S.J. Foote and A.F. Cowman, *The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs*, Acta Trop. 56 (1994), pp. 157–171.
- [8] P. Newton and N. White, *Malaria: new developments in treatment and prevention*, Annu. Rev. Med. 50 (1999), pp. 179–192.
- [9] N.J. White and P.L. Olliaro, *Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy of malaria*, Parasitol. Today 12 (1996), pp. 399–401.

- [10] R.T. Delfino, O.A. Santos Filho, and J.D. Figueroa-Villar, *Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant Plasmodium falciparum DHFR*, Biophys. Chem. 98 (2002), pp. 287–300.
- [11] T.C.C. França, A.L.R. Medeiros, O.A. Santos Filho, E.C.P. Santos, and J.D. Figueroa-Villar, *A complete model of the Plasmodium falciparum bifunctional enzyme dihydrofolate reductase–thymidylate synthase. A model to design new antimalarials*, J. Braz. Chem. Soc. 15 (2004), pp. 450–454.
- [12] T.C.C. França, P.G. Pascutti, T.C. Ramalho, and J.D. Figueroa-Villar, *A three-dimensional structure of Plasmodium falciparum serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine and 5-formyl-tetrahydrofolate. Homology modeling and molecular dynamics*, Biophys. Chem. 115 (2005), pp. 1–10.
- [13] T.C.C. França, A. Wilter, T.C. Ramalho, P.G. Pascutti, and J.D. Figueroa-Villar, *Molecular dynamics of the interaction of Plasmodium falciparum and human serine hydroxymethyltransferase with 5-formyl-6-hydrofolic acid analogues: design of new potential antimalarials*, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006), pp. 1383–1392.
- [14] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratman, J.C. Vurant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuch, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Foz, T.M. AlLaham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Jonson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, and J.A. Pople, *Gaussian 98, Revision A.11*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2001.
- [15] A.W. Schuettelkopf and D.M.F. van Aalten, *PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes*, Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 60 (2004), pp. 1355–1363.
- [16] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, and A.J. Olson, *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function*, J. Comput. Chem. 19 (1998), pp. 1639–1662.
- [17] S.B. Renwick, K. Snell, and U. Baumann, *The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy*, Structure 6 (1998), pp. 1105–1116.
- [18] E. Lindahl, B. Hess, and D. Van der Spoel, *GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis*, J. Mol. Model. 7 (2001), pp. 306–317.
- [19] H.J.C. Berendsen, D. Van der Spoel, and R. Van Drunen, *GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation*, Comput. Phys. Commun. 91 (1995), pp. 43–56.
- [20] T.C.C. França, M.G. Santos, and J.D. Figueroa-Villar, *Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia*, Quim. Nova 31 (2008), pp. 1271–1278.
- [21] R.T. Delfino, O.A. Santos Filho, and J.D. Figueroa-Villar, *Type 2 antifolates in the chemotherapy of falciparum malaria*, J. Braz. Chem. Soc. 13 (2002), pp. 727–741.
- [22] E.F.F. da Cunha, T.C. Ramalho, E.R. Mala, and R.B. de Alencastro, *The search for new DHFR inhibitors: a review of patents*, Expert Opin. Ther. Pat. 15 (2005), pp. 967–986.
- [23] J.N. Sarsdale, G. Kazanina, S. Radaev, V. Schirch, and T. Wright, *Crystal structure of rabbit cytosolic hydroxymethyltransferase at 2.8 Å resolution: mechanistic implications*, Biochemistry 38 (1999), pp. 8347–8358.
- [24] L.P. Graham, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [25] J.R. Pinheiro, M. Bitencourt, E.F.F. da Cunha, and T.C. Ramalho, *About docking and QSAR approaches novel anti-HIV cyclotriazadisulfonamide derivatives as modeled by ligand- and receptor-based approaches*, Bioorg. Med. Chem. 16(4) (2008), pp. 1683–1690.
- [26] D. Josa, E.F.F. da Cunha, T.C. Ramalho, T.C.S. Souza, and M.S. Caetano, *Homology modeling of wild-type, D516V, and H526L Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase and their molecular docking study with inhibitors*, J. Biomol. Struct. Dyn. 25(4) (2008), pp. 373–376.
- [27] S.R. Dahmen, *Boltzmann's work in physics*, Rev. Bras. Ensino Fís. 28 (2006), pp. 281–295.
- [28] L. Boltzmann, in *Wissenschaftliche Abhandlungen*, F. Hasenöhrler ed., Vol. I–III, Barth, Leipzig, reissued New York: Chelsea, 1969.
- [29] J.L. Lebowitz, *Statistical mechanics: a selective review of two central issues*, Rev. Mod. Phys. 71 (1999), pp. S346–S357.
- [30] S.B. Volchan, *A probabilidade na mecânica estatística clássica*, Rev. Bras. Ensino Fís. 28 (2006), pp. 313–318.
- [31] T.C.C. França, M.R.M. Rocha, B.M. Reboredo, M.N. Rennó, L.W. Tinoco, and J.D. Figueroa-Villar, *Design of inhibitors for nucleoside hydrolase from Leishmania donovani using molecular dynamics studies*, J. Braz. Chem. Soc. 19 (2008), pp. 64–73.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)