

WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

Estudos de mecanismos redox enzimáticos por
eletroquímica e modelagem computacional

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Química, da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C157e Callera, Welder Franzini Amaral
Estudos de mecanismos redox enzimáticos por eletroquímica e modelagem computacional / Welder Franzini Amaral Callera. – Araraquara : [s.n.], 2017
96 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Paulo Roberto Bueno
Coorientador: Gustavo Troiano Feliciano

1. Metaloenzimas. 2. Análise eletroquímica.
3. Enzimas-Análise. 4. Bioquímica quântica. 5. Dinâmica molecular. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

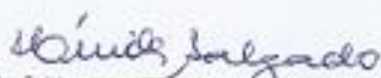
Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Araraquara, 04 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano (Coorientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



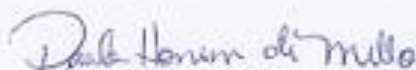
Prof.ª Dr.ª Herida Regina Nunes Salgado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof.ª Dr.ª Ariela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho
Universidade de São Paulo / USP / São Carlos - SP



Prof.ª Dr.ª Paula Homem de Mello
Universidade Federal do ABC / UFABC / Santo André - SP

WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas CALLERA, W. F. A.; CALLERA, WELDER F.A.

Sexo Masculino

Cor ou Raça Branca

Filiação Antonio Carlos Amaral Callera e Maria Célia Franzini Callera

Nascimento 18/06/1982 - Araraquara/SP - Brasil

Endereço residencial Rua Amazonas, 551

Jardim Silvania, Araraquara, SP – Brasil

CEP: 14811-066

Endereço profissional Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

R. Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha - Araraquara, SP - Brasil

CEP: 14800-900

URL da home page: www.iq.unesp.br

Endereço eletrônico weldercallera@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Estudos de mecanismos redox enzimáticos por Eletroquímica e Modelagem Computacional.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

- 2011 - 2013** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Estudo de processos redox enzimáticos confinados em eletrodos pelo concomitante monitoramento da variação de massa e da corrente: O caso da penicilinase como modelo., Ano de obtenção: 2013
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno
Bolsista da: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- 2005 - 2010** Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Título: Utilização de ensaio imunoenzimático de captura para determinação do nível de gp43 na urina de camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*
Orientador: Prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

- 2015 - 2015** Vínculo: Estágio docência, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Disciplina: Biotecnologia Farmacêutica. Ministrada ao 5º ano do curso de Farmácia.
Supervisora: Prof.^a Dr.^a Rosemeire Pietro.

- 2014 - 2014** Vínculo: Estágio docência, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Disciplina: Biotecnologia. Ministrada ao 4º ano do curso de Farmácia.
Supervisora: Prof.^a Dr.^a Rosemeire Pietro.
- 2013 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutorando, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações: Biotecnologia de Enzimas.
Biossensores: desenvolvimento e aplicações.
- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrando, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

08/2013 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química de Araraquara
Linhas de pesquisa: Biotecnologia de enzimas.

2. Universidade Estadual de Londrina - UEL

Vínculo institucional

2006 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

2006 - 2010 Estágio, Centro de Ciências Biológicas
Estágio:
Laboratório de Imunologia - PAT

04/2006 - 02/2007 Extensão Universitária, Centro de Ciências Biológicas
Especificação:
Diagnóstico da Paracoccidioidomicose por Ensaio
Imunoenzimático

Linhas de pesquisa

1. Biotecnologia de enzimas.

Objetivos: Biossensores: Desenvolvimento e Aplicações.
Biossensores são dispositivos analíticos no qual o material de origem biológica, tal como enzimas, anticorpos, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor. Os objetivos dos estudos residem em definir metodologias que apresentem alta seletividade e sensibilidade de análise.

Idiomas

Inglês	Avançado
Espanhol	Avançado

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. GONÇALVES, LUÍS MOREIRA; **CALLERA, WELDER F.A.**; SOTOMAYOR, MARIA D.P.T.; BUENO, PAULO R.

Penicillinase-based amperometric biosensor for penicillin G. **Electrochemistry Communications**, v.38, p.131-133, 2014.

Palavras-chave: cysteine, metallo- β -lactamase, Self-assembled monolayer (SAM), β -lactam antibiotic, Lineweaver–Burk plot

Referências adicionais: Inglês.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **CALLERA, W. F. A.**; ITANO, E. N.; MASSUDA, T. Y. C.

Utilização de anticorpos monoclonais a *gp380* e análise de *gp380* solúvel na paracoccidiodomicose experimental em urina de camundongos In: XVII EAIC - Encontro anual de iniciação científica - PIBIC/CNPq, 2008, Foz do Iguaçu - PR. **Encontro Anual de Iniciação Científica - XVII EAIC - PIBIC/CNPq.** , 2008.

Áreas do conhecimento: Imunologia, Imunologia Aplicada

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

Apresentação de trabalho e palestra

1. **CALLERA, W. F. A.**; RIECHI, S.C.; GUIMARÃES, P.M.; ANDRADE, L.A.; VOGLER, I.H.; SIMAO, A.N.C.

Estudo de prevalência de marcadores sorológicos para doenças infecto-contagiosas em doadores do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Londrina, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento: Farmácia, Hematologia, Imunologia

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Cidade: Londrina; Evento: 2º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas;

Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Produção técnica

Trabalhos técnicos

1. CALLERA, W. F. A.

Programa de educação pelo trabalho para a saúde - PET - Saúde - Portaria Interministerial MS/MEC nº1802/2008, 2009

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Redes sociais, websites, blogs

1. CALLERA, W. F. A.

A criação da Biotecnologia, 2014

Referências adicionais: Brasil/Português.

Home page: <<http://www.educacaoeminovacao.blogspot.com.br/2014/06/a-criacao-da-biotecnologia.html>>

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster/Painel no 2º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas, 2010. (Congresso)

Estudo de prevalência de marcadores sorológicos para doenças infecto-contagiosas em doadores do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Londrina.

2. Apresentação (Outras Formas) no I Fórum de Farmácia, 2007. (Outra)

Adequações no currículo vigente.

3. Apresentação de Poster/Painel no I Workshop de tópicos atuais em Imunologia do curso de Farmácia, 2006. (Outra)

Imunologia do transplante.

4. Apresentação de Poster/Painel na **VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia Industrial**, 2005. (Outra)

Atuação dos Estudantes de Farmácia da UEL junto aos agentes comunitários na campanha da Tuberculose em uma Unidade Básica de Saúde no município de Londrina.

“Eu não tenho ídolos. Tenho admiração por trabalho, dedicação e competência.

(Ayrton Senna)

A Deus por, simplesmente, tudo;

*Aos meus pais Antonio Carlos Amaral
Callera e Maria Célia Franzini Callera;*

Meu irmão Welber Franzini Amaral Callera;

E minha noiva, Aline Viana de Souza,

*Que desde sempre acreditaram, me guiaram
e me incentivaram,*

*Serviram-me de amor e companheirismo
pelo trajeto percorrido,*

Principalmente, nos momentos difíceis...,

Muitíssimo obrigado!

*A todos familiares e amigos que me
incentivaram e apoiaram...*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha gratidão e apreço por todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. Pois o final de mais esta etapa é um momento em que a realização pessoal e o crescimento profissional superaram qualquer obstáculo que tenha aparecido durante a sua execução.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, que acreditou e apostou na minha capacidade, não mediu esforços em colaborar, sugerir e apoiar minhas decisões.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano, que veio agregar em conhecimento, em amizade, me apoiou, ensinou e incentivou como um mestre e sem negar esforços.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Willian Ribeiro, Adriano dos Santos, Flávio Bedatty, Márcio Góes, Juliana Cecchetto, Tiago Benites, Fernanda Carvalho, Rute Lopes, Mellany I. G. Nicholson e Luis Paulo M. Freitas pelas discussões e contribuições geradas.

À Rose Portasio, pela sua prontidão em auxiliar.

A todos os funcionários do Instituto de Química, da UNESP, campus Araraquara – SP.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Às funcionárias da seção de pós-graduação e ao pessoal da biblioteca por sempre estarem receptivos e prontos a auxiliar.

A todos meus familiares e amigos, meus sinceros agradecimentos, por me aturarem, pelos desabafos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, e principalmente, por fazerem parte da minha vida.

À CAPES pela bolsa concedida... MUITÍSSIMO OBRIGADO.

RESUMO

Esta tese de doutoramento apresentou o entendimento de processos redox enzimáticos, detalhando o mecanismo envolvido na troca eletrônica, a qual resulta na formação de um produto, por catálise enzimática. Observou-se a influência de um eletrodo sob a ação de um potencial estacionário aplicado (E) na reação enzima/substrato. Realizou-se eletroanálises, como: Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), para a penicilinase. Os resultados obtidos dão indícios de que a reação enzimática se beneficia de determinados potenciais, pois o parâmetro utilizado, R_{ct} , resistência à transferência de cargas, sugere que ocorre maior troca eletrônica em alguns potenciais ótimos (faixa de -0,3 a -0,5 V). A Simulação Molecular serviu para estudar o comportamento atomístico por métodos clássicos (Dinâmica Molecular – DM) para as condições impostas experimentalmente, esclarecendo o mecanismo de reação enzimática por métodos quânticos (DFT – Teoria do Funcional de Densidade) e híbridos (QM/MM), cabendo salientar que a penicilinase não pertence à classe das enzimas oxirredutivas.

Palavras-chave: Enzimas redox. Voltametria Cíclica (VC). Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE). Dinâmica Molecular (DM). Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Métodos Híbridos (QM/MM). Penicilinase.

ABSTRACT

This doctoral thesis presented the understanding of enzymatic redox processes, detailing the mechanism involved in the electronic exchange, which results in the formation of a product by enzymatic catalysis. The influence of an electrode under the action of an applied stationary potential (E) on the enzyme/substrate reaction was observed. Electroanalysis was performed, such as: Cyclic Voltammetry (CV) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), for the penicillinase. The results obtained indicate that the enzymatic reaction benefits from certain potentials, since the parameter used, R_{ct} , resistance to the transfer of charges, suggests that there is greater electronic exchange in some optimal potentials (range the -0.3 to -0.5 V). The Molecular Simulation was used to study the atomistic behavior by classical methods (Molecular Dynamics - DM) for experimentally imposed conditions, clarifying the mechanism of enzymatic reaction by quantum methods (DFT) and hybrids (QM/MM). That penicillinase does not belong to the class of oxidoreductive enzymes.

Keywords: Redox enzymes. Cyclic Voltammetry (CV). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). Molecular Dynamics (DM). Density Functional Theory (DFT). Hybrid Methods (QM/MM). Penicillinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura cristalográfica de uma penicilinase de <i>Bacillus cereus</i> , com zinco. Coordenadas obtidas de 1BMC.pdb. A esfera cinza representa o átomo de zinco em seu sítio catalítico.....	25
Figura 2 - Placa de Petri, recoberta com ágar Sabouraud, inoculada com <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Penicillium notatum</i> , simulando a contaminação no experimento de Fleming, demonstrando a inibição do crescimento bacteriano onde se difundiu a penicilina no ágar, halo de restrição.	29
Figura 3 - Colônia fúngica característica de <i>Penicillium notatum</i> em ágar Sabouraud.....	29
Figura 4 - Mecanismo de ação da penicilinase, abertura do anel β -lactâmico na presença de água. O anel beta lactâmico é colapsado (1 e 2), a ligação amida é quebrada, o nitrogênio é reduzido a N ⁻ (3) e retira-se o hidrogênio da água (4).	34
Figura 5 - Estrutura da metalo- β -lactamase (2M5C.pdb) de <i>Bacillus cereus</i> , em tampão fosfato (PBS), pH 7, com dois íons zinco em seu sítio ativo.....	35
Figura 6 - Circuito elétrico equivalente, do tipo Randles (a), com diagrama de Nyquist (b). Onde R_s é resistência de solução, C_{dl} é capacitância da dupla camada elétrica, R_{ct} é resistência a transferência de cargas, Z_w é Impedância de Warburg, $-Z''$ é impedância imaginária e Z' é a impedância real. O diagrama (1) apresenta menor R_{ct} que o (2).	45
Figura 7 - Voltamograma cíclico obtido da limpeza eletroquímica.....	47
Figura 8 - Estrutura cristalográfica obtida por difratometria de raios-X da metalo- β -lactamase (coordenadas obtidas de 2M5C.pdb) de <i>Bacillus cereus</i> , em tampão fosfato (PBS), pH 7, com dois íons zinco em seu sítio ativo.	62
Figura 9 - VC's características de diferentes eletrodos: o de Au puro, o de Au/SAM, o de Au/SAM/Penicilinase e o de Au/SAM/Penicilinase na presença de substrato. Realizadas em solução de ferri/ferro, 1 mmol L ⁻¹ , em KNO ₃ , 0,5 mol L ⁻¹ . O substrato é a penicilina G a 0,65 mmol L ⁻¹ . Em destaque, ampliação na região onde ocorreu bloqueio de corrente (-0,5 a 0,5 μ A cm ⁻²) devido à formação de filme na superfície metálica.....	65
Figura 10 - Perfis voltamétricos de uma apoenzima e uma holoenzima, imobilizadas em eletrodo de Au. Realizado em PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4 a 25°C. Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Penicilina G a 0,65 mmol L ⁻¹ . O íon Zn ²⁺ , a 25 mmol L ⁻¹ , foi utilizado como cofator. Região hachurada indica um "laço de nucleação".	66
Figura 11 - Voltametrias cíclicas da reação enzimática da penicilinase com cofator. Realizado em PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4 a 25°C. Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Penicilina G a 0,65 mmol L ⁻¹ . Utilizou-se 0,01 mol L ⁻¹ e 0,2 mol L ⁻¹ de zinco como cofator. Ambas apresentaram densidades de corrente próximas e com "laço de nucleação". A VC do zinco apresenta um ponto de reversão da enzima em -0,6 V.	68

Figura 12 - Espectro de impedância (construídos em intervalo de frequências de 1 mHz a 1 MHz) para onze diferentes potenciais aplicados entre -0,6 V a 0,4 V. Estes espectros foram obtidos em PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4 a 25°C. Penicilina G (substrato) em concentrações de 0,65 mmol L ⁻¹ . Utilizou-se 1 mmol L ⁻¹ de cofator, Zn. Em destaque, regiões de baixa impedância real (Z').	70
Figura 13 - Em (a) tem-se o circuito elétrico equivalente correspondente ao sistema, onde C _m corresponde à capacitância da monocamada sem contribuição iônica, R _t e C _t , resistência e capacitância, respectivamente, não compensadas, R _s é resistência de solução, C _{dl} é capacitância da dupla camada elétrica, R _{ct} é resistência a transferência de cargas, Z _w é Impedância de Warburg. Em (b), tem-se diagramas de Nyquist realizados em solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, a 25°C, contendo 1 mmol L ⁻¹ de cofator e penicilina G a 0,65 mmol L ⁻¹ . Foram obtidas as correntes para os potenciais -0,3V, 0 V e 0,3 V para frequências de 1 mHz a 1 MHz, com cofator, zinco. Destacou-se em (c) e (d), as respectivas curvas de ajuste para cada potencial aplicado, de acordo com o circuito elétrico equivalente correspondente à interação eletrodo funcionalizado e seu substrato. Onde, -Z'' é impedância imaginária e Z' é a impedância real.	71
Figura 14 - Gráfico da resistência à transferência de carga (R _{ct}) vs. E (V). Mostra em a) a variação da R _{ct} na ausência e na presença de cofatores da reação enzimática na presença do substrato, Penicilina G em concentrações de 0,65 mmol L ⁻¹ , utilizou-se 1 mmol L ⁻¹ de cofator, Zn ou Co, em b) o comportamento de R _{ct} na presença e na ausência de substrato tendo Zn, como cofator. O aumento da atividade da metaloenzima é inversamente proporcional ao R _{ct} . A área hachurada corresponde aos potenciais que favorecem a reação.	73
Figura 15 - Penicilinase (2M5C.pdb) obtida por difratometria de raios-X, em pH 7. A <i>priori</i> , os íons inorgânicos foram retirados da estrutura.	76
Figura 16 - Função de distribuição radial (RDF) entre átomos, de oxigênio e nitrogênio, da proteína e os átomos de zinco. As trajetórias de Dinâmica Molecular foram obtidas para as concentrações de 0,01 e 0,2 mol L ⁻¹ de zinco, respectivamente.	78
Figura 17 - Distribuição de potencial eletrostático relacionado à carga parcial clássica da penicilinase, em volts. Região destacada pelo círculo corresponde ao sítio ativo, quando a enzima está inativa.	79
Figura 18 - Representação em fita da penicilinase junto com os resíduos carregados positivos (azul) e negativos (vermelho).	80
Figura 19 - Distribuição de potencial eletrostático relacionado à carga parcial clássica da penicilinase, em volts. Região destacada pelo círculo corresponde ao sítio ativo, quando a enzima está ativada pelo cofator.	81
Figura 20 - Representação atomística do modelo complexo enzima-substrato mais eletrodo, utilizado nos cálculos quânticos de estrutura eletrônica, com carbono (ciano), nitrogênio (azul), oxigênio	

(vermelho), hidrogênio (branco), enxofre (laranja), zinco (cinza) e ouro (amarelo).82

Figura 21 - Densidade de estados eletrônicos (DOS) quando adicionado água ao sistema, com e sem a influência do eletrodo de ouro. ES corresponde ao sistema modelo da enzima/substrato, ESH_2O contém uma molécula de água explícita e AUESH_2O , o sistema com uma molécula de água sob influência do eletrodo de ouro.84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

K_m – Constante de Michaelis-Menten

°C – Celsius

μ – Micro

A – Ampère

Å – Angstrom

A_{ativa} – Área ativa

AMCG – Auto-monitorização da glicemia capilar

C – Coulomb

CG – Glicemia capilar

d – Deci

DFT – *Density Functional Theory*

DNA – Ácido desorribonucleico

e^- – Elétron

ECE – Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

EDC – Etilo (dimetilaminopropil) carbodiimida

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

f – Femto

F_r - Fator de rugosidade

GAD – Ácido glutâmico

GGA – *Generalized gradient approximation*

GROMACS – *Groningen Machine for Chemical Simulations*

H – Hamiltoniano.

HLA – Antígeno leucocitário humano

Hz – Hertz

IA2 – Antitirosina fosfatase

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

j – Densidade de corrente

K – Kelvin

kDa – Kilodalton

LDA – *Local density approximation*

LSCF – *Local Self Density Field*

MM - Mecânica Molecular

M β L – Metalo- β -lactamase

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NHS – *N*-hidroxi-succinimida

PBS – Solução tampão fosfato de sódio

PDB – *Protein Data Bank*

QM – Mecânica Quântica

SAM – Monocamada auto-organizada (*self assembled monolayer*)

SIESTA – *Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousands of Atoms*

SPLAM – Método do átomo ligado com posição escalada

US\$ - Dólar americano

UV – Ultra violeta.

V – Volts

VC – Voltametria cíclica

Znt – Anti-transportador de zinco

Ψ – Função de onda

C – Capacitância

E – Potencial aplicado

R – Resistência

Z – Impedância

f – Frequência

i – Corrente elétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Penicilinase.....	24
1.1.1	Fleming e a penicilina	27
1.1.2	Antibioticoterapia e sepse	30
1.1.3	Resistência bacteriana e inibidores de β -lactamases	32
1.1.4	Penicilinase de <i>Bacillus cereus</i>	33
1.2	Métodos eletroquímicos	35
1.3	Simulação molecular.....	36
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Parte experimental.....	39
3.1.1	Análises Eletroquímicas.....	41
3.1.1.1	Voltametria cíclica (VC)	42
3.1.1.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	43
3.1.2	Protocolo de limpeza da superfície de ouro	45
3.1.3	Funcionalização do eletrodo	47
3.2	Parte teórica	48
3.2.1	Modelagem clássica	48
3.2.1.1	Mecânica Molecular (MM) ou Campos de Força	48
3.2.1.2	Dinâmica Molecular.....	51
3.2.2	Modelagem quântica.....	54
3.2.2.1	Mecânica Quântica (QM)	54
3.2.2.2	Equação de Schrödinger	55
3.2.2.3	Teoria do funcional de densidade (DFT)	57
3.2.2.4	Metodologia Híbrida - QM/MM	58
3.2.3	Protocolo de cálculos.....	61
4	PENICILINASE: abordagem eletroquímica e modelagem computacional	64
4.1	Abordagem Eletroquímica.....	64
4.2	Análise computacional da interação penicilinase/ Zn^{2+}	75
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos, a ficção científica e ciência se fundem, pois o que era apenas um fruto do imaginário poético ou fictício vem se tornando real por meio de muito estudo e avanço técnico-científico, principalmente no campo das Biotecnologias, área de conhecimento com caráter multidisciplinar, que tem por objetivo o desenvolvimento e/ou melhoria de processos de uso específico utilizando de organismos vivos ou parte deles (PLEIN, 1991).

Mary Shelley, em 1818, ao publicar sua obra “Frankenstein”, choca a sociedade da época ao relatar a criação de um homem gigantesco por meio da ciência, utilizando uma descarga elétrica como ignição da vida. Nos dias atuais, é considerado possível o desenvolvimento de vida em laboratório, devido às tecnologias de ponta desenvolvidas, como a técnica de clonagem, conhecida mundialmente por causa da famosa ovelha Dolly, nascida a 7 de julho de 1996, no Instituto Roslin, na Escócia, sendo o primeiro mamífero a ser clonado com sucesso a partir de uma célula adulta, e as modernas técnicas de embriogênese *in vitro* (MARCUS, 2002).

A ficção científica dividiu-se em vários subgêneros, sendo que no fim do século XX, destacou-se o Biopunk, o qual relata histórias em que indivíduos são manipulados geneticamente, como visto em “Admirável Mundo Novo”, de Aldous Huxley (1932), onde as pessoas eram condicionadas biologicamente e divididas por castas de acordo com características genéticas previamente estabelecidas. Entretanto, nesta época já se conhecia o conceito de eugenia, o “bem nascido”, criada em 1883, por Galton, definida como “o estudo dos agentes sob o controle social que podem melhorar ou empobrecer as qualidades raciais das futuras gerações seja física ou mentalmente”, seguido pela genética, estudo da variação de características herdadas, criada em 1908, por Bateson, sendo temas delicados e perigosos, se usados de maneira errônea e antiética, como no caso da “eugenia nazista”, na Alemanha governada por Adolf Hitler, de 1943-1945, que criou a Lei de

Nuremberg, a qual, resumindo, proibia relacionamento de alemães com judeus, por julgar serem inferiores, culminando no Holocausto, por isto o mundo precisa de cautela com os avanços tecnológicos (GALTON, 1883; HUXLEY, 1932; VAN OVERWALLE et al., 2006; DAWIDOWICZ, 2010).

A inovação biológica salta dos livros e vai além da Biotecnologia. É sobre cada manipulação humana de sistemas vivos em busca de quantidade e qualidade de vida, resumindo, mais saúde e maior tempo de perspectiva de vida, como pode ser observado pela criação de novas vacinas, alimentos transgênicos, entre outros avanços (VAN OVERWALLE et al., 2006).

A alimentação é um ponto estratégico, principalmente num mundo onde ainda 800 milhões de pessoas são cronicamente desnutridas, mesmo que uma boa parte destes seja de obesos que ingerem alimentos de baixo valor nutritivo, superando o números de pessoas com doença infecciosa grave, sendo a maior causa de problemas de saúde e morte prematura (COUSIN, 2014).

Nas atuais condições, é inaceitável desperdiçar capital humano e intelectual. Sendo que, a partir da combinação de novas ferramentas de informática, comunicação e compreensão biológica se tem cada vez mais inovações. É desejável que estas sejam de fácil acesso às populações de menores condições, sem que o potencial da ciência e tecnologia sejam perdidos (COUSIN, 2014).

A necessidade de melhores condições da população mundial serve como combustível para a chama da ciência, pois a cada dia que passa novos pesquisadores surgem e com eles a vontade de proporcionar melhor qualidade de vida à sociedade. Desta ânsia, surgem inovações em diversas áreas. Focando na área da saúde, investe-se em desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para que se detectem doenças antes que esta se manifeste clinicamente ou num novo fármaco com maior eficácia (COUSIN, 2014).

O desenvolvimento de dispositivos mais acurados abre espaço para o estudo dos fundamentos da fisiologia associados à corrente elétrica envolvida nas reações do corpo humano, por exemplo, os impulsos elétricos do sistema nervoso, sendo este um dos campos da bioeletrônica, ciência que propõe explorar a biologia

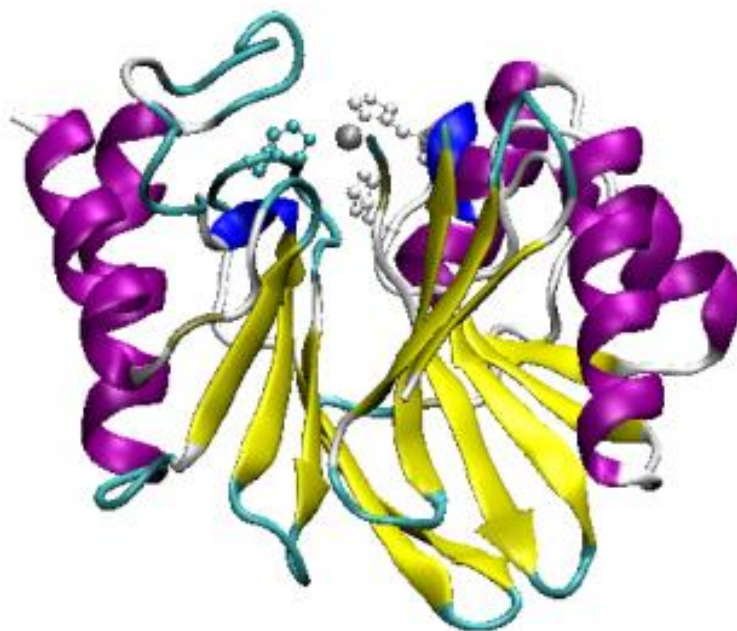
sinergicamente com a eletrônica, estando relacionada a processos bioeletroquímicos, os quais envolvem reações de oxirredução (MILLER, 1977).

Os processos redox definem-se como reações em que um dos reagentes, no caso o oxidante (ou redutor), aceita (doa) elétrons do (ao) reagente redutor (oxidante). Diversas reações que ocorrem nos organismos são oxirredutivas, como a respiração celular, que consiste na oxidação da glicose na presença de oxigênio (O_2) formando gás carbônico (CO_2), água e energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). No entanto, esta reação não ocorre diretamente, sendo necessárias diversas etapas mediadas por enzimas da classe das oxirredutases, ou seja, a glicose vai cedendo elétrons, de 2 em 2, e formando intermediários mais oxidados (GNAIGER et al., 1995).

1.1 Penicilinase

Muitas oxirredutases são metaloproteínas com função catalítica ou, simplificada, metaloenzimas. As metaloenzimas são proteínas que possuem um ou mais íons metálicos ligados covalentemente à sua cadeia polipeptídica. A função da metaloenzima é conferida por um átomo metálico que estabilizará a forma terciária ou quaternária da molécula, sendo este necessário para a atividade catalítica e que contribuirá para o efeito eletrônico comum das reações de oxirredução, como observado na penicilinase de *Bacillus cereus*, Figura 1 (ROSALES et al., 1986; GÓMEZ-ARIZA et al., 2004; SZPUNAR, 2005; MOUNICOU et al., 2009; SHI ; CHANCE, 2011).

Figura 1 - Estrutura cristalográfica de uma penicilinase de *Bacillus cereus*, com zinco. Coordenadas obtidas de 1BMC.pdb. A esfera cinza representa o átomo de zinco em seu sítio catalítico.



Fonte: adaptado de Carfi et al. (1995).

Os metais de transição, como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e cobalto (Co), devido às suas propriedades (pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloenzimas com a função de cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína e é responsável pela transferência de elétrons entre a enzima e o substrato (enzima redox) (SILVA, 2009).

As β -lactamases (EC 3.2.5.6) são hidrolases, porém apresentam “características” redox, que hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico do antibiótico, fazendo com que este perca sua função de inibir a síntese da parede celular bacteriana. São divididas em quatro classes de acordo com a sua estrutura

primária e podem também ser classificadas dentro de dois grupos com base no seu mecanismo catalítico, isto é, serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B), de acordo com a classificação de Ambler (BERTONCHELI E HÖRNER, 2008).

Katchalski, na década de 60, introduziu os primeiros suportes inertes úteis na preparação das enzimas imobilizadas, visto que sua recuperação era difícil quando elas estavam livres em solução. Desta forma, possibilitou que as enzimas fossem imobilizadas no eletrodo de trabalho mediante ligações químicas covalentes dos grupos primários aminas e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte (-COOH; dentre outros) (GOLDMAN et al., 1968; MOSBACH, 1980; KATCHALSKI et al., 2006).

Vários métodos surgiram para ancoragem de substâncias em superfícies, dentre eles, as monocamadas automontadas (SAMs), como dito pelo próprio nome, são uma única camada molecular que se adsorve espontaneamente sobre uma superfície metálica para funcionalização, no caso o eletrodo de trabalho de ouro, e torna-o susceptível a uma variedade de aplicações, inclusive a de estudo da cinética enzimática quando se tem uma enzima redox acoplada/imobilizada a SAM (GONÇALVES et al., 2014; LUZ et al., 2014).

Com a possibilidade de imobilizar as enzimas vieram vários estudos relacionados com a cinética enzimática e desenvolvimento de biossensores, por exemplo, o sensor de penicilina, desenvolvido e estudado no grupo Nanobionics, o qual resultou no trabalho Penicilinase-based amperometric biosensor for penicillin G, de Gonçalves et al. (2014), fornecendo sinais analíticos referentes à abertura do anel β -lactâmico da penicilina pela metaloenzima, sendo esta responsável pela alta sensibilidade e seletividade do sensor, o que trouxe novos questionamentos relacionados ao mecanismo enzimático envolvido na reação (GONÇALVES et al., 2014).

Para que o desenvolvimento e análise da superfície adsorvida fosse possível, experimentalmente, optou-se pelo uso de ferramentas eletroquímicas para

compreender os mecanismos envolvidos na reação enzimática, no caso a Voltametria Cíclica (VC) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).

1.1.1 Fleming e a penicilina

O século XX foi marcado por uma das maiores descobertas da humanidade, a Penicilina, por Sir Alexander Fleming, em 1928, advento que trouxe inúmeros benefícios à sociedade civil, sendo um marco na história da farmacologia, que passou a ser contada do antes e depois do uso da antibioticoterapia (FLEMING, 1946; LUDOVICI, 1952).

Lembrando-se, que a supressão da atividade e crescimento bacteriano e o tratamento de doenças infecciosas constitui uma preocupação da comunidade científica, desde a escola francesa liderada por Pasteur à escola alemã tutelada por Koch é continuada até hoje, devido ao uso indiscriminatório dos antibióticos e o surgimento de cepas bacterianas resistentes às drogas conhecidas (FLEMING, 1946; PEREIRA; PITA, 2005; ANUSHA et al., 2015).

Alexander Fleming nasceu em 6 de Agosto de 1881, na Escócia. Em 1895, inicia uma nova fase com a sua ida para Londres, a capital, onde alguns dos seus irmãos já residiam. Em 1900, Fleming e outro irmão, John, alistaram-se no *London Scottish Regiment* estando em guerra com os *Boers*. Entretanto, nunca esteve na frente de combate. Ao receber uma herança de seu tio, pode abandonar o emprego e preparar-se aos estudos enveredando-se pelas áreas médicas (FLEMING, 1946; LUDOVICI, 1952; ROWLAND, 1957).

Em 1901, Fleming inicia seus estudos de medicina em Londres, na Escola Médica aspirando ao Hospital de St. Mary (ROWLAND, 1957; PEREIRA E PITA, 2005). Ao formar-se em 1906, começou a trabalhar com Almroth Wright, conceituado bacteriologista e patologista, no Serviço de Inoculação, no “Inoculation Department”, fundado em 1902 (ROWLAND, 1957; HUGHES, 1974).

Em 1909, Fleming passa a ser habilitado a realizar cirurgias, porém o apego pelo trabalho de investigação laboratorial, e, em particular, pela bacteriologia, levou-o a continuar suas pesquisas cujos resultados veio a publicar ao longo da sua vida na forma de livro e em revistas como *Practitioner*, *The Lancet*, *British Medical Journal*, *British Journal of Experimental Pathology*, *St Mary's Hospital Gazette*, *American Journal of Clinical Pathology*, *Gazette des Hôpitaux*, *Annales de l'Institut Pasteur*, *The Biochemical Journal*, entre outros. Alguns dos trabalhos de Fleming foram realizados em colaboração, destacando-se as publicações conjuntas com L. Colebrook, S.R. Douglas, A.E. Wright, A.B. Porteous, F.J. Clemenger, V.D. Allison, Ian H. Maclean, K.B. Rogers, C. Smith, J.R. May, A. Voureka, I.R.H. Kramer e W.H. Hughes (PEREIRA; PITA, 2005; ANUSHA et al., 2015).

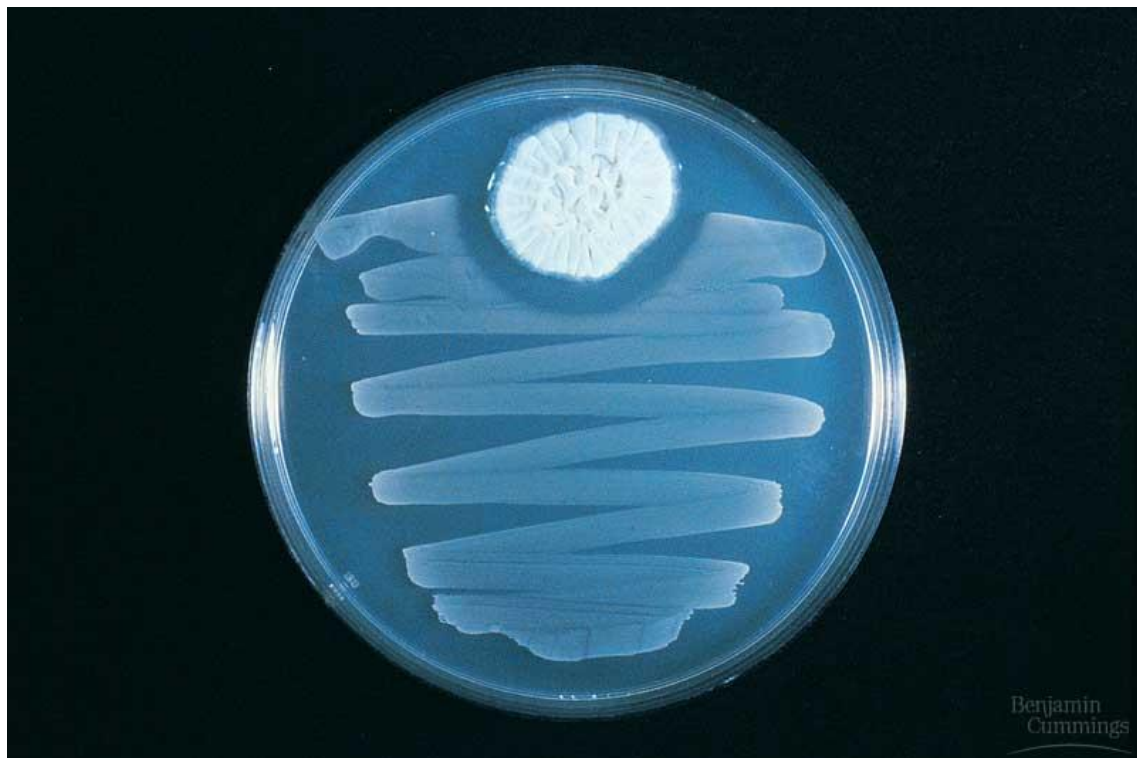
Na Primeira Guerra Mundial (1914-1918), Almroth Wright propôs ao governo britânico que o seu Serviço de Inoculação preparasse vacinas contra a febre tifoide e cuidasse das feridas dos guerrilheiros feridos em combate, no intuito de evitar processos infecciosos. Assim, Fleming e outros pesquisadores foram enviados para *Boulogne-sur-Mer*, onde instalaram um laboratório, no qual estudaram um amplo número de microrganismos, permitindo que tratamentos eficazes aos ferimentos de guerra fossem estabelecidos, tornando-se a maior autoridade mundial em matéria de feridas de guerra, resultando em inúmeras publicações científicas, onde avaliou o poder antibacteriano dos leucócitos contidos nos exsudatos de feridas (PEREIRA; PITA, 2005).

Em 1922, no pós Guerra, ele descobre o poder da Lisozima, enzima presente no exsudato de feridas com extraordinário poder lítico sobre algumas bactérias e que veio a ser mencionado no discurso proferido ao recebimento do seu Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, em 1945.

Fleming estudava os estafilococos, bactérias Gram-positivas, adquirindo cor arroxeada, devido à sua membrana simples e parede de peptideoglicano (atividade endotóxica, desencadeador de febre e processo inflamatório) grossa, anaeróbios facultativos, com 1 µm de diâmetro e que se agrupam como cachos de uvas, em parceria com Professor Bigger, resultando na descoberta da Penicilina (MAUROIS, 1959; FLEMING et al., 2007).

Certo dia, uma placa de Petri inoculada com estafilococos apresenta uma contaminação por fungo e constatou-se que até certa distância da colônia fúngica não havia proliferação bacteriana, como visto na Figura 2 (HUGHES, 1974).

Figura 2 - Placa de Petri, recoberta com ágar Sabouraud, inoculada com *Staphylococcus* sp. e *Penicillium notatum*, simulando a contaminação no experimento de Fleming, demonstrando a inibição do crescimento bacteriano onde se difundiu a penicilina no ágar, halo de restrição.



Fonte: Cummings (2017).

Mais tarde, caracterizou-se o fungo e constatou se tratar do *Penicillium notatum*, Figura 3, e que este inibia o crescimento de outras bactérias patogênicas. “Fleming reconhecia o papel do acaso na descoberta científica e, por outro lado, implicitamente sublinhava que a observação genial do investigador marcava a diferença entre descobrir e não descobrir”. (HUGHES, 1974).

Figura 3 - Colônia fúngica característica de *Penicillium notatum* em ágar Sabouraud.



Fonte: Calver (2016).

Apesar da descoberta, a Penicilina passou por uma fase de esquecimento, mesmo tendo aparecido em algumas publicações do Fleming, até passar a ser estudada com mais afinco pelo doutor Chain e Sir Howard Florey, coparticipantes do Prêmio Nobel recebido (ABRAHAM; CHAIN, 1940; FLEMING, 1946; RANDO, 1975; PEREIRA; PITA, 2005).

1.1.2 Antibioticoterapia e sepse

O surgimento dos antibióticos revolucionou a Medicina ao diminuir o número de mortes de pessoas infectadas por microrganismos, sendo os processos infecciosos os responsáveis por grande número de doenças (ABRAHAM; CHAIN, 1940; SKLYARENKO et al., 2015).

Após a descoberta da penicilina, acreditou-se que a humanidade estaria salva de infecções bacterianas, até que em 1940, se descobriu a penicilinase. E começaram-se os estudos referentes à resistência bacteriana (BACTERIAL, 1979).

Na mesma proporção que surgem novos antibióticos no mercado também surgem cepas bacterianas multirresistentes, o que dificulta a introdução de uma antibioticoterapia eficaz, pois o fator resistência está ligado ao material genético da bactéria, o qual não está livre de possíveis mutações gênicas, o que pode torná-la uma superbactéria, com resistência a todos os fármacos disponíveis, sendo este um dos maiores problemas de saúde pública (CITRI; ZYK, 1965; VERKHOVTSEVA et al., 1972).

Um paciente infectado por bactéria pode evoluir a sepse, uma condição em que o organismo começa a danificar seus próprios órgãos e tecidos, em virtude à resposta inflamatória exacerbada própria do corpo, ou seja, passa-se a ter uma resposta inflamatória sistêmica (GAYNES, 2011).

A sepse é a *causa mortis* que mais acomete pacientes infectados por bactérias no mundo, mesmo a Biotecnologia desenvolvendo novas vacinas, soros e fármacos constantemente (GAYNES, 2011).

Um paciente entra em choque séptico quando há um alto índice de infecção, consequentemente, a pressão arterial cai, há desidratação, comprometendo a oxigenação e a distribuição adequada de suplementos aos tecidos do organismo, comprometendo o funcionamento de órgãos como rins, coração, pulmões e cérebro, cruciais à manutenção da vida (GAYNES, 2011).

Para uma antibioticoterapia ser eficaz e adequada pode ser feita uma cultura de material infectado para que se identifique o agente patogênico e eliminá-lo sem correr o risco de induzir o desenvolvimento de cepas resistentes (GOLEMI-KOTRA et al., 2004; KNECHT et al., 2014).

No tratamento com antibióticos utiliza-se, *a priori*, um antibiótico de amplo espectro e depois se adequa com antibiótico específico para a bactéria identificada na cultura celular, na intenção de que o microrganismo não se torne resistente aos fármacos de maior potência disponíveis no momento (FLEMING, 1946; BEARD et al., 1992; KNOX et al., 1996).

1.1.3 Resistência bacteriana e inibidores de β -lactamases

A resistência evoluiu com naturalidade como em qualquer outro ser vivo. O antibiótico torna-se ineficaz no tratamento de doenças pelo simples fato da bactéria ser insistentemente exposta a estes fármacos (VU; NIKAIDO, 1985; LEWIS et al., 1997; FISHER; MOBASHERY, 2009).

A resistência pode ser intrínseca, sendo característica de toda uma espécie, ou adquirida, caracterizando-se pelas mutações ocorridas ou pela inclusão de material genético exógeno, proveniente de plasmídeos, sendo um fator de extrema preocupação, devido à possibilidade de transmissão do DNA (ácido desoxirribonucleico) a toda uma cepa bacteriana (LEWIS et al., 1997).

Há mecanismos de resistência que mudam a conformação do sítio alvo da bactéria, fazendo com que o antibiótico não consiga acessá-lo (LAMOTTE-BRASSEUR et al., 1994).

Tem-se também, alterações de permeabilidade da membrana externa da bactéria, fazendo com que substâncias hidrofílicas sejam impossibilitadas de entrar na bactéria, muito comum em bactérias Gram negativo, ou seja, a membrana “composta por uma dupla camada assimétrica de fosfolipídios, polissacáridos e proteínas é uma excelente barreira, e é a primeira linha de defesa à entrada de agentes antimicrobianos. As porinas são proteínas que permitem a passagem de agentes hidrofílicos, tais como os antibióticos β -lactâmicos, e a perda de porinas funcionais poderão levar à resistência” (BEARD et al., 1992).

Existe o mecanismo de bombas de efluxo, os quais são proteínas transmembranares com função de expelir para fora da bactéria substâncias tóxicas a ela, também, a inativação do antibiótico pela produção de proteínas (enzimas) que o degradam por hidrólise, como no caso da penicilinase, alvo de estudo deste trabalho, degradando o anel β -lactâmico da penicilina e de outros da sua classe de fármacos como os antimicrobianos (VU; NIKAIDO, 1985; KNOX et al., 1996; DAVIES; DAVIES, 2010).

Os inibidores da β -lactamases como o ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam são utilizados para ampliar o espectro das penicilinas, antimicrobiano com ação na síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana, na ação de destruição dos microrganismos produtores de β -lactamase (BAPTISTA, 2013).

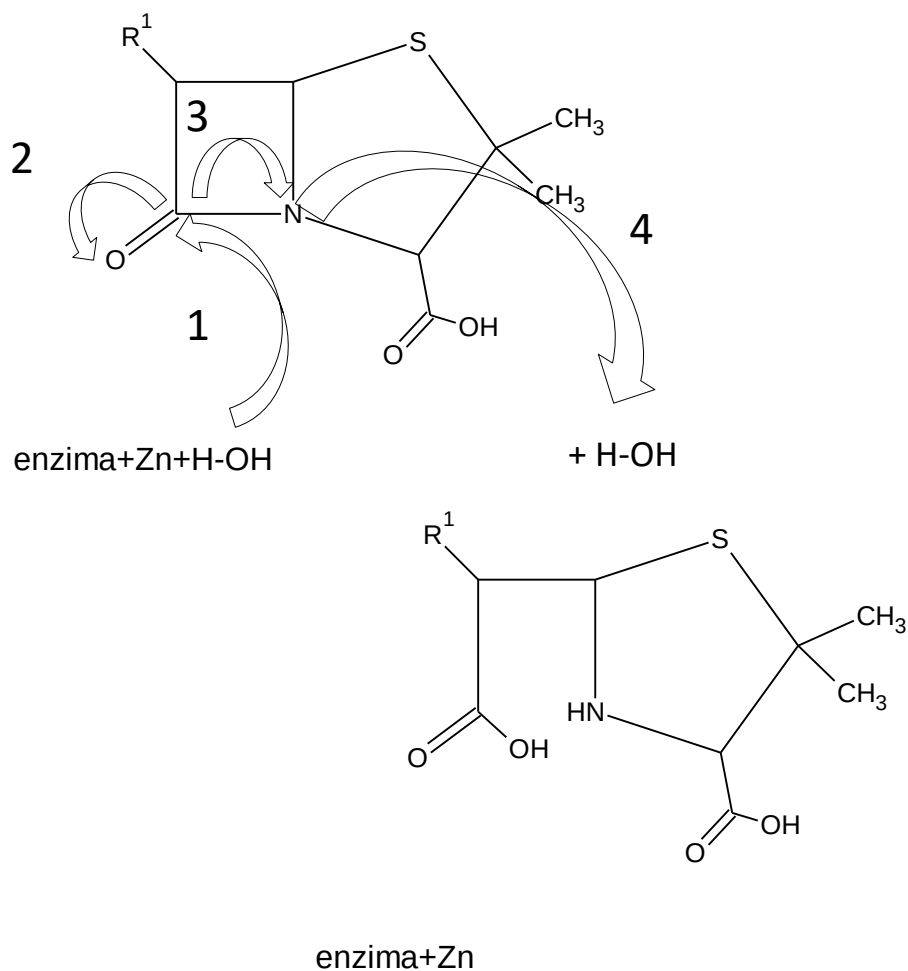
Os inibidores possuem uma estrutura idêntica à penicilina, modificando apenas a cadeia lateral. Desta forma as β -lactamases atuam nos inibidores, deixando disponível o antibiótico para atuar na infecção. Dois exemplos comuns são a combinação da amoxicilina com o ácido clavulânico, utilizado no combate a infecções do trato respiratório e a piperacilina com tazobactam administrada em infecções do trato respiratório inferior e vias urinárias. A piperacilina com tazobactam são administrados em pacientes imunocomprometidos, sempre em associação com os aminoglicosídeos, para a profilaxia de infecções por estirpes de *Pseudomona aeruginosa* (BAPTISTA, 2013).

1.1.4 Penicilinase de *Bacillus cereus*

A penicilinase é uma subclasse das β -lactamases, pois atua principalmente na penicilina. β -lactamases são uma das maiores preocupações médico-farmacêuticas nos dias atuais, sendo uma das grandes responsáveis pela resistência bacteriana aos antibióticos. O uso indiscriminado de antibiótico é responsável pela seleção de cepas bacterianas resistentes, ou seja, produtoras da enzima (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

As cefamicinas, carbapenêmicos e penicilina são antibióticos que apresentam em sua estrutura o anel β -lactâmico e são sensíveis às β -lactamases, sendo que apenas as cefalosporinas apresentam resistência relativa. A hidrólise do anel β -lactâmico, como visto na Figura 4, leva à inativação do antibiótico, sendo que o ataque ocorre na ligação amida e é dependente de 1 ou 2 íons de zinco, os quais coordenam moléculas de água para servirem de nucleófilos. O mecanismo de hidrólise é complexo e como não está completamente esclarecido serviu de incentivo para este trabalho (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

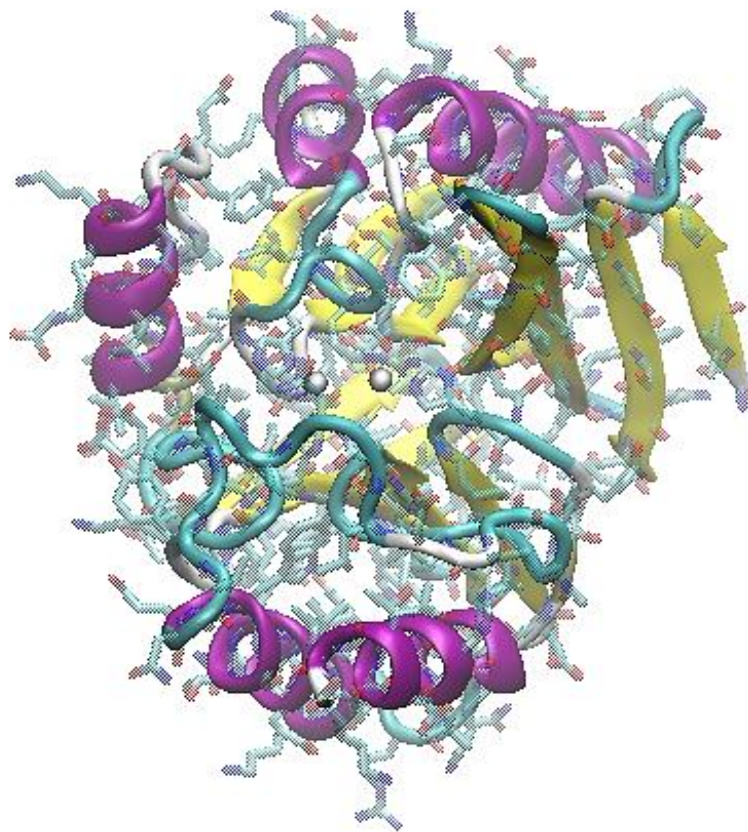
Figura 4 - Mecanismo de ação da penicilinase, abertura do anel β -lactâmico na presença de água. O anel beta lactâmico é colapsado (1 e 2), a ligação amida é quebrada, o nitrogênio é reduzido a N^- (3) e retira-se o hidrogênio da água (4).



Fonte: Adaptado de Bertoncheli e Hörner (2008) e Prado (2012).

A penicilinase de *Bacillus cereus*, utilizada neste trabalho de doutoramento, é uma metalo- β -lactamase (M β L), Figura 5, que possui um ou dois íons de zinco no sítio ativo, uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de aproximadamente 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (para enzima imobilizada e analisada por espectrofotometria modificada (KLEMES; CITRI, 1979) e um peso molecular de 28 kDa (PLACZEK, 2017).

Figura 5 - Estrutura da metalo- β -lactamase (2M5C.pdb) de *Bacillus cereus*, em tampão fosfato (PBS), pH 7, com dois íons zinco em seu sítio ativo.



Fonte: adaptado de Karsisiotis et al. (2013).

1.2 Métodos eletroquímicos

Luigi Galvani, um médico, físico, pesquisador e filósofo italiano foi professor de anatomia na Universidade de Bolonha, no séc. XVIII. Foi o primeiro estudioso da bioeletricidade e eletroquímica, baseado nos padrões elétricos do sistema nervoso, um enigma para a pesquisa científica até os dias de hoje (CAFIERO, 1959).

Sua pesquisa não conseguiu desvincular a biologia da física, mas serviu de incentivo para outros, como Alessandro Volta, que usou os achados científicos de

Galvani para construir a primeira bateria elétrica, ou pilha voltáica (BERETTA ; GRANDIN, 2001).

A Eletroquímica é uma área da físico-química que estuda as reações que envolvem transferência de elétrons e seus fenômenos associados por meio de um dispositivo chamado célula eletroquímica pelo qual ocorrem reações de oxirredução para produzir interconversão de energia química em elétrica. É uma ferramenta poderosa para desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais acurados (BERETTA; GRANDIN, 2001; PARENT, 2004).

A Eletroquímica serviu para estudar a transferência de cargas envolvidas na reação da penicilinase, uma hidrolase, que apresentou caráter redox, servindo de incentivo para este trabalho de doutorado, para saber de onde ocorre a transferência de elétrons envolvidos na reação catalítica da enzima com seu substrato.

1.3 Simulação molecular

A modelagem molecular é uma técnica computacional, interdisciplinar, devido o foco da abordagem a ser pesquisada, que mimetiza o comportamento de moléculas. Segundo definição da IUPAC, a modelagem molecular “é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias”, auxiliando na compreensão de processos químicos, físicos e biológicos. Uma ferramenta atuante na construção da nanotecnologia, pois propicia o desenvolvimento de máquinas completas a nível atômico-molecular (CARVALHO et al., 2003).

Buscou-se um modelo baseado nas leis da mecânica clássica (conhecido por Mecânica Molecular (MM) ou campos de força), no intuito de observar quão estável é a interação que ocorre entre a enzima e seu cofator metálico. Para isto, foram criados modelos simplificados, que fornecem uma descrição razoável do sistema, pois não há quebra/formação de ligações químicas, sendo adequado ao processo de interação da enzima com o cofator, permitindo a compreensão e predição de uma variedade de fenômenos, por exemplo, localização espacial do cofator na enzima, a

estabilidade desta interação, se de alguma forma há modificação na estrutura da enzima e como ocorre a reação com o substrato no sítio ativo (JONES et al., 1997).

Entretanto, a mecânica molecular (MM), é dependente de parâmetros, escolha de campo de força adequado, porém pode ser realizada para modelos moleculares maiores, pois trabalha com reducionismo, assumindo os átomos, como pontos carregados, necessitando de parametrização das interações e forças envolvidas entre os pontos, ou seja, campos de força. Para se ter conhecimento da estrutura eletrônica se faz necessário o uso da mecânica quântica (QM) (JONES et al., 1997; SERWAY; JEWETT, 2007).

A QM, como a MM, é um ramo de física, porém que assume os átomos como prótons e elétrons interagentes, assumindo a energia envolvida como ondas eletromagnéticas distribuídas em pacotes, remetendo a necessidade de descrição eletrônica do sistema, em fenômenos ocorridos na ordem de femtosegundos (10^{-15} segundos) (SERWAY; JEWETT, 2007).

A modelagem molecular traz à luz do conhecimento propriedades microscópicas do sistema estudado, o que experimentalmente não é possível. Sendo uma excelente ferramenta na rotina de grupos de pesquisa atuantes no desenvolvimento e inovação tecnológica, i.e. na pesquisa de novos fármacos, desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais acurados, entre outros (COVENEY; FOWLER, 2005).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o entendimento dos processos enzimáticos sob a influência do meio e de um potencial aplicado, ou seja, reações enzimáticas assistidas por densidade eletrônica de um eletrodo.

A impedância eletroquímica (EIE) e a voltametria cíclica (VC) foram as técnicas eletroquímicas usadas para estudar a influência das variáveis (cofator, potencial aplicado, entre outras) no sinal obtido e entendimento do mecanismo de reação.

A enzima estudada, necessariamente, precisava apresentar caráter redox. Entretanto, optou-se por uma hidrolase, a penicilinase, a qual apresentou características oxirredutivas.

Os mecanismos de operação e detecção foram estudados a nível atômico/molecular por modelagem computacional, ou seja, mecânica quântica (QM) e mecânica molecular (MM) para esclarecer os resultados obtidos experimentalmente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parte experimental

Tabela 1 - Reagentes utilizados, fornecedores e sua aplicação neste trabalho.

Produto	Procedência	Finalidade
Aluminas (diâmetros de 1; 0,3; 0,05 μm)	Buehler	Polimento mecânico dos eletrodos de ouro da METROHM
Etanol ultrapuro	Sigma	Limpeza do eletrodo
Ácido Sulfúrico concentrado (95-98%)	Quemis	Solução aquosa 0,5 M para limpeza eletroquímica dos eletrodos
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sigma	Ativação da superfície carboxílica da SAM (obtenção de éster) para ancoragem da espécie receptora
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)	Fluka	
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma	Solução aquosa 0,5 M para dessorção eletroquímica para limpeza do eletrodo de ouro
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma	Tampão fostato salino (PBS), 0,1 M, pH 7,4
Nitrato de sódio (NaNO_3)	Sigma	
Cloreto de potássio (KCl)	J. T. Baker	Tornar o eletrodo sensível à penicilina G
Monohidrogenofosfato de sódio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Sigma	
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	Sigma	
Penicillinase de <i>Bacillus cereus</i>	Sigma	
Penicilina G	Sigma	Substrato para reação com a penicilinase

Cloreto de zinco (ZnCl ₂)	Sigma	Cofator enzimático
Cloreto de cobalto (CoCl ₂)	Sigma	
L-cisteína	Sigma	Formação da SAM
Ferricianeto de potássio	Sigma	Solução de ferri/ferro
Ferrocianeto de potássio tri-hidratado	Sigma	
Nitrato de potássio (KNO ₃)	Sigma	

Todos solutos apresentados na Tabela 1 apresentam grau analítico.

As soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura obtida com resistividade não menor que 18 MΩ cm⁻² a 25°C utilizando um sistema Milli-Q® Millipore Simplicity.

O tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, utilizado possui a composição a seguir: NaCl, 137 mmol L⁻¹, KCl, 2,7 mmol L⁻¹; Na₂HPO₄.12H₂O, 10 mmol L⁻¹; KH₂PO₄, 2 mmol L⁻¹. O mesmo foi conservado em geladeira.

A penicilinase classe B de *Bacillus cereus* utilizada, também fornecida pela Sigma-Aldrich®, é composta de uma mistura de β-lactamase I e β-lactamase II.

As medidas de pH foram realizadas utilizando o peagâmetro da ION modelo pHB500, que era calibrado imediatamente antes do uso.

As medidas eletroquímicas foram conduzidas no potenciostato da AUTOLAB (PGSTAT302N), controlado pelo *software* NOVA. O sistema de medidas se baseou na configuração de três eletrodos, sendo o eletrodo de ouro (2,0 mm de diâmetro e área de 0,03142 cm²) obtido da METROHM, uma placa de platina como contra-eletrodo e eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) como eletrodo de referência. Todos os potenciais descritos neste texto são relativos ao eletrodo Ag/AgCl (KCl saturado).

A penicilinase comprada da empresa Sigma-Aldrich, vem do fabricante sem cofator na sua estrutura, fazendo com que o mesmo fosse colocado por dopagem do

eletrodo com solução contendo certa concentração de cofator, o que gerou a problemática para certificação de que o cofator iria se acoplar/alocar na região correta para ativação da apoenzima e qual concentração seria apropriada para garantir a saturação da enzima, o que trouxe a necessidade de cálculos de modelagem computacional para investigação da estrutura e comportamento da enzima frente ao cofator. (CARVALHO et al., 2003).

3.1.1 Análises Eletroquímicas

Utilizou-se solução de tampão fosfato salino, a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 como eletrólito suporte da reação, para garantir a não denaturação da proteína adsorvida na superfície do eletrodo e reproduzir as condições de um meio biológico.

Como dito pelo próprio nome, as monocamadas automontadas (SAMs) consistem numa única camada molecular que se adsorve espontaneamente sobre uma superfície metálica, no caso o eletrodo de ouro, e torna-o susceptível a uma variedade de aplicações, inclusive a de estudo do mecanismo de reação enzimática quando se tem uma enzima redox acoplada/imobilizada a SAM (GONÇALVES et al., 2014).

Uma técnica eletroquímica importante utilizada na caracterização das SAMs é a voltametria cíclica (VC), pois se obtêm, rapidamente, informações qualitativas sobre as reações que estão a ocorrer no eletrodo funcionalizado. Muito utilizada para caracterização dos sistemas eletroquímicos, a VC consiste em observar a corrente que flui pelo eletrodo de interesse enquanto se aplica um potencial, variado linearmente em relação ao eletrodo de referência, sendo que o gráfico obtido é dependente da concentração de eletrólito na solução e da velocidade de varredura (SPATARU et al., 1996).

Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foram realizadas para observar as variações na catálise enzimática sob influência de potencial aplicado, e relacionar a uma possível eletrocatalise.

Todas as medidas apresentadas neste trabalho são médias de, no mínimo, triplicatas.

3.1.1.1 Voltametria cíclica (VC)

A VC é uma técnica eletroquímica importante utilizada na caracterização da superfície funcionalizada, pois se obtêm, rapidamente, informações sobre os processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (WANG et al., 2000).

A técnica consiste em observar a corrente que flui pelo eletrodo de interesse enquanto se aplica um potencial, variado linearmente em relação ao eletrodo de referência, sendo que o gráfico obtido é dependente da concentração de eletrólito na solução e da velocidade de varredura (VAN BENSCHOTEN et al., 1983; SPATARU et al., 1996).

Duas componentes são fundamentais para determinar as reações que estão acontecendo no eletrodo, a difusão de massa do analito em solução para superfície do eletrodo e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, podendo haver reações químicas acopladas a um destes processos, podendo ser resumido a equação de Nernst, quando a reação é reversível, apenas a transferência de massa ditará a corrente do pico, em amperes, conforme Equação 1:

$$i_{pc} = (2,69 \cdot 10^5) n^{\frac{2}{3}} A D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_0 \quad (\text{Eq.1})$$

onde, n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) (PACHECO et al., 2013).

3.1.1.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A EIE é uma técnica muito difundida no meio de pesquisa para estudos fundamentais e também para o desenvolvimento de novas técnicas para diagnóstico clínico baseado em análises por transferência de elétrons entre eletrodo e o meio (amostra clínica, por exemplo) (CARVALHO et al., 2006).

A EIE baseia-se na razão entre um potencial alternado (de pequena dimensão – apenas perturbativo) aplicado e a medida da corrente de resposta a este potencial. As medidas são realizadas em uma faixa de frequências (método espectroscópico), de forma que diferentes processos físicos e químicos possam ser separados por suas constantes de tempo ou pelo seu tempo próprio de resposta permitindo obter parâmetros como a resistência da solução (R_s), a resistência transferência de elétrons do eletrodo para a solução (R_{ct}) e a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), por exemplo. A impedância obtida é uma função complexa definida a partir das suas componentes real, Z' , e imaginária, $-Z''$ (LASIA, 1995; CARVALHO et al., 2006).

De forma geral, a EIE é usada para se obter informações sobre as propriedades da reatividade de interfaces (proteínas/substrato) como é o caso de proteínas adsorvidas na superfície de eletrodos. A EIE utiliza sinais muito pequenos de perturbação que não comprometem as propriedades da superfície funcionalizada pela metaloenzima (ensaio não destrutivo), tornando possível estudar as reações de oxirredução de forma consistente e em função de mudanças periódicas do campo externo (LASIA, 1995; CARVALHO et al., 2006; FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2015).

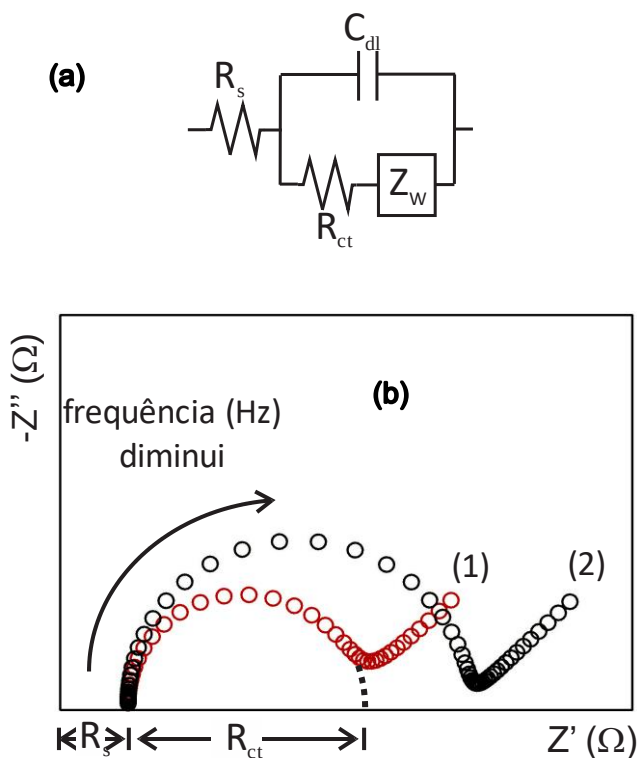
Define-se a Impedância Eletroquímica (Z), como a razão obtida entre o potencial alternado aplicado ($E(t)$) e a corrente obtida em função desta perturbação ($i(t)$), Equação 2.

$$Z = \frac{E(t)}{i(t)} \quad (\text{Eq. 2})$$

À medida que se varia a frequência (f) em que se aplica o $E(t)$, são revelados os mecanismos eletroquímicos (pois se revela a escala de tempo de diferentes processos) que podem ser modelados por elementos de circuito (como resistores e capacitores). Os resultados obtidos podem ser plotados em gráficos do tipo Nyquist, os quais relacionam cartesianamente a componente da impedância real (Z') com a componente da impedância imaginária ($-Z''$) (BARD et al., 1980; BUENO et al., 2013)

É comum utilizar um circuito elétrico equivalente, com elementos de circuito para se modelar a resposta dos espectros de impedância construídos a partir das variáveis complexas Z' e $-Z''$. A representação mais comum do espectro é o de Nyquist e o circuito equivalente normalmente mais utilizado em eletroquímica é chamado de circuito de Randles, onde para sistemas mais simples (interface metal-eletrólito) o elemento com “característica” redox fica livre em solução e em contato direto com a superfície metálica com a qual troca elétrons. Este circuito é composto de elementos como R_s (resistência da solução eletrolítica), R_{ct} (resistência à transferência de cargas, indicando reação de oxirredução), C_{dl} (capacitância da dupla camada) e Z_w (impedância de Warburg) para descrever as características físicas da interface eletroquímica. O modelo de circuito de Randles é mostrado na Figura 6 (a). O sistema de interface eletroquímica com monocamada dielétrica (SAM) é um sistema mais complexo, e as propriedades dielétricas da SAM são importantes uma vez que impedem o contato direto do par redox em solução com o eletrodo metálico. Além disso, no caso específico deste trabalho tem-se a enzima e o seu cofator adsorvidos na superfície do eletrodo, ambos suportados em uma SAM que bloqueia o contato direto (existindo então uma transferência de elétrons não-adiabática) (CARVALHO et al., 2006; BUENO et al., 2013).

Figura 6 - Circuito elétrico equivalente, do tipo Randles (a), com diagrama de Nyquist (b). Onde R_s é resistência de solução, C_{dl} é capacitância da dupla camada elétrica, R_{ct} é resistência a transferência de cargas, Z_w é Impedância de Warburg, $-Z''$ é impedância imaginária e Z' é a impedância real. O diagrama (1) apresenta menor R_{ct} que o (2).



Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2006).

A adição de elementos ao circuito elétrico equivalente tem que ser criteriosa para que os resultados sejam compatíveis com os fenômenos físicos e químicos que acontecem na interface eletrodo/solução.

3.1.2 Protocolo de limpeza da superfície de ouro

O eletrodo de trabalho foi composto de ouro (Au) e antes de ser funcionalizado necessita de um pré-tratamento, sendo que o protocolo utilizado no

grupo Nanobionics, consistiu no polimento mecânico com pasta de alumina de diferentes granulometrias (1 μm , 0,3 μm e 0,05 μm , respectivamente nesta ordem). No intervalo de cada polimento, o eletrodo era exaustivamente lavado com água e sonificado em água ultrapura por 5 min para retirar partículas adsorvidas.

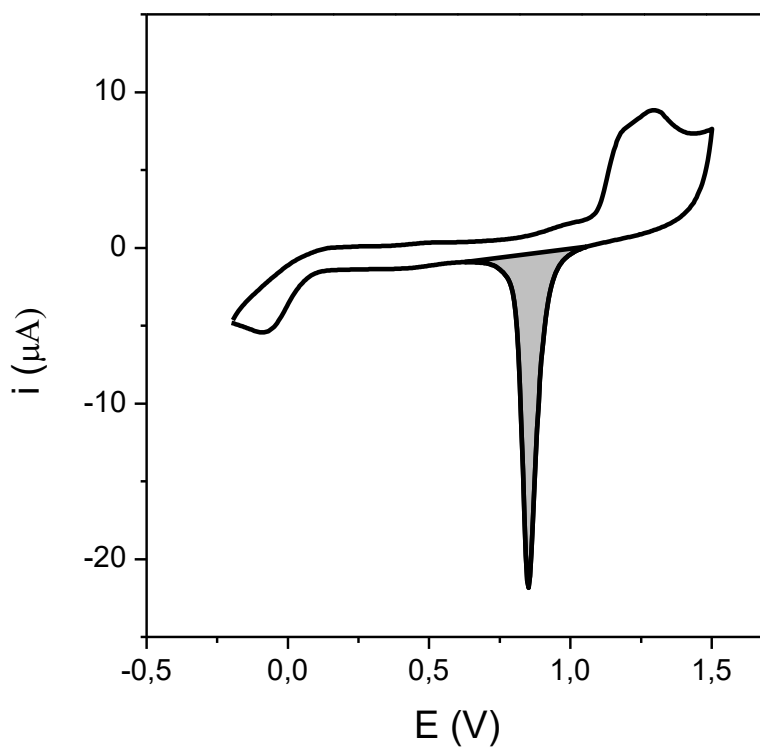
Em seguida, fez-se uma dessorção eletroquímica com 1 mmol L⁻¹ de NaOH (preparado em água ultra pura MilliQ®), por voltametria cíclica (VC), -0,7 V a -1,7 V *versus* Ag/AgCl KCl saturado, com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹, 100 ciclos.

Posteriormente, o eletrodo foi sonificado em etanol ultrapuro por 15 min e tratado eletroquimicamente, também chamada de limpeza eletroquímica. Este tratamento consiste em realizar VC em solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,1 mol L⁻¹, com varredura de -0,2 V a 1,5 V *versus* Ag/AgCl KCl saturado, 25 ciclos a uma velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹, Figura 10.

Neste trabalho, definiu-se um intervalo de fator de rugosidade (F_r) entre 1 e 1,3 para que a área ativa (A_{ativa}) do eletrodo esteja o mais próximo da área geométrica, ou seja, quanto mais próximo de 1, o fator de rugosidade, mais lisa a superfície.

Para obter o valor do F_r , integra-se o pico da corrente catódica, obtido na VC, destacado na Figura 7, para obtenção da área ativa do eletrodo, sendo de conhecimento que esta área é proporcional a quantidade total de carga, pode-se dividi-la pela constante de 400 $\mu\text{C cm}^{-2}$, resultando na área ativa de 0,0395 cm². A relação área ativa pela área geométrica nos remete ao fator de rugosidade, que no caso foi de 1,25 (SPATARU et al., 1996; TKAC; DAVIS, 2008).

Figura 7 - Voltamograma cíclico obtido da limpeza eletroquímica.



3.1.3 Funcionalização do eletrodo

A superfície do eletrodo de ouro começa a ser funcionalizada com a adsorção da L-cisteína (10 mmol L^{-1}), aplicando-se uma solução do aminoácido em PBS, pH 7,4, sobre a superfície por 12 h formando uma SAM (monocamada automontada).

Após lavagem em PBS e em seguida em água ultra pura, foi seco e mergulhado numa solução aquosa de EDC (10 mmol L^{-1}) e NHS (20 mmol L^{-1}), por 2 h, utilizada para ativar o grupamento carboxílico da L-cisteína.

O eletrodo foi lavado com água ultra pura e imerso em solução contendo a enzima que o funcionalizará em concentração de $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, em PBS, por 2 h.

No caso da penicilinase, após as 2 h, retira-se o eletrodo, que foi lavado como no passo anterior e na sequência imerso em uma solução que contém o cofator para ativação da enzima.

Cada processo de acoplamento foi avaliado por voltametria cíclica com o seu respectivo analito para garantir que a reação não ocorresse de outra forma que não fosse pela atividade enzimática.

3.2 Parte teórica

Com a finalidade de esclarecer o comportamento mecanístico da enzima penicilinase e confrontar com dados obtidos experimentalmente, optou-se pelo uso de ferramentas de bioinformática amparadas pelos resultados eletroquímicos obtidos neste estudo. A modelagem subdivide-se em modelagem clássica e modelagem quântica.

3.2.1 Modelagem clássica

3.2.1.1 Mecânica Molecular (MM) ou Campos de Força

Modelos simplificados podem fornecer uma descrição razoável do sistema e permitem obter muitas informações de interesse. Modelos baseados nas leis da mecânica clássica (conhecidos por Mecânica Molecular ou Campos de Força) permitem simulações de sistemas compostos por alguns milhares de átomos eficientemente, e são particularmente adequados em processos onde não há quebra/formação de ligações químicas ou excitações eletrônicas, ou seja, não requerem descrição quântica do sistema. Por estas razões, estes têm sido o método de escolha na comunidade científica para estudar diversos sistemas biomoleculares (SMITH et al., 2012).

A descrição dos campos de força ignora a dinâmica eletrônica e calcula a energia do sistema apenas como uma função das coordenadas nucleares. Portanto, a aplicabilidade dos campos de força tem base em algumas suposições. A principal é a validade da aproximação de Born-Oppenheimer, que permite definir a energia potencial do sistema em função das coordenadas nucleares (a superfície de energia potencial). Geralmente, a forma da função energia potencial, em função das posições dos N átomos no sistema, é dada pela Equação 3:

$$U = \sum_{lig} k_{lig} (r - r_0)^2 + \sum_{ang} k_{ang} (\theta - \theta_0)^2 - \sum_{torções} V_n [1 + \cos(n\tau - \varphi)] + \sum_i \sum_j \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

caracterizada pelos seguintes termos, respectivamente:

1) Estiramento e deformação angular de ligação: A energia potencial é representada pela lei de Hooke, como uma expansão da verdadeira energia potencial em torno de uma posição de equilíbrio da mesma, onde a primeira contribuição é quadrática. Na equação acima, r_0 é a distância de equilíbrio da particular ligação considerada e k_{lig} representa a constante de força do oscilador, assim como a contribuição de cada ângulo é caracterizada por um valor de referência θ_0 e uma constante de força k_{ang} . As constantes de força são derivadas principalmente de dados espectroscópicos e de cálculos *ab-initio* em sistemas-modelo. Como foi dito, o verdadeiro potencial não é harmônico (somente para pequenos deslocamentos em torno da posição de equilíbrio) e, portanto, não permite a modelagem de processos envolvendo rearranjo de ligações químicas, como já mencionado (HU et al., 2013; PRATT et al., 2015).

2) Torção de ligações: O terceiro termo corresponde à energia de torção dos ângulos diedrais (definidos por ligações entre 4 átomos), onde V_n é usualmente a altura da barreira de rotação, da mesma maneira que se faz em estudos de análise conformacional de alcanos. Contudo, há outros termos que contribuem para a barreira, como será visto a seguir. n é a multiplicidade e seu valor dá o número de

pontos de mínimo de energia em função do ângulo diedro, variado entre 0 e 360° e φ é a fase angular (HU et al., 2013; PRATT et al., 2015).

3) Interações de VDW e eletrostática: Moléculas e átomos independentes interagem através de forças não-ligadas, as quais não dependem de nenhuma relação específica entre átomos. Estas constituem interações dependentes da posição, inversamente proporcionais a certa potência da distância. Usualmente são divididos em dois grandes grupos: interações eletrostática e de van der Waals (VDW). A interação eletrostática é modelada da seguinte maneira: a cada um dos átomos é atribuída uma carga, normalmente retirada de ajustes, por análise populacional em cálculos *ab-initio*, de modo a reproduzir o potencial eletrostático do cálculo com o mínimo de erro, e utiliza-se a lei de Coulomb para o cálculo da energia eletrostática do sistema de cargas pontuais. É claro que a eletrostática não leva em conta todas as interações não-ligadas. Sabe-se que num simples sistema composto por um par de dipolos oscilantes, a teoria de perturbação de segunda ordem resulta numa energia de interação inversamente proporcional à sexta potência da distância, que é a interação de van der Waals. Tal interação é modelada via a função 6-12 de Lennard-Jones (um potencial atrativo na sexta potência do inverso da distância e repulsivo a 12ª potência, que é a repulsão a curta distância entre os átomos). Os parâmetros ajustáveis são tabelados para cada átomo, a saber, a distância entre os átomos i e j no qual a energia de VDW é mínima, R_{ij}^* , e a energia mínima ε_{ij} , e são usados nos coeficientes do termo de VDW: $R_{ij}^* = (R_i^* + R_j^*)$ e $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$, e $A_{ij} = \varepsilon_{ij}(R_{ij}^*)^{12}$ e $B_{ij} = 2\varepsilon_{ij}(R_{ij}^*)^6$. Os potenciais de Lennard-Jones permitem, portanto, a descrição de interações repulsivas de curto alcance e atrativas dispersivas de longo alcance (HU et al., 2013; PRATT et al., 2015).

Os parâmetros obtidos a partir dos modelos, possibilitaram a criação de vários campos de força que permitem a descrição de diversos fenômenos. Neste trabalho, utilizou-se do AMBER99SB, conjunto de parâmetros utilizados para proteínas, para compreensão dos fenômenos estudados (SMITH et al., 2015; SOMAVARAPU; KEPP, 2015).

Simplificações ainda são possíveis para diminuir o custo de cálculo. Sendo que o maior esforço está no cálculo da energia de interação entre átomos não-

ligados, visto que estes escalam em N^2 , quando comparados a termos ligados, que escalam linearmente com o número N de átomos do sistema. Ou seja, é possível que se calcule a interação num raio de corte entre átomos, apenas se recomenda que o raio não seja menor que $10\text{\AA}$. Mas, ainda assim, é necessário calcular a distância entre todos pares de átomos para saber se estão ou não na região de corte, o que custa tanto quanto calcular a energia. Para esse fim é criada uma lista de vizinhos, que armazena, para cada átomo, todos os átomos vizinhos dentro da distância de corte e os átomos ligeiramente fora da região. Os vizinhos são então fixados e atualizados a intervalos regulares durante a simulação, tipicamente, a cada 20 femtosegundos (HU et al., 2013; PRATT et al., 2015).

3.2.1.2 Dinâmica Molecular

Uma das técnicas mais usadas na simulação e compreensão de sistemas complexos moleculares e suas propriedades é a chamada dinâmica molecular. A dinâmica molecular calcula a dinâmica real do sistema, ou seja, calcula a evolução de determinado sistema no tempo, através de equações que traduzam leis de movimento, permitindo o cálculo de médias temporais, sobre a trajetória gerada, de propriedades físicas do sistema. No caso utiliza-se a segunda lei de Newton dada pelo conjunto de equações diferenciais, Equação 4:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = -\nabla U[\vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_n(t)] \quad \text{para } i=0,1,2, \dots, N \quad (\text{Eq. 4})$$

Pode-se notar que o potencial (seja ele clássico ou quântico) é função da posição de todas as partículas e as equações diferenciais são acopladas. Trata-se de um problema de muitos corpos extremamente difícil de resolver analiticamente. Na prática, a equação é resolvida pelo método do elemento finito, ou seja, o tempo é discretizado em intervalos Δt finitos (consequentemente a trajetória também é discreta) e a equação é integrada numericamente. Dada uma posição inicial qualquer e as velocidades iniciais, calcula-se as forças que agem nos mesmos (e

portanto a aceleração) e calcula-se a próxima posição, como uma aproximação em série de Taylor, Equação 5:

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \dots \quad (\text{Eq. 5})$$

onde pode-se truncar a expansão até a ordem desejada. Combinando-se estas equações, pode-se ainda eliminar a dependência de certas variáveis e até mesmo diminuir a ordem do erro cometido no truncamento da expansão. O algoritmo integrador de Verlet (VERLET, 1967; 1968) é um dos mais usados para este fim e consiste na obtenção das posições e novas acelerações sem uma dependência direta da velocidade, através da soma das duas expansões, Equações 6 e 7:

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{b}(t) + O(\delta t^4) \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\vec{r}(t - \delta t) = \vec{r}(t) - \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) - \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{b}(t) + O(\delta t^4) \quad (\text{Eq. 7})$$

resultando na Equação 8:

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \vec{a}(t) + O(\delta t^4) \quad (\text{Eq. 8})$$

Existem outros algoritmos integradores como o algoritmo *leap-frog* (Verlet modificado, onde usa-se a metade do passo no tempo) ou até mesmo outros mais precisos, com esquemas de extrapolação, como os algoritmos Preditores-Corretores (VERLET, 1967; 1968). O passo de integração é algo a ser também discutido neste ponto. Usualmente, utiliza-se o que seria 1/10 do período de movimento mais curto de certo átomo, como a frequência de estiramento das ligações químicas (especialmente as que envolvem átomos de hidrogênio, que oscilam com período de 10 fs). Como as vezes essa é uma restrição muito severa (muitas vezes é necessária uma dinâmica mais longa), há outras estratégias, como o uso de

vínculos nestas ligações (há vários algoritmos para esse fim) ou usar átomos de deutério no lugar de hidrogênio.

Muitas vezes deseja-se realizar as simulações levando em conta a contribuição do ambiente, onde o sistema se encontra à pressão ou temperatura constante, como no estudo de reações químicas, transição de fase, etc. A temperatura está diretamente relacionada com a energia cinética média do sistema. Certos algoritmos, chamados de termostatos, podem, portanto, simular o sistema a uma certa temperatura constante, re-escalando a velocidade das partículas, como o caso do termostato de Berendsen (SCHROËN et al., 2002). Neste, as velocidades são diretamente modificadas a cada passo, de tal maneira que, Equação 9:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} [T_{ext} - T(t)] \quad (\text{Eq. 9})$$

τ é o parâmetro que determina o acoplamento entre o sistema e o banho térmico. O fator de escalonamento das velocidades é dado pela Equação 10:

$$\lambda = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left[\frac{T_{ext}}{T(t)} - 1 \right] \quad (\text{Eq. 10})$$

Embora seja simples de se implementar, garanta a conservação do momento total e a execução não seja muito dispendiosa, há o problema de que este não gera uma distribuição verdadeiramente canônica, ou mesmo às vezes, ergódica. Existem outros algoritmos que levam em conta o reservatório térmico, explicitamente, na equação de movimento, como um grau de liberdade adicional que evolui no tempo, como o algoritmo de Nosé-Hoover (NOSÉ, 1984; EVANS ; HOLIAN, 1985; BUSSI et al., 2009), onde as equações de movimento agora se escrevem, conforme Equações 11, 12 e 13:

$$\frac{dr(t)}{dt} = v(t) \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\frac{dv(t)}{dt} = \frac{f(t)}{m} - \chi(t)v(t) \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\frac{d\chi(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T^2} \left(\frac{T}{T_{ext}} - 1 \right) \quad (\text{Eq. 13})$$

onde τ_T é uma constante de tempo com o mesmo papel da constante no algoritmo de Berendsen, porém o parâmetro de fricção agora obedece a uma equação diferencial de primeira ordem no tempo, e pode-se mostrar que este algoritmo gera uma distribuição genuinamente canônica em tempos suficientemente longos.

3.2.2 Modelagem quântica

3.2.2.1 Mecânica Quântica (QM)

A Mecânica Quântica estuda eventos que ocorrem a nível atômico e sub atômicos, ou seja, consiste em perscrutar um sistema em que há transferência de energia e/ou elétrons entre compostos. Neste trabalho, serviu para entendimento mecanístico da reação específica da enzima com substrato (TAYLOR, 1976).

A Física Quântica teve seu início com os estudos de Max Planck, no fim do século XIX, o qual teorizou que cada átomo só poderia trocar pacotes discretos de energia (PLANCK, 1959).

Planck teve sua teoria seguida por outros cientistas, como Albert Einstein, que foi o primeiro a utilizar o termo *quantum* para a constante de Planck, visto na equação de Bohr, Equação 14 (LANCZOS, 1974; KARLSSON, 2001),

$$E = h\nu \quad (\text{Eq. 14})$$

onde E é a energia do fóton, h é a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s) e ν é a frequência de radiação, em um estudo, de 1905, onde desenvolveu o conceito de fóton. O termo relaciona-se com quantização de energia, isto é, o elétron passa de

um nível a outro, mas sem passar por intermediários, ou seja, realiza saltos energéticos (MILLER, 1981).

Em 1926, Werner Heisenberg, um físico alemão, criou a teoria do “Princípio da Incerteza”, a qual dizia que não se pode determinar simultaneamente, com absoluta exatidão, a velocidade e a posição de um elétron num átomo. Surgindo então o conceito de orbital, regiões ao redor do núcleo do átomo, nas quais a probabilidade de se encontrar um elétron é máxima. Assim, em 1927, o físico teórico austríaco Erwin Schrödinger, descreveu o movimento do elétron ao redor do núcleo atômico por intermédio de equações matemáticas que relacionam a natureza dual da partícula-onda, a carga, a energia, e a massa do elétron. Caracterizando a nuvem eletrônica ao relacionar a velocidade do elétron movimentando-se no espaço (orbital) (PLOTNITSKY, 2010).

3.2.2.2 Equação de Schrödinger

Qualquer aproximação para estudar sistemas atômicos e moleculares a partir de primeiros princípios deve ser baseada na teoria que descreve o comportamento microscópico de partículas, ou seja, a mecânica quântica. Basicamente, isto consiste em resolver a equação de Schrödinger independente do tempo, Equação 15:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (\text{Eq. 15})$$

Esta é uma equação diferencial a autovalores, cuja resolução resulta na função de onda $\psi(r, t)$, que é a descrição matemática de um sistema de partículas quântico, sujeito a um determinado potencial externo. A função de onda contém todas as informações do sistema, o que nos permite obter qualquer propriedade do mesmo. O principal objetivo da química quântica é então resolver esta equação para o sistema contendo núcleos e elétrons, como uma molécula, por exemplo. No caso

de um sistema contendo N elétrons e M núcleos, o operador Hamiltoniano, em unidades atômicas, se escreve como na Equação 16:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

(Eq. 16)

onde i e j são os índices eletrônicos e A e B os nucleares. Os primeiros dois termos correspondem à energia cinética eletrônica e nuclear e os outros três correspondem à interação coulombiana elétron-núcleo, elétron-elétron e núcleo-núcleo, respectivamente. Para esse tipo de sistema, uma solução exata não é possível, e soluções aproximadas devem ser procuradas.

A primeira das aproximações consiste no desacoplamento dos graus de liberdade eletrônicos e nucleares seguido da resolução do problema eletrônico isoladamente, e é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer (BORN ; OPPENHEIMER, 1927). Nessa aproximação, supõe-se que os elétrons respondem instantaneamente ao movimento nuclear e foi motivada originalmente pela grande diferença entre a massa do núcleo e do elétron. Sob esta aproximação, o segundo termo da Equação 16 é desprezado e o último se torna uma constante. O restante é o chamado Hamiltoniano eletrônico, que possui uma dependência paramétrica das coordenadas nucleares.

Se levar em conta o spin eletrônico, a função de onda deve também satisfazer o princípio da antissimetria, que dita que a função de onda correspondente a férmions deve ser antissimétrica com respeito à troca de coordenadas entre quaisquer dois elétrons.

Como se pode ver a resolução desta equação é bastante complexa e possível apenas para elétrons livres ou átomos hidrogenóides. Desta forma, os últimos 90 anos foram dedicados a resolver a equação de forma simplificada.

3.2.2.3 Teoria do funcional de densidade (DFT)

Em 1964, Kohn e Hohenberg, publicaram um artigo onde apresentavam uma reformulação da mecânica quântica baseada na densidade eletrônica e não mais na função de onda. Esta densidade, normalmente representada por $\rho(\vec{r})$, envolvia a probabilidade de se encontrar o elétron em determinada coordenada. Kohn, auxiliado por Sham, determinaram como descobrir a $\rho(\vec{r})$ para um sistema real e assim surgiu a DFT (*Density Functional Theory*) (HOHENBERG; KOHN, 1964; POPLE et al., 1992).

A DFT permitiu o desenvolvimento de uma nova forma de estudar os complexos sistemas atômicos que compõe as moléculas e suas interações, de modo que computadores são usados para ajudar a compreender e a prever as propriedades (POPLE et al., 1992).

Para conseguir descrever camadas eletrônicas, Kohn e Sham, construíram um sistema de elétrons “fictícios”, onde os “elétrons” não interagem uns com os outros, mas cuja densidade é igual à densidade do sistema original. Para isso, imergimos os nossos elétrons fictícios num potencial efetivo, o potencial de Kohn-Sham, escolhido de forma a que esta condição seja satisfeita. Como este é um sistema de elétrons independentes (não-interatuantes), eles obedecem a uma equação de Schrödinger, a equação de Kohn-Sham. Se pode também provar que este potencial de Kohn-Sham é, ele próprio, um funcional da densidade, escreve-se normalmente este funcional como a soma de três partes, conforme Equação 17:

$$v_{KS}[\rho](\vec{r}) = v_{ext}(\vec{r}) + v_{Hartree}[\rho](\vec{r}) + v_{xc}[\rho](\vec{r}) \quad (\text{Eq. 17})$$

O primeiro termo representa o potencial externo, que numa molécula ou num sólido é normalmente criado pelos núcleos atômicos. O segundo, o potencial de Hartree, já presente na teoria de Thomas-Fermi, leva em conta a interação eletrostática clássica entre os elétrons, isto é, a interação entre o elétron e a

densidade média de carga de todos os elétrons do sistema. O último termo, denominado potencial de troca e correlação, inclui todos os termos não triviais da interação. O problema é encontrar boas aproximações para este último termo, mas que pode ser substituída pela LDA, aproximação da densidade local, do inglês *Local Density Approximation*. Já foram propostas inúmeras outras aproximações para o potencial de troca e correlação. As mais populares para o estudo de sólidos são agora as chamadas aproximações generalizadas de gradientes (GGA, de *Generalized Gradient Approximation*), aproximações um pouco mais complexas do que a LDA (HOHENBERG; KOHN, 1964; VOSKO et al., 1980; POPLE et al., 1992; PERDEW et al., 1996).

A DFT é aplicada para compreensão da transferência eletrônica envolvida na reação da enzima com substrato.

3.2.2.4 Metodologia Híbrida - QM/MM

Esquemas híbridos mecânica quântica-mecânica molecular (QM/MM) são adequados para a investigação de propriedades de macromoléculas ou reações químicas em ambientes complexos e particularmente adequados para estudar sítios ativos de enzimas ou solutos em fase condensada. O método combina a descrição da estrutura eletrônica do soluto (subsistema QM) com o computacionalmente mais barato tratamento de mecânica molecular do ambiente (subsistema MM), sendo estes acoplados por um Hamiltoniano híbrido, H_{QMMM} .

Em geral, denota-se o Hamiltoniano total, H_{TOT} , que opera sobre a função de onda de todo o sistema Ψ , conforme Equação 18:

$$H_{TOT}\Psi(r, R, \tau) = E_{TOT}(R, \tau)\Psi(r, R, \tau) \quad (\text{Eq. 18})$$

onde τ , R , e r representam respectivamente as coordenadas dos átomos clássicos, dos núcleos dos átomos quânticos e dos elétrons dos átomos quânticos. Este Hamiltoniano envolve três termos: um Hamiltoniano quântico, um Hamiltoniano clássico e um termo de acoplamento, Equação 19:

$$H_{TOT} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QMMM} \quad (\text{Eq. 19})$$

o mesmo vale para energia total, visto na Equação 20:

$$E_{TOT} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QMMM} \quad (\text{Eq. 20})$$

Para o tratamento de ambientes macromoleculares biológicos, foi implementada a parametrização por campo de força de Wang e Shen (WANG; SHEN, 2013). Finalmente, o termo de acoplamento E_{QMMM} pode ser decomposto em três contribuições, Equação 21:

$$E_{QMMM} = \sum_{i=1}^C q_i \int \frac{\rho(r)}{|r-\tau_i|} dr + \sum_{i=1}^C \sum_{\alpha=1}^Q \frac{q_i Z_\alpha}{|R_\alpha - \tau_i|} + E_{QMMM}^{LJ} \quad (\text{Eq. 21})$$

onde C é o número de átomos na região clássica, cujas cargas q_i são determinadas pelo campo de força escolhido para modelar o ambiente e α é o índice dos Q núcleos dentro do subsistema quântico com carga Z_α . O primeiro e o segundo termo representam respectivamente a interação eletrostática entre os elétrons e as cargas clássicas e entre núcleos no subsistema quântico e as cargas clássicas. Finalmente, E_{QMMM}^{LJ} modela a interação de van der Waals entre os átomos das regiões QM e MM através de um potencial de Lennard-Jones (WARSHEL; LEVITT, 1976B; MASSOVA; KOLLMAN, 2002; FERRER et al., 2012).

Outra situação que merece atenção especial é o que acontece na fronteira entre os sistemas QM e MM se esta envolve a separação de uma ligação covalente, pois ao se “cortar” esta ligação, a parte QM ganha um elétron desemparelhado, enquanto que na parte MM, o elétron não é tratado e é, portanto, suprimido no processo. O sistema passa a não ser descrito corretamente. Os principais métodos são:

1. o procedimento "*link-atom*", em que orbitais "fantasmas" são colocados no átomo de fronteira MM para saturar a valência da parte QM.
2. o procedimento LSCF (*Local Self Consistent Field*), que "congela" o orbital que descreveria a ligação de fronteira, ou seja, o orbital que seria do elétron MM da fronteira é incluído no cálculo QM, mas não é otimizado no processo SCF.
3. o geração de um pseudopotencial no carbono de fronteira MM, que permite tratar todos os elétrons na parte QM (não-trivial) (WARSHEL; LEVITT, 1976B; MASSOVA; KOLLMAN, 2002; FERRER et al., 2012).

Esta ligação entre as porções QM e MM pode ser tratada de várias maneiras diferentes. Normalmente o corte é feito nas ligações homopolares, como o caso de uma ligação carbono-carbono em uma proteína. O método adotado na particular implementação foi o método do "átomo ligado" com posição escalada, SPLAM (EICHINGER et al., 1999). Neste método, as ligações de fronteira (suposto C-C, mas não necessariamente) são substituídas por ligações carbono-hidrogênio. Este "hidrogênio de ligação" completa a valência do sistema QM, e sua posição é superimposta na ligação $C_{QM} - C_{MM}$. As forças exercidas neste hidrogênio são divididas em componentes perpendiculares e paralelas à ligação, sendo que a primeira é adicionada ao átomo de fronteira clássico, e a segunda é multiplicada por 0.1 e somada sobre os átomos de fronteira clássico e quântico, para evitar incluir um torque externo. Os outros termos clássicos de energia ligados envolvendo pelo menos um centro MM de fronteira são computados normalmente. Interações Lennard-Jones entre os átomos de fronteira e o hidrogênio de ligação são omitidos para pares de átomos separados por menos de três ligações. A carga do átomo de fronteira MM é dividida e somada sobre seus vizinhos para manter a carga total inalterada. Este método já foi utilizado com sucesso em cálculos anteriores com diferentes sistemas, incluindo biomoléculas (WARSHEL; LEVITT, 1976a; b).

3.2.3 Protocolo de cálculos

Para a realização dos cálculos teóricos em modelagem computacional utilizou-se o código GROMACS e SIESTA, em servidores Supermicro de rack da VERSATUS, servidores altamente paralelos, desenvolvidos para uma grande gama de aplicações intensivas nos campos de Modelagem Química, Simulações Financeiras, Genômica e Física.

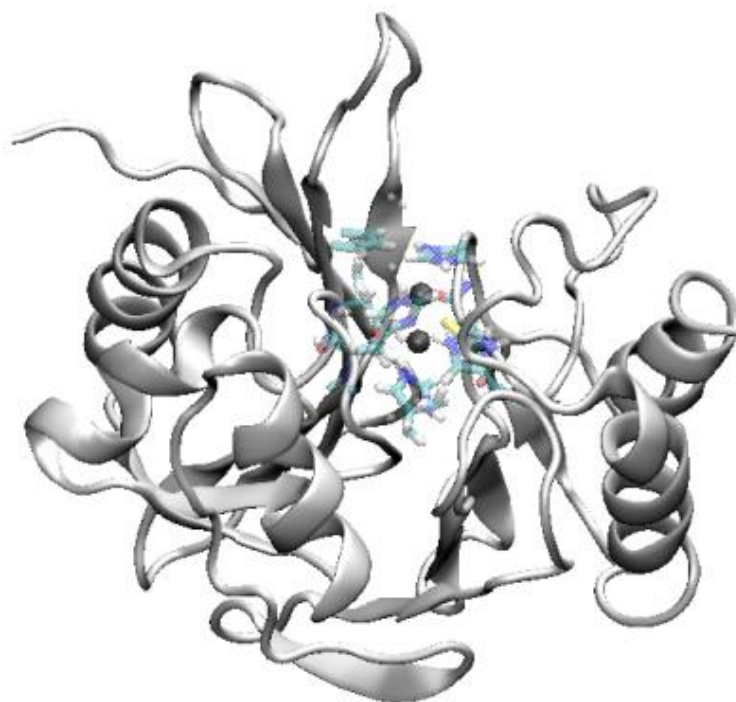
Foi de particular interesse a utilização de esquemas de simulação baseados em Dinâmica Molecular, dando uma abordagem relacionada à minimização de energia, de forma a observar o comportamento do cofator frente a enzima inativa.

Também se estudou a descrição mecânico-quântica do modelo escolhido para representar o sítio catalítico, e para este, elegeu a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (HOHENBERG; KOHN, 1964).

Também foi utilizado o software AutoDock Vina, para simular o melhor posicionamento da penicilina frente ao sítio ativo da enzima (TROTT; OLSON, 2010).

E para estudar a reação da enzima com seu substrato fez-se uso de método híbrido de mecânica quântica-mecânica molecular usando uma penicilinase de *Bacillus cereus*, uma metalo- β -lactamase (M β L), obtida por difração de raios-X e disponível no banco de dados PDB, *Protein Data Bank*, com a seguinte numeração, 2M5C.pdb, Figura 8, que possui dois íons de zinco (II) no sítio ativo, uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de aproximadamente 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (para enzima imobilizada e analisada por espectrofotometria modificada e um peso molecular de 28 KDa (KLEMES; CITRI, 1979).

Figura 8 - Estrutura cristalográfica obtida por difratometria de raios-X da metalo- β -lactamase (coordenadas obtidas de 2M5C.pdb) de *Bacillus cereus*, em tampão fosfato (PBS), pH 7, com dois íons zinco em seu sítio ativo.



Fonte: adaptado de Karsisiotis et al. (2013).

A modelagem computacional esclarece, detalhadamente, a estrutura tridimensional da molécula enzimática e do antibiótico, penicilina G, pois a dinâmica molecular (MD) contribui para entendimento do comportamento atomístico dos átomos envolvidos, considerando o campo de força (AMBER99SB) utilizado para parametrizar as interações interatômicas e direcionar à compreensão da reação enzimática heterogênea assistida, ao estudar o comportamento eletrônico dos átomos envolvidos na catálise enzimática, por mecânica quântica (QM).

Todos os cálculos e estudo por mecânica molecular foi feita utilizando-se o código GROMACS (PRONK et al., 2013). Para os estudos de simulação, a estrutura

da penicilinase, obtida por raios-X, era composta de aproximadamente 3560 átomos, os quais foram acomodados numa caixa ortogonal de 72 x 70 x 65 Å, visto que a menor distância entre as moléculas vizinhas era 12 Å. Em princípio os íons inorgânicos foram removidos daquela estrutura obtida por difração de raios-X.

Os estados de protonação dos resíduos foram ajustados para coincidir com os correspondentes a um pH 7, obtendo-se uma proteína com carga negativa de $-5e^-$, quando não ativada pelo cofator. A proteína foi em seguida relaxada pela otimização da geometria, minimizando o potencial para o mínimo mais próximo (JONES et al., 1997).

O sistema foi solvatado por água explícita e quantidade suficiente de contra-íons para neutralizar o sistema de modo a se atingir a concentração desejada. O sal escolhido para gerar os contra-íons foi o cloreto de zinco ($ZnCl_2$) em duas concentrações (quanto ao número de íons): $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, que correspondem aos pontos extremos das concentrações usadas no experimento. Portanto, o número total de átomos do sistema solvatado, nesta situação, passou a ter cerca de 32.000 átomos. A geometria do sistema foi re-otimizada de modo que a força máxima fosse inferior a $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. O sistema foi ainda termalizado por dinâmica molecular NVT-conjunto (MD) usando o campo de força empírico AMBER99SB para 1 ns e com um intervalo de tempo de 2 fs. O termostato Nosé-Hoover foi usado para controlar a temperatura em torno de 300 K (EVANS; HOLIAN, 1985; HORNAK et al., 2006)

Numa segunda etapa, a pressão do sistema foi equilibrada usando o barostato Parrinello-Rahman, a 1 atm. Isso teve como objetivo equilibrar a densidade do sistema, por mais 1 ns. Finalmente um tipo de dinâmica computacional sustentada em cálculos NPT-MD em 300 K e 1 atm, para 100 ns. Toda a análise estrutural é então realizada dentro da trajetória correspondente (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

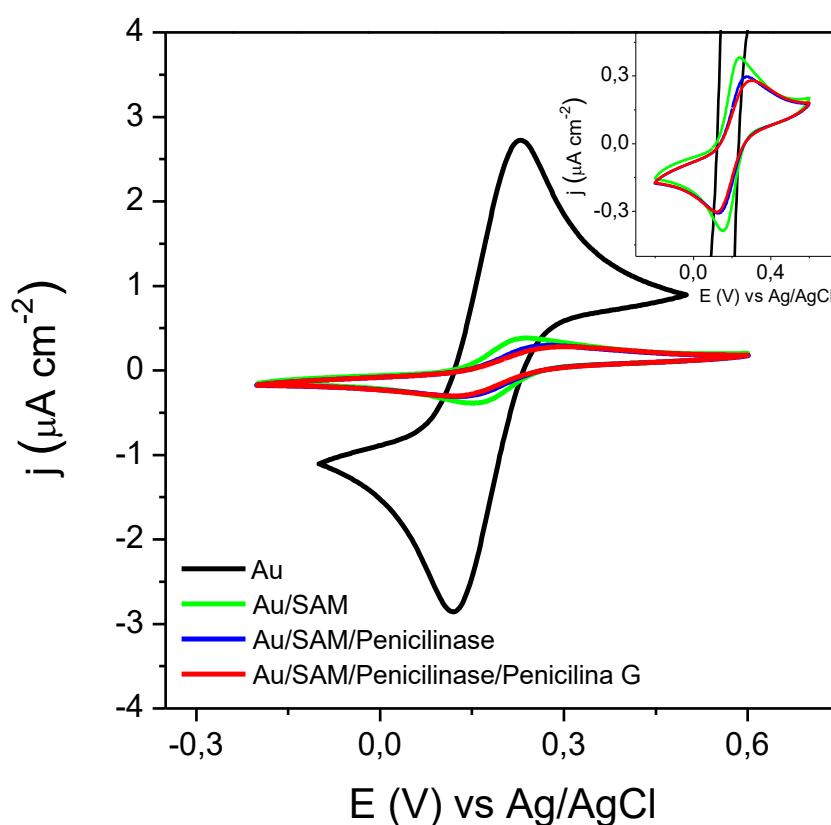
4 PENICILINASE: abordagem eletroquímica e modelagem computacional

4.1 Abordagem Eletroquímica

Em cada etapa de funcionalização foram realizadas voltametrias cíclicas para garantir que uma adsorção completa e efetiva da superfície tenha ocorrido como visto na Figura 9.

A solução de ferri/ferro utilizada na célula eletroquímica é composta de ferricianeto de potássio (1 mmol L^{-1}), adicionalmente a ferrocianeto de potássio tri-hidratado (1 mmol L^{-1}) e nitrato de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), a qual possibilita a troca eletrônica da interface com o meio, ou seja, há transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e os íons de Fe, $Fe^{+2} \rightleftharpoons Fe^{+3} + e^{-}$, ocorrendo reações de oxirredução.

Figura 9 – VC's características de diferentes eletrodos: o de Au puro, o de Au/SAM, o de Au/SAM/Penicilinase e o de Au/SAM/Penicilinase na presença de substrato. Realizadas em solução de ferri/ferro, 1 mmol L^{-1} , em KNO_3 , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O substrato é a penicilina G a $0,65 \text{ mmol L}^{-1}$. Em destaque, ampliação na região onde ocorreu bloqueio de corrente ($-0,5$ a $0,5 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$) devido à formação de filme na superfície metálica.



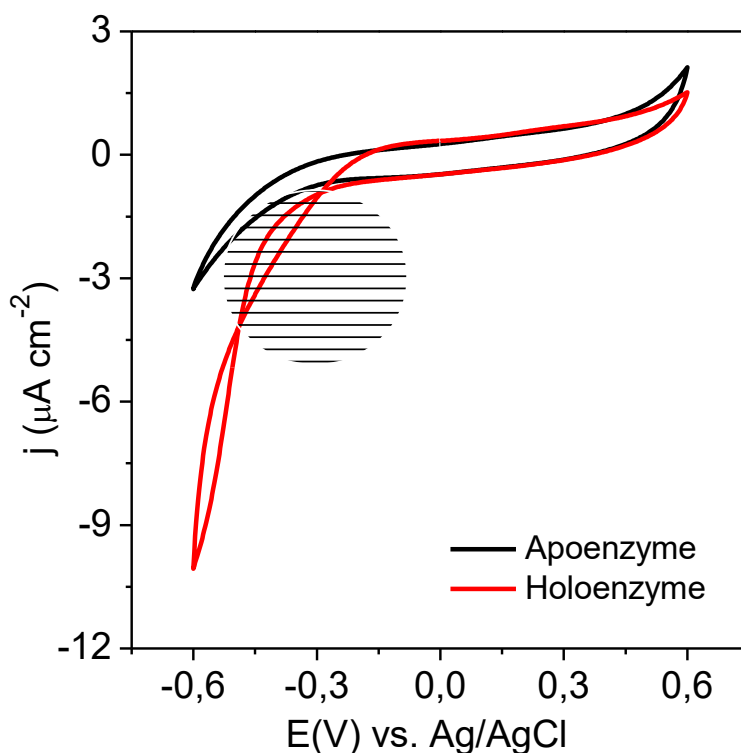
Observou-se que houve um decréscimo nas densidades de corrente anódicas e catódicas, ou seja, a monocamada de L-cisteína impede a passagem de elétrons, responsáveis pela oxidação e redução, $\text{Fe}^{+2} \rightleftharpoons \text{Fe}^{+3} + e^-$ (associado ao par redox ferri/ferro), mas não totalmente, pois há transferência eletrônica, em quantidade diminuta, demonstrando que ocorreu efetivamente a formação da SAM.

Para fins comparativos, destacou-se na imagem a região onde ocorreu a diminuição da corrente, possibilitando analisar que ao adsorver a MβL, houve um

novo impedimento e quando se coloca a penicilina G, sem íons metálicos, também ocorre, porém discreto. Visto que não há presença de cofator, não se observou atividade catalítica e, portanto, correntes associadas a uma reação desta enzima com o substrato não foram detectadas nestes voltamogramas.

As enzimas possuem um centro ativo aonde o substrato irá se ligar e reagir formando o produto. No entanto, algumas enzimas precisam ser ativadas, ou seja, uma apoenzima (enzima inativada) liga-se a um grupo não proteico, denominado cofator (íon metálico) ou coenzima (pequenos grupos orgânicos), adquirindo as condições necessárias para a reação. A enzima quando ativada pelo cofator (neste caso específico foi utilizado o átomo|íon zinco) é denominada holoenzima. A Figura 10 mostra o perfil voltamétrico da enzima quando a mesma está ativa e inativa.

Figura 10 - Perfis voltamétricos de uma apoenzima e uma holoenzima, imobilizadas em eletrodo de Au. Realizado em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 a 25°C. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Penicilina G a 0,65 mmol L⁻¹. O íon Zn²⁺, a 25 mmol L⁻¹, foi utilizado como cofator. Região hachurada indica um “laço de nucleação”.



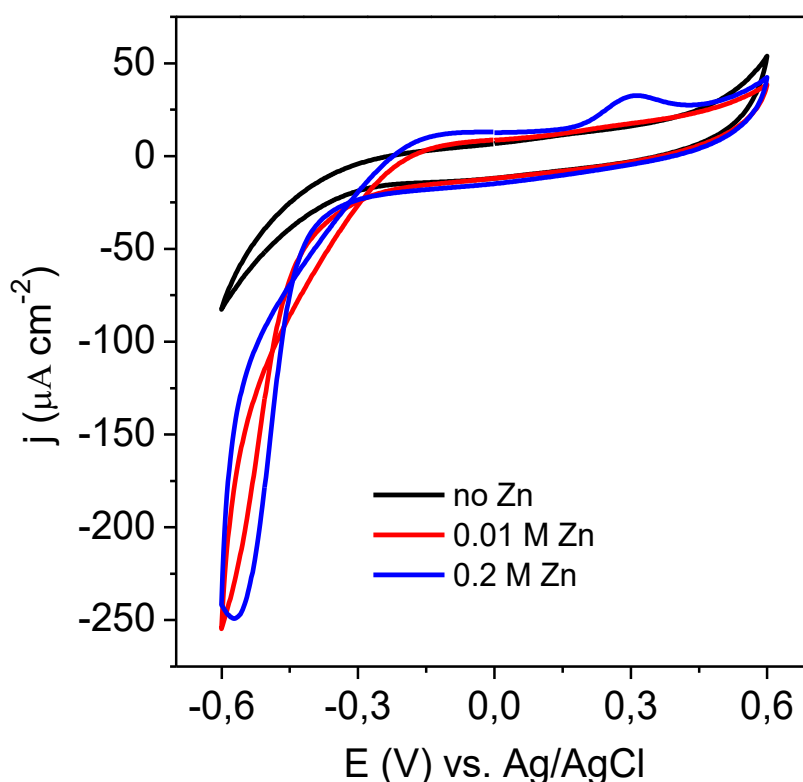
Na Figura 10 utilizou-se a VC com varredura de potencial na direção em que os potenciais tornam-se mais negativos, observando-se, neste caso, um pico de redução do substrato no eletrodo funcionalizado, o qual forneceu indícios de um possível carregamento por elétron do sistema, que deve facilitar a reação de catálise, sendo um ponto importante a ser explorado utilizando ferramentas de análise computacional.

À medida que o potencial se torna mais negativo e atinge o potencial de redução, a corrente faradaica (corrente catódica) aumenta abruptamente devido à reação de redução do substrato no eletrodo. O substrato próximo à superfície do eletrodo é consumido na reação de redução, e suprido pelos processos de difusão e migração na solução, embora o regime seja dominado pela difusão. Pode se formar na volta, o “laço de nucleação” (ver Figura 12). Esse laço mostra que é possível reduzir o substrato com um gasto menor de energia, pois o eletrodo está revestido com depósito de substrato. Em potenciais menos negativos há a presença de uma corrente anódica (corrente positiva) devido à remoção do depósito ou oxidação do eletrodo (NECKEL, 2009).

Na Figura 11 analisou-se a atividade enzimática relacionada com o uso de duas diferentes concentrações de zinco, como cofator da metaloenzima. Nesta figura tem-se uma VC comparando o perfil voltamétrico para duas diferentes concentrações de zinco (cofator), indicando que não há variação significativa no pico redutivo (magnitude da corrente elétrica) em função da concentração do mesmo.

No entanto, há uma pequena variação na corrente ou carga associada ao potencial oxidativo, ou seja, na análise com maior concentração de cofator, há um pico de oxidação, indicando que alguns cofatores, que se encontram em excesso, podem estar se carregando no potencial redutivo e descarregando no oxidativo, conforme pode ser notado na Figura 11.

Figura 11 - Voltametrias cíclicas da reação enzimática da penicilinase com cofator. Realizado em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 a 25°C. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Penicilina G a 0,65 mmol L⁻¹. Utilizou-se 0,01 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹ de zinco como cofator. Ambas apresentaram densidades de corrente próximas e com “laço de nucleação”. A VC do zinco apresenta um ponto de reversão da enzima em -0,6 V.



Como o potencial de redução da enzima é pouco influenciado pela concentração do cofator (uma vez que este esteja presente) envolvido na reação, utilizou-se a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) como ferramenta de análise complementar, visto que esta técnica é mais precisa e capaz de fornecer informações adicionais dos processos cinéticos envolvidos com a transferência de carga. De fato, a EIE é uma técnica eletroquímica (de estado estacionário) sensível para aferições de informações em sistemas elétricos complexos em uma interface eletrodo/solução. A resposta da aplicação de um pequeno sinal de corrente alternada, feita em uma ampla faixa de frequências e em vários potenciais, possibilita diferenciar processos com tempos característicos distintos, permitindo obter parâmetros como a resistência da solução (R_s), a resistência transferência de

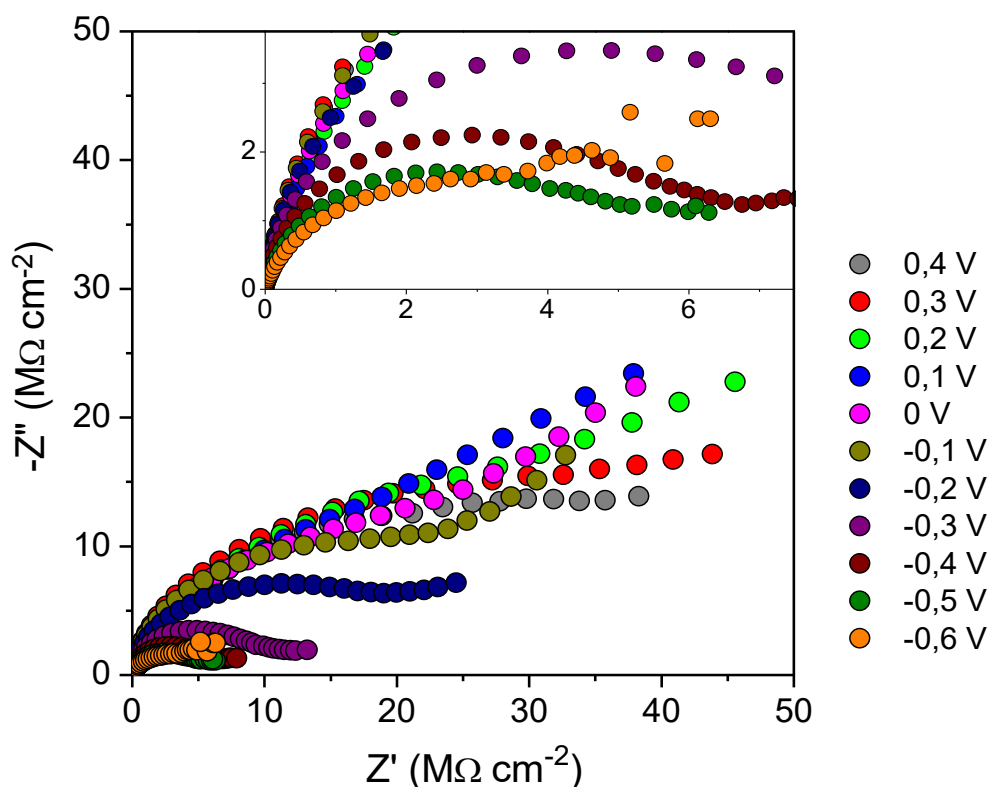
elétrons do eletrodo para a solução (R_{ct}) e a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), por exemplo. A impedância obtida é uma função complexa definida a partir das suas componentes real, Z' , e imaginária, $-Z''$ (CARVALHO et al., 2006).

De forma geral, a EIE é usada para se obter informações sobre as propriedades da reatividade de interfaces (proteínas/substrato) como é o caso de proteínas adsorvidas na superfície de eletrodos (FERNANDES et al., 2014). A EIE utiliza sinais muito pequenos de perturbação que não comprometem as propriedades da superfície funcionalizada pela metaloenzima (ensaio não destrutivo), tornando possível estudar as reações de oxirredução de forma consistente e em função de mudanças periódicas do campo externo (CARVALHO et al., 2006).

Relembrando que a Impedância Eletroquímica (Z) é definida como a razão obtida entre o potencial alternado aplicado ($E(t)$) e a corrente obtida em função desta perturbação ($i(t)$). À medida que se varia a frequência (f) em que se aplica o $E(t)$, são revelados os mecanismos eletroquímicos (pois se revela a escala de tempo de diferentes processos) que podem ser modelados por elementos de circuito (como resistores e capacitores). Os resultados obtidos são mais comumente plotados em gráficos do tipo Nyquist, os quais relacionam cartesianamente a componente da impedância real (Z') com a componente da impedância imaginária ($-Z''$) (BUENO et al., 2013).

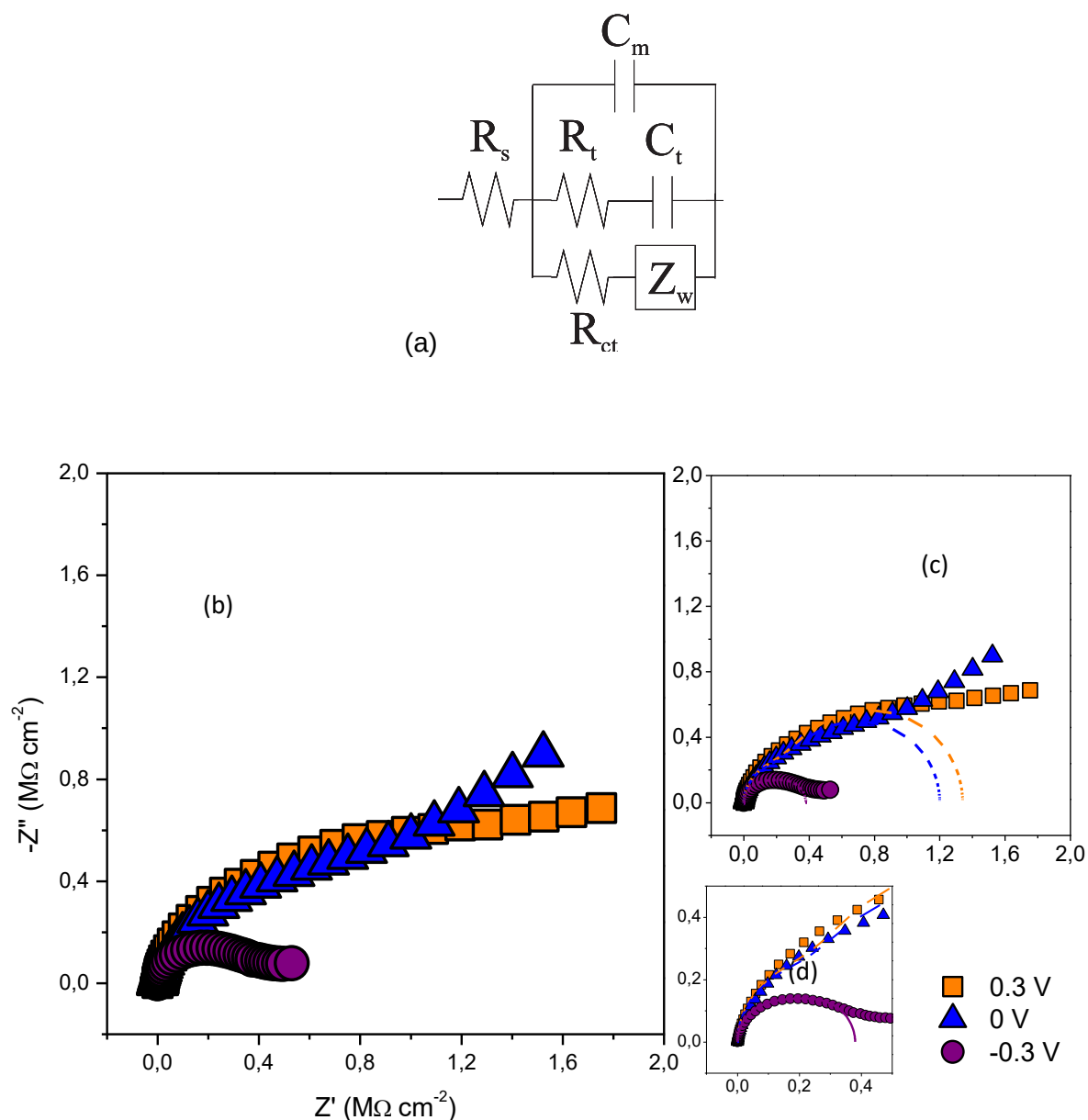
Na Figura 12 são observados os gráficos de EIE ou os chamados diagramas de Nyquist para 11 (onze) diferentes potenciais estacionários, $E(V)$, para um eletrodo funcionalizado com penicilinase e na presença do substrato.

Figura 12 - Espectro de impedância (construídos em intervalo de frequências de 1 mHz a 1 MHz) para onze diferentes potenciais aplicados entre -0,6 V a 0,4 V. Estes espectros foram obtidos em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 a 25°C. Penicilina G (substrato) em concentrações de 0,65 mmol L⁻¹. Utilizou-se 1 mmol L⁻¹ de cofator, Zn. Em destaque, regiões de baixa impedância real (Z').



A adição de elementos ao circuito elétrico equivalente tem que ser criteriosa para que os resultados sejam compatíveis com os fenômenos físicos e químicos que acontecem na interface eletrodo|solução. O circuito elétrico equivalente utilizado neste trabalho está representado na Figura 13 (a), na qual se tem gráficos de EIE para potenciais de -0,3 V, 0 V e 0,3 V e na presença de cofator zinco (Fernandes et al., 2014). Em destaque observou-se suas respectivas curvas de ajuste obtidas com o auxílio do *software* Zview2 para a reação redox do eletrodo funcionalizado com a β -lactamase e seu substrato. Os ajustes são forçosamente extrapolados para demonstrar o fechamento do semicírculo que permite obter o valor de R_{ct} como principal parâmetro deste circuito equivalente e que está diretamente associado à cinética de transferência eletrônica que ocorre nesta interface.

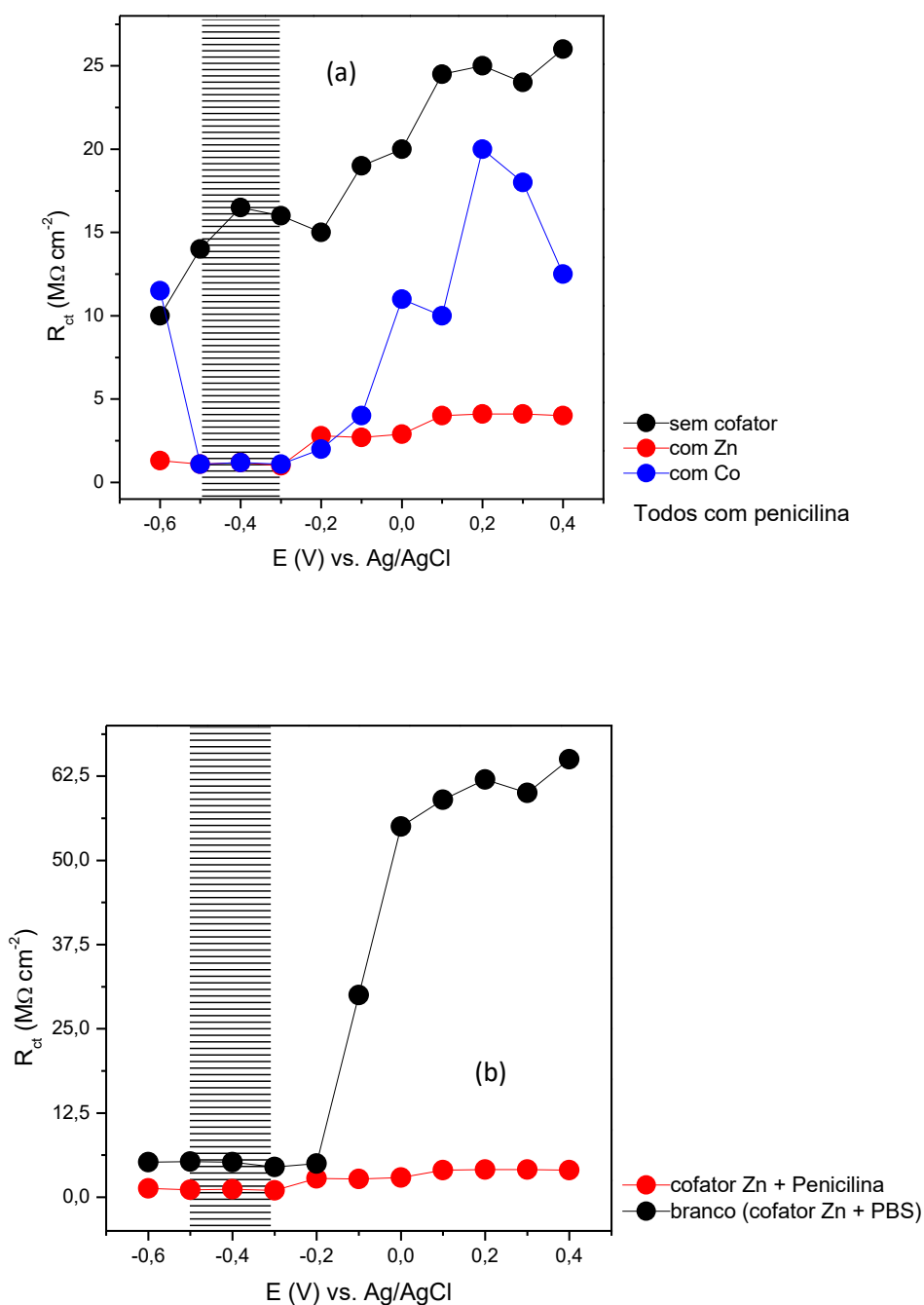
Figura 13 - Em (a) tem-se o circuito elétrico equivalente correspondente ao sistema, onde C_m corresponde à capacitância da monocamada sem contribuição iônica, R_t e C_t , resistência e capacitância, respectivamente, não compensadas, R_s é resistência de solução, C_{dl} é capacitância da dupla camada elétrica, R_{ct} é resistência a transferência de cargas, Z_w é Impedância de Warburg. Em (b), tem-se diagramas de Nyquist realizados em solução de PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, a 25°C, contendo 1 mmol L⁻¹ de cofator e penicilina G a 0,65 mmol L⁻¹. Foram obtidas as correntes para os potenciais -0,3V, 0 V e 0,3 V para frequências de 1 mHz a 1 MHz, com cofator, zinco. Destacou-se em (c) e (d), as respectivas curvas de ajuste para cada potencial aplicado, de acordo com o circuito elétrico equivalente correspondente à interação eletrodo funcionalizado e seu substrato. Onde, $-Z''$ é impedância imaginária e Z' é a impedância real.



A partir dos dados obtidos do ajuste do circuito elétrico equivalente, obtiveram-se os valores de R_{ct} , os quais foram plotados em função do potencial,

conforme visto na Figura 14. O comportamento do valor de R_{ct} em função do potencial pode ser relacionado diretamente com a reação enzimática, pois, de acordo com a lei de Faraday, a passagem de corrente através da interface eletrodo|solução caracteriza uma reação eletroquímica e a sua cinética pode ser diretamente associada aos valores de R_{ct} . No caso, associou-se a intensidade da reação enzimática estudada, relacionando a resistência à transferência de cargas, R_{ct} , à resistência a passagem de uma densidade de corrente faradaica para a transferência de elétrons e a concentração de reagentes de centros redox no “filme” molecular enzimático (TICIANELLI; GONZALEZ, 2005; MIGUEL et al., 2015).

Figura 14 - Gráfico da resistência à transferência de carga (R_{ct}) vs. E (V). Mostra em a) a variação da R_{ct} na ausência e na presença de cofatores da reação enzimática na presença do substrato, Penicilina G em concentrações de $0,65 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizou-se 1 mmol L^{-1} de cofator, Zn ou Co, em b) o comportamento de R_{ct} na presença e na ausência de substrato tendo Zn, como cofator. O aumento da atividade da metaloenzima é inversamente proporcional ao R_{ct} . A área hachurada corresponde aos potenciais que favorecem a reação.



Os resultados apresentam indícios que para medidas realizadas onde o potencial estacionário, E (V), são mais negativos, há uma diminuição da resistência, conforme verificado no diagrama de Nyquist, da Figura 12, e comparados com as Figuras 14 (a) e 14 (b) indicando passagem de elétrons com maior facilidade nestes potenciais, ou seja, no caso da metaloenzima, sugere-se que há uma reação redox enzimática, pois é evidenciado uma menor resistência à transferência de cargas (R_{ct}). Além disto, observou-se que o resultado obtido de R_{ct} para cofatores diferentes (cobalto e zinco), tem valores (e comportamento em função do potencial) próximos na região área hachurada. Essa região de potencial coincide com a região da VC onde aparece o laço de nucleação (Figura 11), como dito anteriormente, sugestivo de catálise enzimática, indicando assim que a reação é realmente facilitada (por ação enzimática) nestes potenciais e que o tipo de cofator não altera a reação, quando aplicado o E (V) adequado que, aparentemente, colabora com a reação redox (os resultados de simulação a serem apresentados mais adiante reforçarão esta premissa).

Na Figura 14 (a) compararam-se as R_{ct} 's obtidas com e sem cofatores, o que mostrou que na ausência de cofator houve maior resistência à troca de elétrons, sugerindo que este aumento esteja relacionado à ausência de catálise enzimática. Desta forma, os resultados eletroquímicos sugerem um processo de eletrocatalise enzimática.

Por conta de todas as observações realizadas nas análises eletroquímicas, especialmente pelas diferenças observadas quando as medidas são realizadas com e sem a presença do cofator, sugere-se uma reação eletrocatalítica induzida pela presença do cofator. Isso é especialmente corroborado pela diminuição de R_{ct} , ou seja, aproximadamente e somente 2,2% da resistência de transferência de carga obtida na presença de zinco (foi tomado à resistência obtida sem cofator como sendo 100%) para certos potenciais estacionários, E (V), sugestivo de reação redox facilitada por potencial. Além disso, a região de potencial onde os valores de R_{ct} são minimizados coincide com a região de potencial onde se observa o laço de nucleação na VC, o que é um forte indicativo da presença de uma eletrocatalise enzimática. Desta forma, sugere-se que a reação da penicilinase com a penicilina G

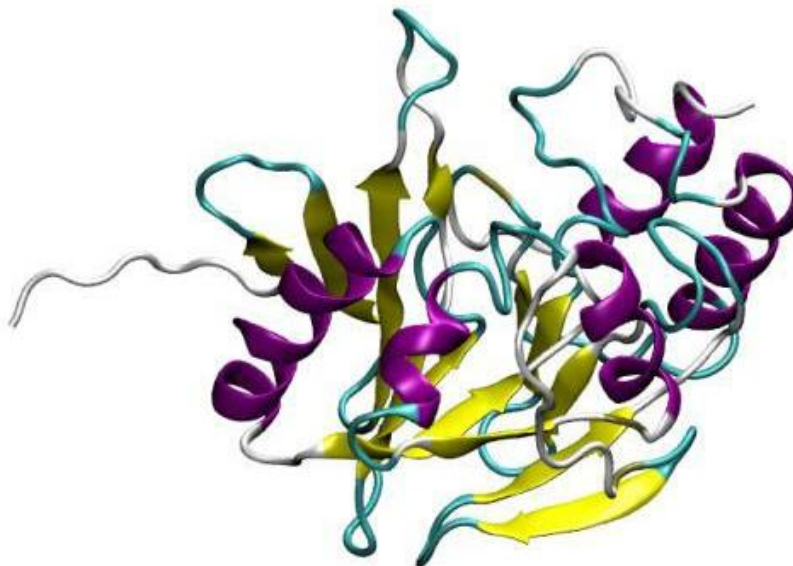
seja um modelo de reação redox enzimática, servindo de estímulo e direção para modelagem computacional. Esta ferramenta de pesquisa como veremos, apontará sugestões do modelo enzimático assistido pelo eletrodo (eletrocatalise) e do mecanismo reacional heterogêneo.

4.2 Análise computacional da interação penicilinase/ Zn^{2+} .

Nesta etapa do trabalho, os resultados apresentados de análise computacional foram obtidos por dinâmica molecular (DM), ou mecânica molecular, para saber a influência que o zinco (cofator) exerce sobre a penicilinase e a estabilidade na interação zinco-proteína. Análises de mecânica quântica foram também complementarmente realizadas para indicar o melhor entendimento da interação da enzima com o substrato do ponto de vista eletrônico, onde foi simulado o papel do sítio ativo.

Para realizar as análises computacionais adotou-se um modelo de penicilinase (2M5C.pdb), Figura 15, a partir do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), o qual forneceu coordenadas iniciais para estudos de dinâmica molecular.

Figura 15 - Penicilinase (2M5C.pdb) obtida por difratometria de raios-X, em pH 7. *A priori*, os íons inorgânicos foram retirados da estrutura.



Fonte: adaptado de (KARSISIOTIS et al., 2013) .

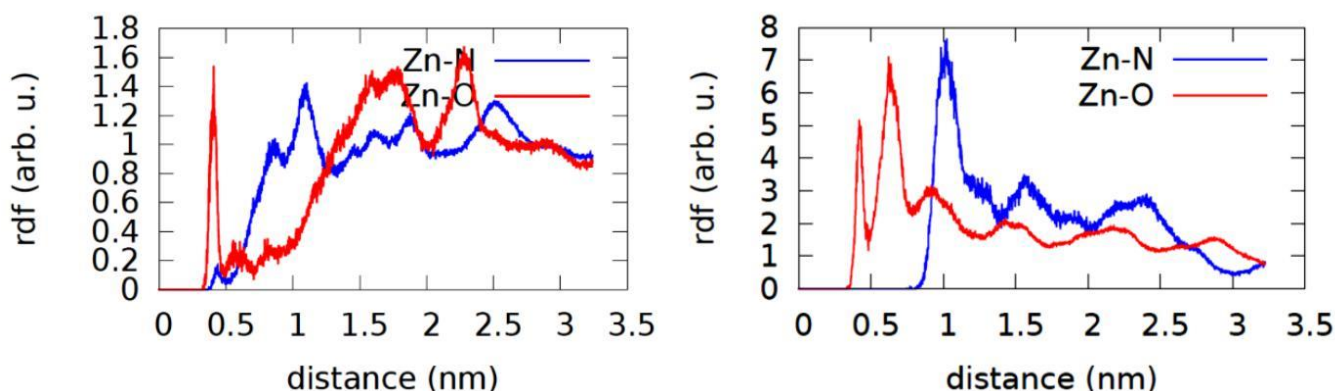
Todos os cálculos e estudo por mecânica molecular foram feitos utilizando-se o código GROMACS (PRONK et al., 2013). Para os estudos de simulação, a estrutura da penicilinase, obtida por raios-X, era composta de aproximadamente 3560 átomos, os quais foram acomodados numa caixa ortogonal de 72 x 70 x 65 Å, visto que a menor distância entre as moléculas vizinhas era 12 Å. Em princípio, os íons inorgânicos foram removidos daquela estrutura obtida por difratometria de raios-X. Os estados de protonação dos resíduos foram ajustados para coincidir com os correspondentes a um pH 7, obtendo-se uma proteína com carga negativa de $-5e^-$. A proteína foi, em seguida, relaxada pela otimização da geometria, minimizando o potencial para o mínimo de energia potencial mais próximo por métodos de gradientes utilizando algoritmos de *steepest descent* (JONES et al., 1997; LEACH, 2001).

O sistema foi solvatado por água explícita e quantidade suficiente de contra-íons para neutralizar o sistema de modo a se atingir a concentração desejada. O sal escolhido para gerar os contra íons foi o cloreto de zinco (ZnCl_2) em duas concentrações (quanto ao número de íons): $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, que correspondem aos pontos extremos das concentrações usadas no experimento. Portanto, o número total de átomos do sistema solvatado, nesta situação, passou a ter cerca de 32.000 átomos. A geometria do sistema foi reotimizada de modo que a força máxima fosse inferior a $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. O sistema foi ainda termalizado por dinâmica molecular NVT-conjunto (MD) usando o campo de força empírico AMBER99SB para 1 ns e com intervalo de tempo de 2 fs. O termostato Nosé-Hoover foi usado para controlar a temperatura em torno de 300 K (EVANS; HOLIAN, 1985; HORNAK et al., 2006).

Numa segunda etapa, a pressão do sistema foi equilibrada usando o barostato Parrinello-Rahman, a 1 atm. Isso teve como objetivo equilibrar a densidade do sistema, por mais 1 ns. Finalmente, um tipo de dinâmica computacional sustentada em cálculos NPT-MD em 300 K e 1 atm, para 100 ns. Toda a análise estrutural é então realizada dentro da trajetória correspondente (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

Com a intenção de demonstrar a estabilidade da interação do cofator metálico, Zn, com a penicilinase, análises computacionais foram então realizadas em condições de baixas e altas concentrações de cofator, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, com a intenção de se observar com quais átomos constituintes da proteína o cofator interagiria, o que finalmente foi analisado pela função de distribuição radial (RDF), como visto na Figura 16.

Figura 16 - Função de distribuição radial (RDF) entre átomos, de oxigênio e nitrogênio, da proteína e os átomos de zinco. As trajetórias de Dinâmica Molecular foram obtidas para as concentrações de 0,01 e 0,2 mol L⁻¹ de zinco, respectivamente.

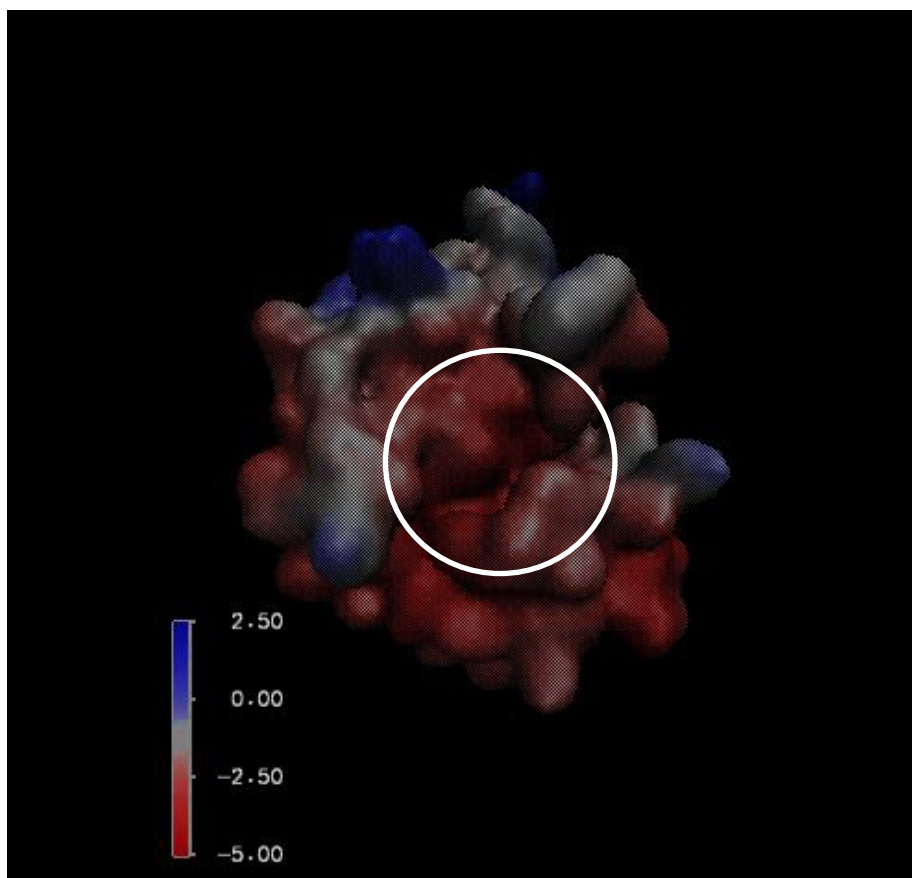


A presença de um ou mais íons Zn²⁺ próximos à molécula da enzima foi detectado com facilidade pela função de distribuição radial, a qual mostra por probabilidade a distância esperada que um par de átomos esteja localizado para um sistema com a mesma densidade e distribuição aleatória. De acordo com os resultados obtidos e analisados por dinâmica molecular RDF, átomos de zinco tendem a estar perto dos oxigênios do aspartato e das histidinas situados no sítio ativo. As concentrações de cofator, 0,01 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹, obtidos experimentalmente pela VC e EIE, foram testadas, comprovando que não houve nenhuma alteração na resposta da reação enzima/substrato, ou seja, a enzima tinha seu sítio preenchido e ativado pela presença do cofator. Assim, observou-se que, mesmo em baixas concentrações, o zinco tende a se alojar no sítio ativo da proteína. Isso comprova afinidade elevada da enzima pelo cofator, independentemente da concentração de cofator ambientando a enzima.

A análise de potencial eletrostático lança luz sobre a razão pela qual a enzima é capaz de atrair o cofator metálico. Na região do sítio ativo, é evidenciado que, pelo menos, um íon de zinco se liga à proteína, visto que, o potencial eletrostático é mais negativo, em comparação com a superfície acessível da enzima. A Figura 17 mostra o potencial eletrostático, correlacionado com a distribuição dos resíduos carregados.

No entanto, há outra região vizinha, com o mesmo potencial favorável, contendo resíduos de histidina e aspartato, e, no caso da simulação com a concentração de sal mais elevado, alguns átomos de zinco também podem ser encontrados nas proximidades deste local.

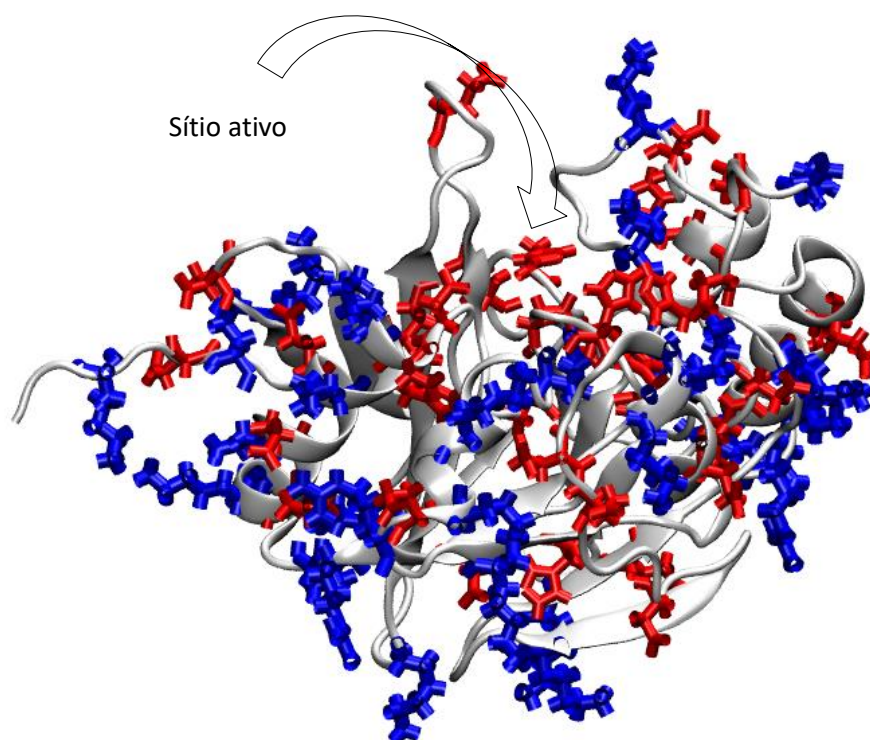
Figura 17 - Distribuição de potencial eletrostático relacionado à carga parcial clássica da penicilinase, em volts. Região destacada pelo círculo corresponde ao sítio ativo, quando a enzima está inativa.



Correspondentemente, no sítio ativo existe a possibilidade de que dois íons de zinco sejam vinculados, e ele simplesmente não foi observado porque o atual modelo não considera as interações covalentes entre os íons metálicos e os resíduos de proteínas, que tiveram de ser parametrizados, *a priori*.

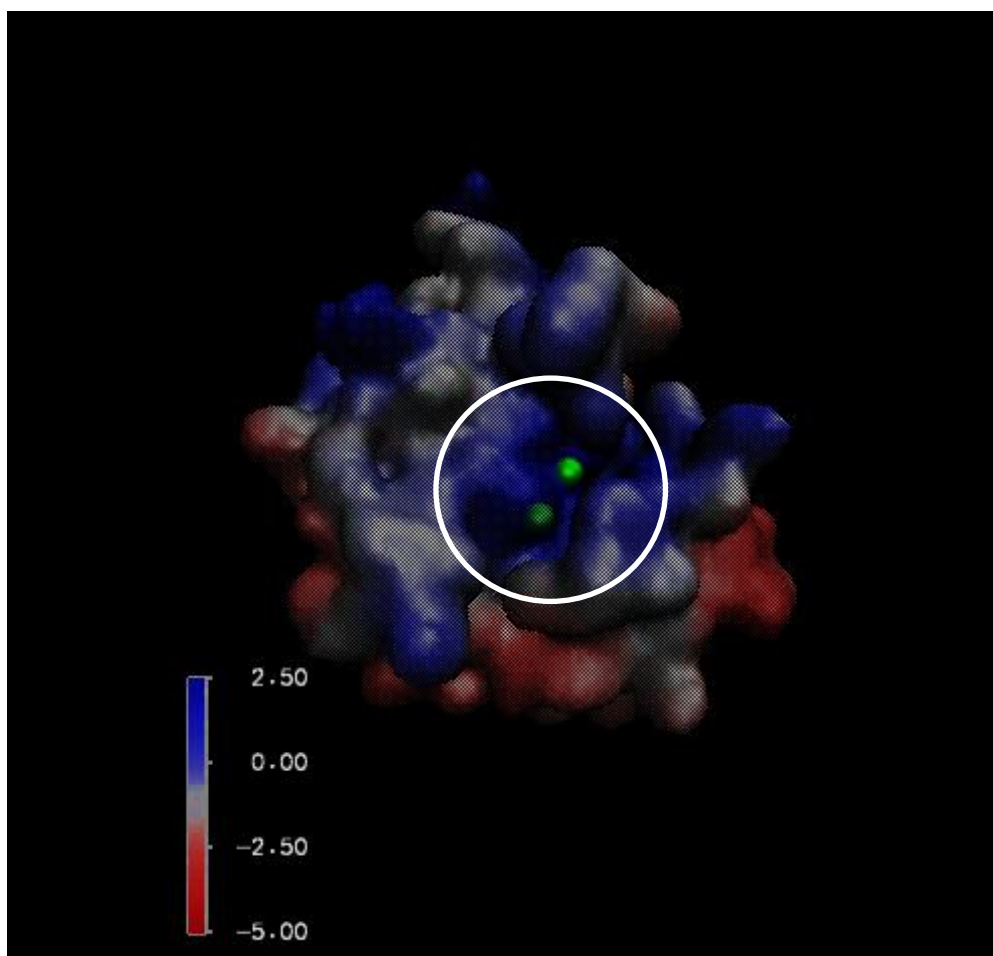
Na Figura 18, tem-se a representação das cadeias laterais dos aminoácidos e suas respectivas cargas, que ao serem somadas resultam em uma carga líquida de $-5e^-$.

Figura 18 - Representação em fita da penicilinase junto com os resíduos carregados positivos (azul) e negativos (vermelho).



Além disso, mostrou-se que, nas condições experimentais escolhidas, a enzima pode, eletrostaticamente, atrair os átomos de cofator para a região correta. Assumindo que o zinco se ligou ao sítio catalítico da penicilinase, Figura 19, conforme indicativo dos resultados obtidos pelas metodologias eletroquímicas aplicadas neste trabalho, demonstrou-se que o sítio atraiu 2 íons Zn^{2+} , e tornou-o um ambiente de carga positiva, favorecendo a interação com a penicilina, que apresenta carga líquida de $-1e^-$.

Figura 19 - Distribuição de potencial eletrostático relacionado à carga parcial clássica da penicilinase, em volts. Região destacada pelo círculo corresponde ao sítio ativo, quando a enzima está ativada pelo cofator.

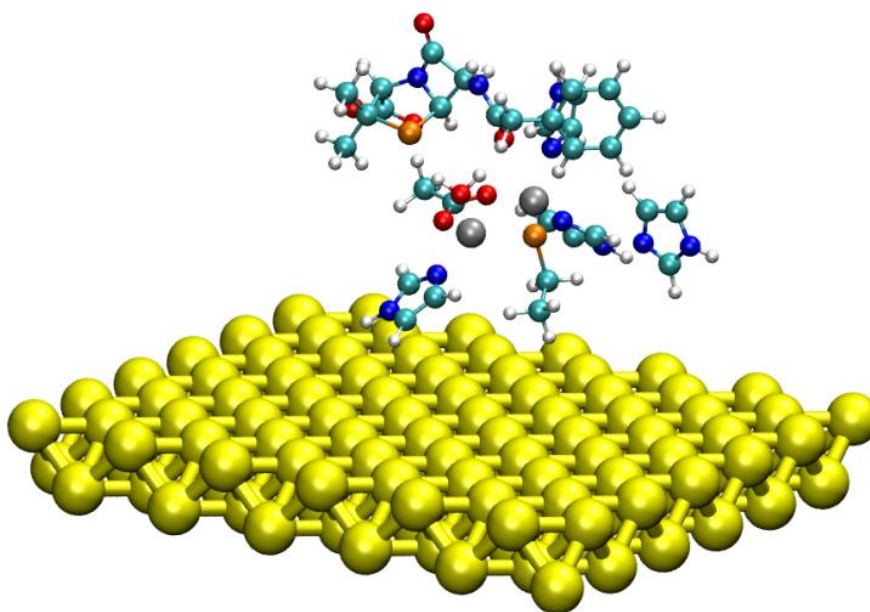


A estrutura eletrônica do sítio ativo foi também estudada aqui, de modo a compreender qual é a contribuição do acoplamento do eletrodo para a catálise promovida pela penicilinase. Por esta razão, os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados a partir da configuração atômica da estrutura cristalográfica obtida por difratometria de raios-X de *B. cereus*.

Considerando-se o custo do cálculo computacional quando análises quânticas são necessárias, utilizou-se aqui um modelo de complexo enzima/substrato onde apenas as coordenadas dos resíduos presentes no sítio catalítico (com a presença de átomos de zinco), moléculas de água e o eletrodo metálico (na forma de *cluster* representado por duas camadas atômicas de ouro) foram computados para os

cálculos de estrutura eletrônica, conforme visto na Figura 20. Desta forma, a partir deste modelo, baseado nas coordenadas obtidas anteriormente, realizou-se um cálculo de estrutura eletrônica, a fim de elucidar quais são as espécies que trocam elétrons com o eletrodo, durante a reação enzimática. O método mecânico quântico utilizado é sustentado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (HOHENBERG; KOHN, 1964; POPLÉ et al., 1992).

Figura 20 - Representação atomística do modelo complexo enzima-substrato mais eletrodo, utilizado nos cálculos quânticos de estrutura eletrônica, com carbono (ciano), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), hidrogênio (branco), enxofre (laranja), zinco (cinza) e ouro (amarelo).

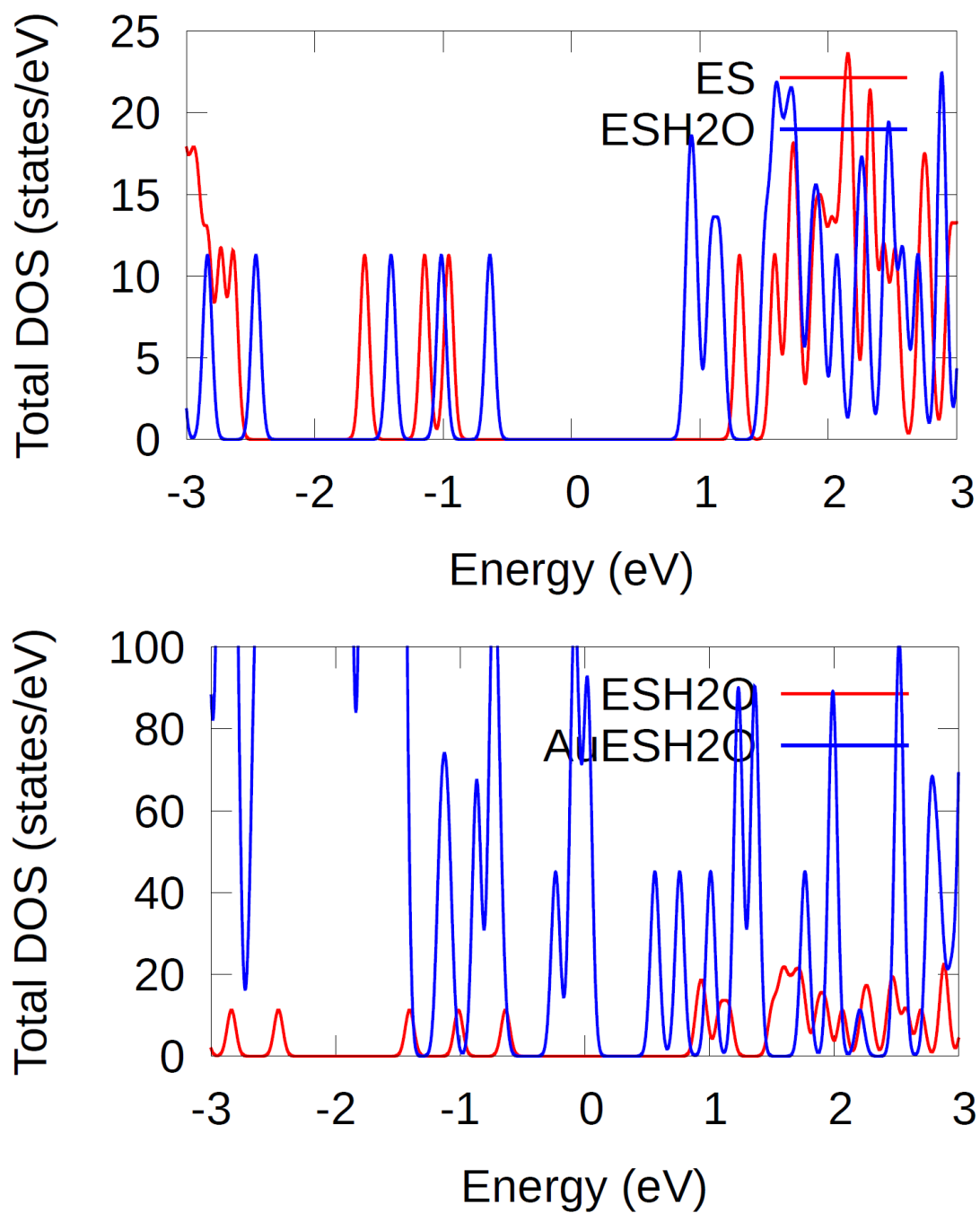


Na Figura 21, pode-se observar que o meio aquoso (solvente) aumenta os estados ocupados pelos elétrons, predispondo a reação esperada como catálise, isto é, uma hidrólise, conforme esperado. No entanto, observou-se que existe alta densidade de estados ocupados na presença de ouro, especialmente a região de energia nula (em eV), particularmente a região que separa os estados eletrônicos ocupados dos desocupados (nível de Fermi). No caso do cálculo, na ausência do

eletrodo de ouro, observa-se um *gap* entre o último estado ocupado e o primeiro desocupado, na faixa de 2 eV. Observa-se também que a inclusão da molécula de água modifica ligeiramente a DOS (densidade de estados eletrônicos da molécula para uma determinada faixa de energia, ou seja, a nuvem eletrônica por volume) “estreitando” o *gap*. A influência do eletrodo de ouro foi em misturar estados ocupados do metal com estados energeticamente superiores do sistema modelo enzima/substrato.

Os resultados sugerem a contribuição de moléculas de água para a DOS total, na vizinhança do nível de Fermi do sistema. Isso sugere que a molécula de água provavelmente é a espécie mais propensa a receber a carga eletrônica vinda do eletrodo (mediado molecularmente pela estrutura do sítio ativo). Neste caso, a espécie OH^- (hidroxila) seria formada com mais facilidade, sob a ação do campo elétrico do eletrodo, e sendo a etapa limitante da reação de hidrólise, perpetraria que a penicilinase trabalhe mais rapidamente (ou efetivamente realize uma catálise eletricamente assistida – eletrocatalise).

Figura 21 - Densidade de estados eletrônicos (DOS) quando adicionado água ao sistema, com e sem a influência do eletrodo de ouro. ES corresponde ao sistema modelo da enzima/substrato, ESH₂O contém uma molécula de água explícita e AUESH₂O, o sistema com uma molécula de água sob influência do eletrodo de ouro.



Neste caso, observou-se que, possivelmente, a penicilinase serve apenas como modulador da reação, ou seja, ela coordena a atração da água por um de seus hidrogênios, para o sítio, pela interação aspartato-H-OH, liberando a hidroxila para ligar-se ao anel β -lactâmico e colapsá-lo, quebrando a ligação C-N do anel.

Tudo o que foi observado até o momento, dá indícios de que a penicilina G (carga negativa) seja atraída para o sítio, pela carga positiva do cofator, o qual coordenará o substrato para a reação, pois na Figura 15 tem-se uma R_{ct} , aproximadamente, 50 vezes maior na ausência do cofator, sugerindo que a reação de catálise não aconteça pelo fato do sítio repelir o substrato, pois ambos são negativos. É plausível afirmar que a densidade eletrônica, associada à aplicação de um potencial de eletrodo adequado favoreça a reação enzimática (com características redox), em uma faixa de potenciais onde se observa o laço de nucleação, conforme visto em análises de VC e evidenciado pela diminuição da R_{ct} , na EIE.

5 CONCLUSÕES

Os resultados eletroquímicos obtidos para a enzima penicilinase mostraram claramente que a atividade enzimática é dependente da ativação pelo cofator metálico e que a enzima funciona (em termos catalíticos) de forma otimizada num certo intervalo de potencial, isso comprovado/observado por resultados obtidos por técnicas eletroquímicas transientes e temporais dependentes, ou seja, pelas técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, respectivamente.

A análise computacional por dinâmica molecular, por sua vez, comprovou que, na ausência de cofator, a enzima apresentou uma região molecular (presente na sua estrutura atômica) com densidade de carga negativa elevada e que se verificou que essa região coincide com o seu sítio catalítico. Além disso, a análise de dinâmica computacional comprovou a atividade enzimática obtida experimentalmente, indicando que os íons de zinco, utilizado como cofator, são de fato atraídos para o sítio catalítico da enzima; na quantidade de, no máximo, 2 (dois) íons quando ativado, uma vez que a enzima mostra carga de 5 (cinco) elétrons (o que induz a uma densidade de carga negativa) quando a enzima está sem cofator.

Além disso, em média, 1,5 (um e meio) átomos de zinco permanecem no interior do sítio catalítico, isto é, a enzima necessita de pelo menos 1 (um) íon metálico bivalente para ativar-se, e no máximo, dois no sítio catalítico, evidenciado pelas áreas dos picos vistos nos gráficos das funções de distribuição radial. A enzima apresentou-se estável como uma holoenzima, o que indica que os íons de zinco se alojam no sítio, permanentemente, ao interagir com a penicilinase, isto é, os átomos de zinco passam a interagir com os átomos de oxigênio do aspartato e as histidinas presentes no sítio catalítico da enzima.

Adicionalmente, os resultados eletroquímicos indicaram uma reação enzimática com caráter redox, o que foi evidenciado pela variação observada na R_{ct}

para diferentes potenciais aplicados no eletrodo, evidenciando um padrão eletrocatalítico em potenciais específicos (aproximadamente, de -0,3 a -0,5 V).

A boa correlação entre os resultados de análises eletroquímicas com os cálculos preliminares de modelagem computacional permitem o investimento de maior tempo e aprimoramento dos cálculos nesta direção.

Os cálculos mecânico-quânticos utilizam o método da DFT, que permitirá elucidar as mudanças na densidade de estados eletrônicos do sistema devido a presença dos estados eletrônicos do eletrodo e permitirá inclusive elucidar melhor a influência da presença do solvente (aquoso), também sugestivo de uma reação catalítica da penicilina como um modelo de enzima da classe das hidrolases.

Estes resultados corroboram com a hipótese de que o eletrodo colabora com a reação enzimática, todavia mais estudos são necessários para investigar a influência da aplicação de potencial estacionário sobre a enzima redox.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837, 1940.

ANUSHA, J. R. et al. Effective immobilization of glucose oxidase on chitosan submicron particles from gladius of *Todarodes pacificus* for glucose sensing. **Bioelectrochemistry**, v. 104, p. 44-50, 2015.

BACTERIAL defences against penicillins. **Nature**, v. 279, n. 5711, p. 288-289, 1979.

BAPTISTA, M. G. de F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARD, A. J. et al. **Electrochemical methods**: fundamentals and applications. New York: Wiley, 1980. 718 p.

BEARD, S. J. et al. Metal ion-catalysed hydrolysis of ampicillin in microbiological growth media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 75, n. 2/3, p. 207-211, 1992.

BERETTA, M.; GRANDIN, K. **A galvanized network**: Italian-Swedish scientific relations from Galvani to Nobel. Stockholm: Royal Swedish Academy of Sciences, 2001. 221 p.

BERTONCHELI, C. D. M.; HÖRNER, R. A review on metallo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BORN, M.; OPPENHEIMER, R. Zur quantentheorie der molekeln. **Annalen der Physik**, v. 389, n. 20, p. 457-484, 1927.

BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 411-417, 2013.

BUENO, P. R. et al. A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10920-10926, 2013.

BUSSI, G.; ZYKOVA-TIMAN, T.; PARRINELLO, M. Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 130, n. 7, p. 074101/1-074101/9, 2009.

CAFIERO, L. Review: primi principi metafisici della scienza della natura by Emanuele Kant; Ludovico Geymonat; Luigi Galvani. **Rivista Critica di Storia della Filosofia**, v. 14, n. 4, p. 470-472, 1959.

CALVER, T. **75 years of penicillin in people**. Image. Disponível em: <<http://www.ox.ac.uk/news/science-blog/75-years-penicillin-people>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

CARFI, A. et al. The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 20, p. 4914-4921, 1995.

CARVALHO, I. et al. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CARVALHO, L. A. de; ANDRADE, A. R. de; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

CITRI, N.; ZYK, N. The interaction of penicillinase with penicillins. IV. Structural aspects of catalytic and non-catalytic interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 99, n. 3, p. 427-441, 1965.

COUSIN, E. The giving tree: a modern-day parable of mutual responsibility, **Michigan Law Review**, v. 113, p. 767-776, 2015.

COVENEY, P. V.; FOWLER, P. W. Modelling biological complexity: a physical scientist's perspective. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 2, n. 4, p. 267-280, 2005.

CUMMINGS, B. **Kingdom fungi**. Ecological and commercial importance of fungi: *Penicillium*. Image. Disponível em: <<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/31.21.jpg>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DAWIDOWICZ, L. S. **The war against the Jews: 1933-1945**. New York: Holt, Rinehart and Winston, [1975]. 460 p.

EICHINGER, M. et al. A hybrid method for solutes in complex solvents: density functional theory combined with empirical force fields. **The Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 21, p. 10452-10467, 1999.

EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. The nose-hoover thermostat. **The Journal of Chemical Physics**, v. 83, n. 8, p. 4069-4074, 1985.

FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.

FERNANDES, F. C. B. et al. Optimized diagnostic assays based on redox tagged bioreceptive interfaces. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12137-12144, 2015.

FERRER, S. et al. Understanding the different activities of highly promiscuous MbtI by computational methods. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 10, p. 3482-3489, 2012.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Three decades of the class A beta-lactamase acyl-enzyme. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 401-407, 2009.

FLEMING, A. **Penicillin, its practical application**. Philadelphia: Blakiston, 1946. 380 p.

FLEMING, B. D. et al. Detailed analysis of the electron-transfer properties of azurin adsorbed on graphite electrodes using DC and large-amplitude Fourier transformed AC voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 17, p. 6515-6526, 2007.

GALTON, F. **Inquiries into faculty human and its development**. London: Macmillan, 1883. 387 p.

GAYNES, R. P. **Germ theory: medical pioneers in infectious diseases**. Washington, DC: ASM Press, 2011. 329 p.

GNAIGER, E. et al. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 6, p. 583-596, 1995.

GOLDMAN, R.; KEDEM, O.; KATCHALSKI, E. Papain-collodion membranes. II. Analysis of the kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes. **Biochemistry**, v. 7, n. 12, p. 4518-4532, 1968.

GOLEMI-KOTRA, D. et al. The importance of a critical protonation state and the fate of the catalytic steps in class A beta-lactamases and penicillin-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34665-34673, 2004.

GÓMEZ-ARIZA, J. et al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1, p. 15-22, 2004.

GONÇALVES, L. M. et al. Penicillinase-based amperometric biosensor for penicillin G. **Electrochemistry Communications**, v. 38, p. 131-133, 2014.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Density functional theory. **Physical Review B**, v. 136, p. 864-876, 1964.

HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712-725, 2006.

HU, L.; SÖDERHJELM, P.; RYDE, U. Accurate reaction energies in proteins obtained by combining QM/MM and large QM calculations. **Journal of Chemical Theory and Computational**, v. 9, n. 1, p. 640-649, 2013.

HUGHES, W. H. **Alexander Fleming and penicillin**. London: Priory Press, 1974. 96 p.

HUXLEY, A. **Admirável mundo novo**. São Paulo: Globo, 1993. 242 p.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KARLSSON, E. B. The nobel prize in physics. In: LEVINOVITZ, A. W.; RINGERTZ, N. **The Nobel prize: the first 100 years**. London: Imperial College Press, 2001. p. 31-69.

KARSISIOTIS, A. I.; DAMBLON, C. F.; ROBERTS, G. C. Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid. **Biochemical Journal**, v. 456, n. 3, p. 397-407, 2013.

KATCHALSKI, E.; SILMAN, I.; GOLDMAN, R. Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 34, p. 445-536, 2006.

KLEMES, Y.; CITRI, N. Preparation and properties of an immobilized derivative of penicillinase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n. 5, p. 897-905, 1979.

KNECHT, H. et al. Effects of β -lactam antibiotics and fluoroquinolones on human gut microbiota in relation to *Clostridium difficile* associated diarrhea. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0089417.

KNOX, J. R.; MOEWS, P. C.; FRERE, J. M. Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. **Chemical Biology**, v. 3, n. 11, p. 937-947, 1996.

LAMOTTE-BRASSEUR, J. et al. The structures and catalytic mechanisms of active-site serine beta-lactamases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 12, p. 189-230, 1994.

LANCZOS, C. **The Einstein decade (1905-1915)**. London: Elek, 1974. 230 p.

LASIA, A. Impedance of porous electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 397, n. 1, p. 27-33, 1995.

LEACH, A. R. **Molecular modelling**: principles and applications. 2nd ed. Harlow: Prentice Hall, 2001. 744 p.

LEWIS, E. R.; WINTERBERG, K. M.; FINK, A. L. A point mutation leads to altered product specificity in beta-lactamase catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 2, p. 443-447, 1997.

LUDOVICI, L. J. **Fleming, discoverer of penicillin**. London: Dakers, [1952]. 223 p.

LUZ, R. A. et al. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.

MARCUS, S. Frankenstein: myths of scientific and medical knowledge and stories of human relations. **The Southern Review**, v. 38, n. 1, p. 188-201, 2002.

MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. pKa, MM, and QM studies of mechanisms of beta-lactamases and penicillin-binding proteins: acylation step. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1559-1576, 2002.

MAUROIS, A. **The life of Sir Alexander Fleming**: discover of penicillin. New York: E. P. Dutton, [1959]. 293 p.

MIGUEL, R. B. et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase CDK1 by oxindolimine ligands and corresponding copper and zinc complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1205-1217, 2015.

MILLER, A. I. **Albert Einstein's special theory of relativity**: emergence (1905) and early interpretation (1905-1911). London: Addison-Wesley, 1981. 466 p.

MILLER, I. Topics in bioelectrochemistry and bioenergetics. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 83, n. 1, p. 184-185, 1977.

MOSBACH, K. Immobilized enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 1980.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1119-1138, 2009.

NECKEL, I. T. **Crescimento e morfologia de ligas de $\text{Co}_x\text{Fe}_{100-x}$ eletrodepositadas sobre Si (111) Tipo-n**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, n. 2, p. 255-268, 1984.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PARENT, A. Giovanni Aldini: from animal electricity to human brain stimulation. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 576-584, 2004.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182-7190, 1981.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 18, p. 3865-3868, 1996.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955), da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras: História Porto**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PLACZEK, S. et al. BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D380-D388, 2017.

PLANCK, M. **The theory of heat radiation**. New York: Dover Publ., 1959. 224 p.

PLEIN, L. C. Popularizing biotechnology: the influence of issue definition. **Science, Technology & Human Values**, v. 16, n. 4, p. 474-490, 1991.

PLOTNITSKY, A. **Epistemology and probability**: Bohr, Heisenberg, Schrodinger, and the nature of quantum-theoretical thinking. New York: Springer, c2010. 402 p.

POPLE, J. A.; GILL, P. M.; JOHNSON, B. G. Kohn-Sham density-functional theory within a finite basis set. **Chemical Physics Letters**, v. 199, n. 6, p. 557-560, 1992.

PRADO, T. M. D. **Desenvolvimento de um biossensor para a detecção de antibióticos β -lactâmicos no leite cru**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

PRATT, A. C. et al. Structural and computational dissection of the catalytic mechanism of the inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural Biology**, v. 192, n. 1, p. 76-87, 2015.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 75, p. 845-851, 2013.

RANDO, R. R. On the mechanism of action of antibiotics which act as irreversible enzyme inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 11/12, p. 1153-1160, 1975.

ROSALLES, D.; GÓMEZ-ARIZA, J. L.; ASUERO, A. G. Spectrophotometric determination of palladium in catalysts and carbenicillin with 1-(2-pyridylmethylidene)-5-(salicylidene)-thiocarbohydrazone. **Analyst**, v. 111, n. 4, p. 449-453, 1986.

ROWLAND, J. **The penicillin man**: the story of Sir Alexander Fleming. London: Butterworth Press, 1957. 155 p.

SCHROËN, C. G. et al. Modelling of the enzymatic kinetically controlled synthesis of cephalixin: influence of diffusion limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 3, p. 331-340, 2002.

SERWAY, R. A.; JEWETT, J. W. Jr. **Princípios de física**. São Paulo: Cengage Learning, 2007. v. 2. Movimento ondulatório e termodinâmica. 344 p.

SHI, W.; CHANCE, M. R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 144-148, 2011.

SILVA, F. A. **Selênio em tilápia do Nilo utilizando eletroforese em gel e espectrometria atômica**. 2009. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

SKLYARENKO, A. V. et al. Enzymatic synthesis of acidic β -lactams (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 627-640, 2015.

SMITH, D. M. A. et al. Force-field development and molecular dynamics of [NiFe] hydrogenase. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 6, p. 2103-2114, 2012.

SMITH, M. D. et al. Force-field induced bias in the structure of A β 21-30: a comparison of OPLS, AMBER, CHARMM, and GROMOS force fields. **Journal of Chemical Information and Modelling**, v. 55, n. 12, p. 2587-2595, 2015.

SOMAVARAPU, A. K.; KEPP, K. P. The dependence of amyloid- β dynamics on protein force fields and water models. **ChemPhysChem**, v. 16, n. 15, p. 3278-3289, 2015.

SPATARU, N.; LE HELLOCO, J.-G.; DURAND, R. A study of RuO₂ as an electrocatalyst for hydrogen evolution in alkaline solution. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 26, n. 4, p. 397-402, 1996.

SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 442-465, 2005.

TAYLOR, T. T. **Mechanics**: classical and quantum. New York: Plenum Press, 1976. 198 p.

TICIANELLI, E.; GONZALEZ, E. **Eletroquímica**. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2005. 220 p.

TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 1, p. 117-120, 2008.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VAN BENSCHOTEN, J. J. et al. Cyclic voltammetry experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 772, 1983.

VAN OVERWALLE, G. et al. Models for facilitating access to patents on genetic inventions. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 2, p. 143-154, 2006.

VERKHOVTSEVA, T. P.; LUR'E, L. M.; LEVITOV, M. M. Various patterns in the biosynthesis of penicillins and penicillin-like substances. **Antibiotiki**, v. 17, n. 9, p. 786-790, 1972.

VERLET, L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98-103, 1967.

VERLET, L. Computer "experiments" on classical fluids. II. Equilibrium correlation functions. **Physical Review**, v. 165, n. 1, p. 201-214, 1968.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200-1211, 1980.

VU, H.; NIKAIDO, H. Role of beta-lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a beta-lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum beta-lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 3, p. 393-398, 1985.

WANG, J. et al. One-step electropolymeric co-immobilization of glucose oxidase and heparin for amperometric biosensing of glucose. **Analyst**, v. 125, n. 8, p. 1431-1434, 2000.

WANG, Y.; SHEN, Y. Is it possible for Fe^{2+} to approach protoporphyrin IX from the side of Tyr-13 in *Bacillus subtilis* ferrochelatase? An answer from QM/MM study. **Journal of Molecular Modelling**, v. 19, n. 2, p. 963-971, 2013.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Folding and stability of helical proteins: carp myogen. **Journal of Molecular Biology**, v. 106, n. 2, p. 421-437, 1976a.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 103, n. 2, p. 227-249, 1976b.