



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

EMÍLIA PÉCORÁ DE BARROS

ESTUDO COMPUTACIONAL DA SOLVATAÇÃO E ANISOTROPIA DE
FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO DE SUBTILISINA CARLSBERG EM
MISTURAS DE ÁGUA E GLICEROL

CAMPINAS

2015



EMÍLIA PÉCORÁ DE BARROS

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA SOLVATAÇÃO E ANISOTROPIA DE
FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO DE SUBTILISINA CARLSBERG EM
MISTURAS DE ÁGUA E GLICEROL**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra
em **QUÍMICA**, na área de **FÍSICO-
QUÍMICA**

Orientador: PROF. DR. LEANDRO MARTÍNEZ

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA EMÍLIA PÉCORÁ DE BARROS, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LEANDRO MARTÍNEZ

A handwritten signature in blue ink, reading "Leandro Martínez", is written over a horizontal line. The signature is cursive and stylized.

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: Não se aplica
Nº processo: Não se aplica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

B278e Pécora de Barros, Emília, 1991-
Estudo computacional da solvatação e anisotropia de fluorescência resolvida no tempo de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol / Emília Pécora de Barros. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Leandro Martínez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Dinâmica molecular. 2. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo. 3. Subtilisina Carlsberg. 4. Solvatação. 5. Glicerol. I. Martínez, Leandro. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Computational study of the solvation and time-resolved fluorescence anisotropy of subtilisin Carlsberg in water and glycerol mixtures

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics
Time-resolved fluorescence anisotropy
Subtilisin Carlsberg
Solvation
Glycerol

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Leandro Martínez [Orientador]
Milton Taidi Sonoda
Rogério Custodio

Data de defesa: 14-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

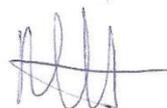
Prof. Dr. Leandro Martínez (Orientador)



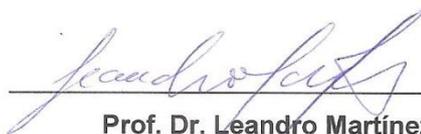
Prof. Dr. Milton Taidi Sonoda (DF-UFTM)



Prof. Dr. Rogério Custodio (IQ-UNICAMP)



Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **EMÍLIA
PÉCORA DE BARROS**, aprovada pela Comissão
Julgadora em 14 de agosto de 2015.



Prof. Dr. Leandro Martínez
(Presidente da Banca)

*“É bom ter um fim para a jornada,
mas é a jornada que importa, no fim”*

- Ernest Hemingway

Agradecimentos

Agradeço ao Leandro, por estar sempre disponível para discussões e explicações, e por demonstrar um gosto tão grande por orientar. Obrigada pelo ensino e paciência.

Agradeço aos colegas de laboratório, Mariana, Luciano, Gabriel, Tayane, Ivan e Álvaro, pela companhia e pelas paradas para cafézinhos no meio da tarde, e um “obrigada” especial à Mariana, Luciano e ao Gabriel por me ajudarem em diversos momentos durante a realização deste trabalho.

Obrigada ao pessoal da Comissão de Pós-Graduação do IQ, por estarem sempre disponíveis para tirar minhas dúvidas e ajudarem com os detalhes burocráticos junto à DAC.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Araújo e Celso, por me ensinarem desde pequena, com seus exemplos, a importância da educação e da dedicação para a realização de um sonho. Obrigada também aos meus irmãos, Paula e Tomás, pelos momentos de descontração quando o cansaço se abatia.

Obrigada ao Everton, meu namorado, agora noivo(!), que desde o ensino médio permanece ao meu lado, me incentivando a dar o meu melhor. Obrigada pela paciência ao lidar com meu *stress*, por sua companhia em todos os momentos, e por me ajudar com diversos detalhes importantíssimos na elaboração desta dissertação.

A toda minha família e amigos, que sempre estiveram presentes.

Resumo

O emprego de enzimas em meios orgânicos tem atraído grande interesse acadêmico e industrial. Nesses solventes, as enzimas podem sofrer alterações vantajosas nas suas propriedades, como mudanças na atividade catalítica, seletividade e estabilidade térmica. A protease subtilisina Carlsberg (SC) é uma enzima que apresenta solubilidade e atividade em variados solventes orgânicos. Por essa razão, tem sido estudada em meios não-convencionais, como misturas de água e glicerol. O glicerol apresenta importantes efeitos estabilizadores na atividade e estabilidade térmica de proteínas. A compreensão da estrutura e dinâmica da solvatação de enzimas nos meios não-convencionais é importante, e diversas técnicas experimentais têm sido empregadas na sua investigação. A solvatação de SC em misturas de água e glicerol foi estudada por anisotropia de fluorescência resolvida no tempo. Simulações de Dinâmica Molecular permitem a investigação da dinâmica reorientacional do fluoróforo, possibilitando assim a interpretação em nível microscópico dos dados experimentais. Neste trabalho, a solvatação e anisotropia de fluorescência resolvida no tempo de subtilisina Carlsberg foram investigadas usando simulações de dinâmica molecular da proteína em soluções de glicerol em água com diferentes concentrações. Os resultados indicaram a concentração preferencial de moléculas de água na superfície enzimática em qualquer proporção de solução. No entanto, apesar da leve estabilização das ligações de hidrogênio proteína-água e redução da energia livre da água na primeira camada de solvatação, ocorre substancial substituição de água por glicerol na superfície da proteína com aumento da concentração de glicerol. A interação glicerol-proteína possivelmente está portanto relacionada com o efeito estabilizador do glicerol. A dinâmica reorientacional do triptofano fluorescente obtida nas simulações não é consistente com os decaimentos de anisotropia experimentais, o que evidencia uma inconsistência entre a estrutura cristalográfica de SC e a estrutura predominante observada em solução. Aqui, sugerimos que esta inconsistência pode ser resolvida se o estudo de fluorescência experimental seleciona conformações do triptofano com dinâmicas reorientacionais rápidas, enquanto que as conformações cristalográficas, de dinâmica lenta, são suprimidas.

Abstract

The use of enzymes in organic media has attracted great academic and industrial interest. In these solvents, enzymes can undergo advantageous alterations in their properties, such as changes in catalytic activity, selectivity and thermal stability. The protease subtilisin Calrsberg (SC) is an enzyme that displays considerable solubility and activity in various organic solvents. Because of that, it has been studied in non-conventional media, such as water and glycerol mixtures. Glycerol has important stabilizing effects in protein activity and thermal stability. The comprehension of solvation structure and dynamics of enzymes in non-conventional media is important, and several experimental techniques have been employed in their investigation. The solvation of SC in water and glycerol mixtures was studied through time-resolved fluorescence anisotropy. Molecular Dynamics simulations allow the investigation of the reorientational dynamics of the fluorophore, making it possible the interpretation at the microscopic level of the experimental data. In this work, the solvation and time-resolved fluorescence anisotropy of subtilisin Carlsberg were investigated using molecular dynamics simulations of the protein in solutions of glycerol in water at varying concentrations. The results indicated the preferential concentration of water molecules in the enzymatic surface in any solution concentration. However, despite the slight stabilization of protein-water hydrogen bonds and the reduction of the water free energy in the first solvation shell, there is substantial substitution of water by glycerol in the protein surface with increase in glycerol concentration. The glycerol-protein interaction is thus possibly related to the stabilizing effect of glycerol. The reorientational dynamics of the fluorescent tryptophan obtained in the simulations is not consistent with the experimental anisotropy decays, which evidence an inconsistency between the crystallographic structure of SC and the predominant structure seen in solution. Here, we suggest that this inconsistency may be solved if the experimental fluorescence study selects only tryptophan conformations with quick dynamics, while the crystallographic conformations, of slow dynamics, are suppressed.

Lista de Figuras

- 1.1. Mecanismos usuais utilizados para promover ativação enzimática em meios contendo solventes orgânicos..... p. 21
- 1.2. Mecanismos propostos para os efeitos de ativação e estabilização de enzimas em misturas com osmólitos: (a) Hidratação preferencial (mecanismo indireto) e (b) Exclusão de água (mecanismo direto)..... p. 24
- 1.3. Estrutura da enzima subtilisina Carlsberg, com tríade catalítica (laranja) e resíduo de triptofano (azul) destacados..... p. 25
- 2.1. Esquema dos movimentos intramoleculares sobre os quais são definidos os potenciais das interações intramoleculares: (a) estiramento das ligações, (b) deformação angular e (c) torção diedral..... p. 28
- 2.2. Representação da torção imprópria, ou deformação-fora-do-plano..... p. 30
- 2.3. Representação da molécula de glicerol utilizada nas simulações. Carbonos em ciano, oxigênios em vermelho e hidrogênios em branco. Hidrogênios das hidroxilas são indicados como H*..... p. 40
- 4.1. Funções de distribuição água-água para diferentes concentrações de solução de glicerol/água..... p. 45
- 4.2. Funções de distribuição glicerol-glicerol para diferentes concentrações de solução de glicerol/água..... p. 46
- 4.3. Número médio de ligações de hidrogênio realizadas com a proteína..... p. 47
- 4.4. Fração de observação em função do tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água..... p. 49

- 4.5. Fração de observação das ligações de hidrogênio proteína-água com tempo de sobrevivência menor do que 1 ou entre 1 e 2 ps..... p. 50
- 4.6. Fração de observação em função do tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água para ligações com maior tempo de sobrevivência..... p. 50
- 4.7. Funções de distribuição proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução..... p. 52
- 4.8. Perfis de energia livre da interação proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução..... p. 52
- 4.9. Detalhe dos perfis de energia livre da interação proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução..... p. 53
- 4.10. (a) Funções de distribuição proteína-glicerol e (b) Perfil de energia livre da interação proteína-glicerol para as diferentes proporções de glicerol em solução..... p. 55
- 4.11. Detalhes dos perfis de energia livre da interação proteína-água e proteína-glicerol para os diferentes tipos de resíduos..... p. 56
- 4.12. Detalhes das funções de distribuição (a) proteína-água e (b) proteína-glicerol para os diferentes tipos de resíduos..... p. 58
- 4.13. Variação no número médio de moléculas de solvente a até 3 Å de cada resíduo entre 0 e 33% glicerol (m/m)..... p. 59
- 4.14. Aumento no número de moléculas de glicerol a até 3 Å em função da redução do número de moléculas de água à mesma distância de cada resíduo entre 0 e 33% glicerol (m/m). A reta representa a tendência comum para os resíduos, desconsiderando os valores discrepantes..... p. 60
- 4.15. Representação molecular de alguns dos valores discrepantes da Figura 4.14. Na imagem superior esquerda o triptofano é representado em vermelho e uma molécula de glicerol é destacada. Na imagem inferior esquerda, são mostrados os resíduos Thr33, Gly34, Asp60 e Lys94. Água (azul) é representada a até 5 Å dos resíduos e glicerol (laranja) a até 10 Å..... p. 61

- 4.16. Duas vistas de SC, destacando a variação no número de moléculas de água (ΔN água, imagens à esquerda) e glicerol (ΔN glicerol, imagens centrais) a até 3 Å de cada resíduo. Nas imagens à direita são indicadas as polaridades dos resíduos: carregados em azul e vermelho, hidrofóbicos em branco e polares em verde p. 62
- 4.17. Número médio de moléculas de glicerol até o segundo mínimo de energia livre em função da concentração. As linhas constantes representam a extrapolação para condição sem saturação..... p. 63
- 4.18. Isotermas de adsorção linearizadas do glicerol na superfície da proteína segundo os modelos de (a) Langmuir e (b) Freundlich..... p. 66
- 4.19. Dados de adsorção do glicerol das simulações e isotermas de adsorção previstas pelos modelos de Langmuir e Freundlich. As isotermas foram construídas utilizando os parâmetros calculados na forma linear..... p. 67
- 5.1. Representação esquemática dos eventos envolvidos após excitação de uma sonda fluorescente por luz polarizada. As flechas representam o vetor momento de dipolo de transição de moléculas do fluoróforo presentes em uma solução..... p. 71
- 5.2. Representação do triptofano e dos momentos de dipolo de absorção (preto) e emissão (vermelho) em 0% glicerol. O momento de dipolo de absorção corresponde ao momento de dipolo de transição associado à excitação ao estado 1L_a . O momento de dipolo de emissão foi definido em função da anisotropia inicial, Eq. 5.4 p. 73
- 5.3. Visualização do bolso ocupado pelo triptofano (em laranja) na conformação cristalográfica usando representação *surface*. Resíduos apolares são mostrados em cinza, polares-e-não-carregados em verde e carregados em vermelho p. 75
- 5.4. Representação das conformações do triptofano na estrutura cristalográfica de SC (roxo) e na estrutura gerada a partir de simulação a 815K em vácuo com a proteína fixa (ciano)..... p. 75
- 5.5. (a) Representação do sistema de triptofano (verde) em 9% glicerol/água e (b) Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo do triptofano livre em solução calculada a partir das simulações de dinâmica molecular (coloridas) e experimentais (pretas) p. 77

- 5.6. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular..... p. 78
- 5.7. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular (preto) e experimentais (azul)..... p. 79
- 5.8. Representação das conformações do triptofano amostradas nas simulações: (a) Conformação A, triptofano exposto ao solvente e (b) Conformação B, cadeia lateral do triptofano encaixada em bolso apolar com somente uma das laterais dos anéis exposta ao solvente..... p. 80
- 5.9. Correlação da mobilidade do triptofano com o decaimento da anisotropia a 29% glicerol (m/m). Os decaimentos são associados à dinâmica do resíduo de triptofano (destacado em vermelho e azul) nas respectivas simulações. Nas imagens de A a F são mostradas as posições do triptofano a cada 0,1 ns de simulação. A escala de cores indica a evolução temporal de sua posição..... p. 81
- 5.10. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular. Curvas correspondentes às simulações nas quais a conformação A é amostrada exclusivamente são destacadas, enquanto curvas correspondentes à simulações no qual ocorre amostragem de B são mostradas em cinza p. 82
- 5.11. Representação da distância triptofano-alanina utilizada como medida indireta da exposição do triptofano ao solvente. São mostradas distâncias típicas quando triptofano possui **(a)** conformação A e **(b)** conformação B. Em **(c)** é indicada a numeração dos carbonos do anel indol do triptofano..... p.83
- 5.12. Anisotropia de fluorescência a 0,2 ns em função do tempo de exposição do triptofano ao solvente, na conformação A. Simulações nas quais A é amostrado exclusivamente são mostradas com tempo de exposição de 20 ns, tempo total das simulações. As retas tracejadas são utilizadas para mostrar a tendência dos dados..... p. 84
- 5.13. Descorrelação da anisotropia de fluorescência devido à dinâmica rotacional da proteína como um todo. O cálculo foi realizado considerando uma hélice de SC, em destaque..... p. 85
- 5.14. Anisotropia inicial subtraída da anisotropia de fluorescência a 0,2 ns, em função do tempo de exposição do triptofano ao solvente, na conformação A..... p. 86

- 5.15. *Snapshot* de uma trajetória que mostra o glicerol (carbonos representados em ciano, oxigênio em vermelho e hidrogênios em branco) ocupando o bolso hidrofóbico e impedindo a inserção do triptofano, representado em vermelho p. 88
- 5.16. (a) Representação do deslocamento de densidade eletrônica na cadeia lateral do triptofano durante excitação ao estado S_1 ; (b) Moléculas de água próximas ao triptofano em um *frame* de uma simulação, indicando possível estabilização do estado excitado..... p. 89
- 5.17. Representação do resíduo de triptofano (verde) e dos resíduo de asparagina e tirosina (vermelhos), possíveis supressores da fluorescência da conformação B. Outros resíduos supressores de fluorescência próximos estão representados em laranja..... p. 91
- 5.18. Representação dos resíduos de triptofano e tirosina. As distâncias entre o hidrogênio da hidroxila da tirosina e os carbonos 2, 4 e 7 do anel indol são indicadas..... p. 92
- 5.19. (a) Representação da distância triptofano-glutamato; (b) e (c) representações de interações entre triptofano e asparagina com resíduos laterais ou moléculas de água que promovam estabilização do estado pós-transferência de carga após supressão da fluorescência do triptofano por asparagina..... p. 93

Lista de Tabelas

2.1.	Composição das misturas de glicerol/água e dimensões das caixas	p. 40
2.2.	Cargas parciais e tipo dos átomos da molécula de glicerol	p. 40
4.1.	Número de ligações de hidrogênio realizadas pela proteína.....	p. 48
4.2.	Parâmetros de Langmuir e de Freundlich para adsorção do glicerol na proteína.....	p. 65
5.1.	Número de simulações que amostram a conformação B do triptofano de SC.....	p. 87

Sumário

1. Enzimologia em meios não tradicionais	p. 18
1.1. Efeito do solvente nas propriedades enzimáticas.....	p. 20
1.2. Ativação enzimática.....	p. 21
1.3. Osmólitos estabilizadores.....	p. 22
1.4. Mecanismos de estabilização de proteínas.....	p. 23
1.5. Subtilisina Carlsberg.....	p. 25
2. Simulações de dinâmica molecular	p. 27
2.1. Campos de força e potenciais de interação.....	p. 28
2.2. Posições e velocidades iniciais.....	p. 31
2.3. Equações de movimento.....	p. 32
2.3.1. <i>Algoritmo Verlet</i>	p. 33
2.3.2. <i>Algoritmo velocity-Verlet</i>	p. 34
2.4. Etapas da simulação.....	p. 35
2.4.1. <i>Minimização da energia</i>	p. 36
2.4.2. <i>Equilibração</i>	p. 36
2.4.3. <i>Produção</i>	p. 36
2.5. Ensembles e controle das condições termodinâmicas.....	p. 37
2.5.1. <i>Controle da temperatura</i>	p. 37
2.5.2. <i>Controle da pressão</i>	p. 38
2.6. Interações de longo alcance.....	p. 38
2.7. Detalhes das simulações.....	p. 39

3. Objetivos	p. 42
4. Solvatação de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol	p. 43
4.1. Metodologia.....	p. 43
4.2. Resultados.....	p. 44
4.2.1. <i>Simulação dos solventes</i>	p. 44
4.2.2. <i>Solvatação de subtilisina Carlsberg</i>	p. 46
4.2.3. <i>Adsorção de glicerol na superfície proteica</i>	p. 63
4.3. Conclusões.....	p. 68
5. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol	p. 70
5.1. Metodologia.....	p. 70
5.1.1. <i>A técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo</i>	p. 70
5.1.2. <i>O estudo experimental de SC em água e glicerol</i>	p. 73
5.1.3. <i>Preparo das configurações iniciais das simulações</i>	p. 74
5.2. Resultados.....	p. 76
5.2.1. <i>Anisotropia do triptofano livre em solução</i>	p. 76
5.2.2. <i>Anisotropia de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol</i>	78
5.2.3. <i>Influência do ambiente na fluorescência do triptofano</i>	p. 88
5.3. Conclusões.....	p.94
6. Conclusões finais	p. 95
Referências bibliográficas	p. 97

Capítulo 1

Enzimologia em meios não tradicionais

Enzimas atraem grande interesse em aplicações industriais pela habilidade de conduzirem transformações químicas com regioquímica e estereoquímica definidas, em condições de reação suaves¹. Por resultarem da evolução em organismos vivos, essas macromoléculas foram tradicionalmente estudadas e utilizadas em meio aquoso. Nas últimas três décadas, no entanto, o emprego de enzimas em solventes orgânicos anidros ou em misturas binárias com água tem desafiado convenções e atraído grande interesse industrial e acadêmico. Nesses meios, surpreendentemente, essas macromoléculas continuam ativas e podem apresentar propriedades muito distintas das que possuem em água²⁻⁴. Diversos solventes orgânicos são utilizados, incluindo, mais recentemente, líquidos iônicos⁵. Nesses solventes, as enzimas são utilizadas, por exemplo, na síntese de peptídeos e ésteres, transesterificação e síntese enantiosseletiva⁶⁻⁸. As vantagens decorrentes do emprego de meios contendo solventes orgânicos para catálise enzimática incluem alterações na atividade catalítica, supressão de atividade não desejável e alteração na especificidade enzimática, tanto em termos de regio e enantioseletividade como especificidade do substrato. Há também a possibilidade de solubilização de substratos não polares e redução de contaminação microbiana^{4,9,10}.

O uso de solventes variados pode alterar, por exemplo, o equilíbrio termodinâmico, possibilitando realização de reações desfavoráveis em água, dado que reações nas quais a água atua como substrato tendem a ser suprimidas¹¹. Algumas proteases, por exemplo, apresentam supressão da hidrólise da ligação peptídica, chamada de aminólise, quando em meios orgânicos anidros, ou com concentrações variadas de determinados solventes como tetrahidrofurano, dioxano, glicerol e acetonitrila^{12,13}. Nesses meios, a atividade de esterase torna-se predominante, possibilitando a formação de ligações peptídicas com estereoquímica definida, a partir de ésteres e aminas¹⁴. Essa nova atividade caracteriza uma alternativa interessante à rota sintética de produção de peptídeos¹⁵. Em um estudo de Holmandberg e Laskowski, por exemplo, foi verificado que uma protease da família das subtilisinas,

subtilisina BPN', promove a conexão entre dois fragmentos de ribonuclease S gerando ribonuclease A em soluções aquosas de glicerol, catalisando a formação da ligação peptídica na mesma região na qual promove hidrólise em meio 100% aquoso¹⁶. É surpreendente que a atividade de esterase nesse caso aumenta consistentemente com o aumento da concentração de glicerol, até atingir um rendimento de 50%, em 95% (v/v) de glicerol. A religação de peptídeos na mesma região da aminólise foi verificada também com outras proteases em meios ricos em glicerol, como com tripsina¹⁷, que foi utilizada em uma etapa na semisíntese do hormônio de insulina humano¹⁸.

A enantioseletividade enzimática também pode mudar drasticamente e até ser revertida em meios ricos em solvente orgânico, sendo completamente dependente do solvente utilizado. A modulação da seletividade enzimática, ou de outras propriedades, pela escolha do solvente é chamada de “engenharia por solvente”, em comparação ao método tradicional de engenharia de proteínas¹⁹. Um exemplo dessa dependência da enantioseletividade com o meio é dado pela lipase de *Pseudomonas sp*, que em ciclohexano promove hidrólise enantioseletiva de ésteres com esteroquímica R, resultando em produto com mais de 89% de excesso enantiomérico. Já em éter diisopropílico, o éster com conformação S é hidrolisado em uma reação com 91% de excesso enantiomérico¹¹.

Não somente a enantioseletividade da reação pode ser alterada, como também sua regioseletividade. Tal propriedade foi verificada na hidrólise de albumina de soro bovino (BSA) por subtilisina Carlsberg em 99% glicerol²⁰. Em água, os fragmentos isolados corresponderam à sequência de resíduos 1-302, 309-583 e 309-515, enquanto que, em glicerol, os fragmentos identificados corresponderam aos resíduos 1-288 e 292-583.

Diversas enzimas, entre elas quimiotripsina, lisozima e ATPase, também apresentam a vantagem adicional de terem maior termoestabilidade em solventes orgânicos¹¹. Surpreendentemente, em alguns casos raros, a velocidade da reação em misturas orgânicas é maior do que em tampão aquoso²¹. Em um desses casos, um mutante termoestável da lipase de *Bacillus subtilis* mostrou atividade máxima de 1.5 a 3 vezes superior à em água em 20% (v/v) DMSO, isopropanol e metanol²².

O emprego de enzimas nesses meios não tradicionais também acarreta desvantagens, compreensíveis se considerarmos que proteínas foram naturalmente otimizadas para atuarem em meio aquoso. As principais desvantagens, observadas na grande maioria dos casos, são

reduções na estabilidade e atividade enzimática. A lipase mutada de *Bacillus subtilis*, por exemplo, apresenta redução na temperatura de desnaturação em relação à água em todos os solventes orgânicos estudados: DMSO, isopropanol, metanol, acetona, acetonitrila e DMF.²²

1.1. Efeito do solvente nas propriedades enzimáticas

Diversas hipóteses são levantadas na literatura para racionalizar as distintas características exibidas pelos biocatalizadores em meios com solventes orgânicos. Inicialmente, Laane *et al.* propuseram que a atividade relacionava-se diretamente com a hidrofobicidade do solvente²³. Isso foi sugerido pois muitas misturas de água com solventes orgânicos polares, mas menos polares que a água, tendem a ser desnaturantes, provavelmente por removerem moléculas de água essenciais da superfície proteica¹⁹, ou por causarem desestabilização do núcleo hidrofóbico⁹, devido a maior facilidade de partição na superfície polar e capacidade de penetrar no interior da proteína². De fato, estudos de dinâmica molecular mostram que adição de solventes orgânicos leva a uma redução no número de moléculas de água na primeira camada de solvatação das proteínas²⁴. No entanto, a inativação enzimática também é verificada em solventes apolares, e atribuída à redução da flexibilidade conformacional, estabilização termodinâmica do substrato, redução da energia livre de ligação enzima-substrato ou desestabilização do estado de transição, caso seja polar^{9,25}. Essas observações indicam que outras propriedades além de polaridade devem ser responsáveis pela alteração da estabilidade.

Outros estudos sugerem uma relação entre atividade catalítica da proteína e atividade de água do meio¹¹. Além disso, a relação da enantioseletividade enzimática com a flexibilidade e com alterações estruturais no sítio ativo foi levantada por Broos *et al.*²⁶. No entanto, as explicações tendem a ser específicas para as enzimas de cada estudo, não sendo consistentes para outras enzimas e solventes, o que limita suas capacidades preditivas^{11,27}. Observa-se que o comportamento enzimático depende de diversas variáveis, incluindo a enzima em si, o solvente orgânico, a hidratação do meio e a interação diferencial da proteína com os co-solventes²⁸. Por isso, o desenvolvimento de uma teoria universal do comportamento enzimático em função de propriedades físico-químicas do solvente orgânico continua elusivo²⁹.

1.2. Ativação enzimática

Há diversas propostas sendo desenvolvidas a fim de garantir maior estabilidade e atividade enzimática e possibilitar a exploração da grande versatilidade de enzimas em meios orgânicos. Esses processos são chamados de ativação enzimática²⁵. As propostas podem ser agrupadas em três grupos: engenharia de proteínas, imobilização proteica e alteração do meio⁴. Elas são esquematizadas na Figura 1.1.

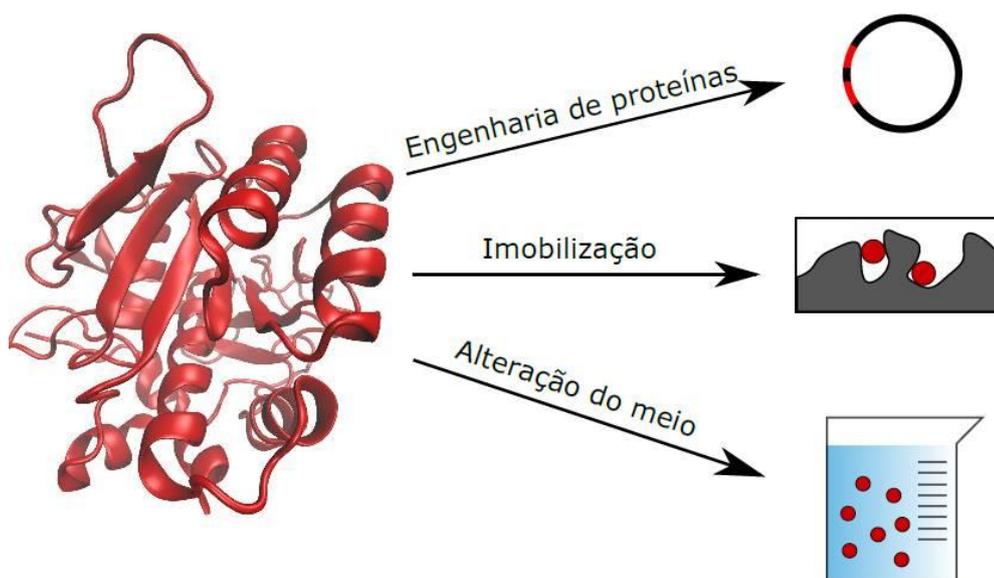


Figura 1.1. Mecanismos usuais utilizados para promover ativação enzimática em meios contendo solventes orgânicos.

Atividade e estabilidade mais elevadas em meios orgânicos podem ser promovidas por meio de mutações, principalmente que levem a alteração na distribuição de cargas na superfície da proteína³. Em geral, maiores estabilidade e atividade são verificadas quando resíduos carregados da superfície são mutados para resíduos hidrofóbicos, provavelmente por viabilizar interações mais similares com o co-solvente, menos polar que a água³⁰. Outras regiões mutadas que podem apresentar influência na estabilidade são o núcleo hidrofóbico e túneis de acesso, sítio catalítico, interface entre diferentes subunidades e pontes de dissulfeto⁴. Efeitos incríveis nas propriedades enzimáticas, como aumento de 4000 vezes no tempo de meia vida, foram conseguidos através da mutação de um número extremamente reduzido de resíduos^{4,31}.

Para reduzir o efeito indesejável do solvente orgânico na solubilidade e estabilidade

enzimáticas, costuma-se empregar também o método de imobilização. As enzimas podem ser imobilizadas de diversas formas, como por liofilização ou adsorção em substratos inorgânicos, como polímeros, sílica gel ou zeólitas⁴. Muitas vezes a imobilização também é realizada por ligação covalente ao substrato inorgânico. Nesses casos têm-se meios heterogêneos, com a enzima na fase sólida. Esse método facilita a separação da enzima do meio reacional e a purificação dos produtos⁴. Por essas razões, é o método mais utilizado para estabilização enzimática em meios orgânicos na indústria, utilizado na produção em larga escala de intermediários de produtos químicos em empresas como BASF e Pfizer⁴. No entanto, esse método apresenta a desvantagem de tornar as reações mais lentas, devido a dificuldades na difusão do substrato no agregado enzimático sólido²⁸. Para facilitar a dispersão na solução e aumentar a atividade catalítica, alguns artifícios podem ser usados como ligação covalente da enzima com polímeros anfifílicos, como polietileno glicol (PEG), ou o uso de surfactantes¹¹.

Por fim, a estabilização enzimática pode ser obtida pela alteração do meio, em contraste com os dois métodos anteriores. Este caminho é experimentalmente mais simples do que os previamente discutidos, mas as causas da estabilização são complexas e costumam não ser completamente compreendidas. A alteração pode envolver emprego de surfactantes, levando à formação de micelas, adição de sais, ou de osmólitos estabilizadores. Uma outra possibilidade é a adição direta de maior quantidade de água ao solvente orgânico. Observa-se que, geralmente, o enriquecimento do meio orgânico com água promove maior estabilidade e atividade enzimática relativamente a meios anidros¹², e a inativação enzimática é reversível após diluição⁶. A atividade de transesterificação de subtilisina Carlsberg em tetrahydrofurano, por exemplo, sofreu um aumento substancial com a adição de até 15% (m/m) de água.³²

1.3. Osmólitos estabilizadores

Algumas substâncias consistentemente possuem efeito estabilizante sobre proteínas, seja em relação a variações de temperatura, ou à presença de agentes químicos desnaturantes^{33,34}. Esses co-solventes são chamados de osmólitos estabilizadores, ou também de solventes compatíveis²⁹. Essas espécies são assim chamadas pois em células eucarióticas e procarióticas são acumuladas em resposta a condições desnaturantes, como aumentos na concentração osmótica³⁵⁻³⁷.

Os principais osmólitos estabilizadores conhecidos são prolina, N-óxido de trimetil amina e poliálcoois, como glicerol, sorbitol, trehalose e sacarose³⁸. O glicerol é usado *in vivo* por algumas leveduras, plantas e insetos³⁶ e encontra também diversas aplicações *in vitro*. De fato, em meios contendo 99% de glicerol foram verificadas maior estabilidade da estrutura secundária de lisozima em comparação com água, conforme resultados de dicroísmo circular³⁹, e grande estabilização da atividade enzimática de α -quimotripsina a 100°C⁴⁰. Neste último caso, em glicerol a enzima apresentou 80% de atividade remanescente após 10h de incubação, enquanto que em água a inativação ocorreu em apenas 1 min.

Outros osmólitos, ao contrário, apresentam efeito desestabilizante, como uréia e hidrocloreto de guanidina⁴¹. O efeito estabilizador ou desestabilizador depende da natureza da interação do osmólito com a proteína, ou de seus efeitos sobre as propriedades da solução^{38,42}. Os osmólitos costumam ser empregados em proporções significativas na solução, de modo que é apropriado descrevê-los como co-solventes⁴³.

1.4. Mecanismos de estabilização de proteínas

As principais causas da estabilização enzimática promovida por adição de osmólitos estabilizadores ao meio discutidas na literatura baseiam-se na interação diferencial da proteína com os solventes²⁹. Os mecanismos sugeridos são agrupados dependendo da natureza da interação entre co-solvente e proteína, em duas classes: mecanismos diretos ou indiretos.

Os mecanismos diretos se baseiam na interação direta do osmólito com a proteína, principalmente por meio de ligações de hidrogênio que estabilizam o estado nativo⁴⁴. A formação de uma camada viscosa ao redor da proteína, que reduz sua mobilidade, é outra alternativa proposta como causa da estabilização estrutural, chamada em inglês de “mechanical entrapment”³⁸. Essa hipótese também é sugerida para explicar a maior termoestabilidade de algumas enzimas em solventes orgânicos que não sejam osmólitos estabilizadores¹¹. Tem-se nesses casos exclusão de água da superfície proteica.

Os mecanismos indiretos, ao contrário, predizem que o co-solvente influencia a estabilidade por promover mudanças na estrutura e dinâmica da água ao redor da proteína,

promovendo hidratação preferencial⁴⁵. Essa hipótese explicaria as observações de correlação direta entre hidratação enzimática, flexibilidade conformacional e atividade verificadas por ressonância de elétron-spin e anisotropia de fluorescência resolvida no tempo¹¹. Esquemas dos dois mecanismos estão representados na Figura 1.2.

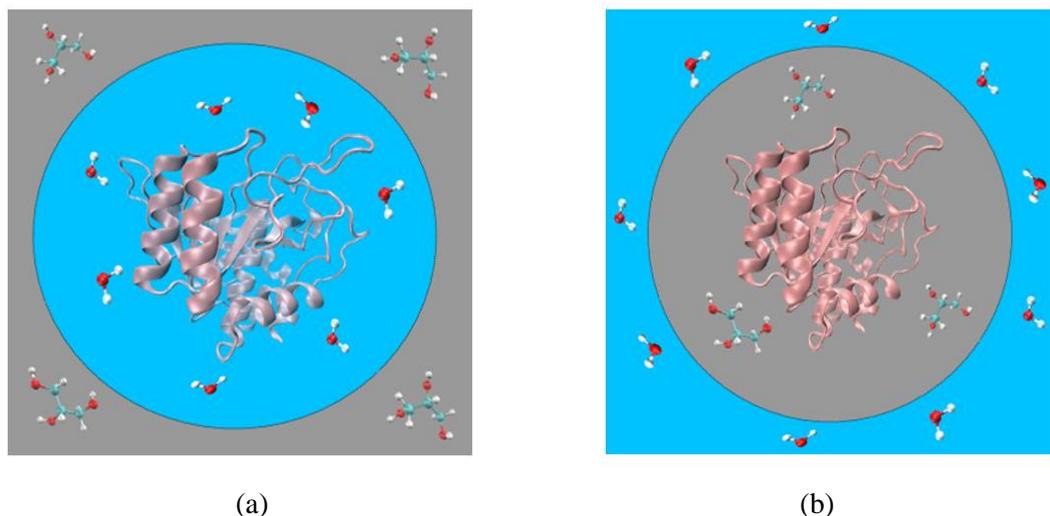


Figura 1.2. Mecanismos propostos para os efeitos de ativação e estabilização de enzimas em misturas com osmólitos: **(a)** Hidratação preferencial (mecanismo indireto) e **(b)** Exclusão de água (mecanismo direto).

Apesar dos estudos conduzidos na presença de diversos co-solventes, os mecanismos de estabilização não estão completamente esclarecidos. Por exemplo, estudos de dinâmica molecular com diversos poliálcoois apontam para a partição entre água e co-solvente em solução e hidratação preferencial como mecanismo para a estabilização estrutural do inibidor de quimotripsina 2 a 363 K⁴⁴. Além disso, resultados experimentais de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo também sugerem hidratação preferencial em meios contendo proporções de até 50% de glicerol em solução⁴⁶. Outro estudo de dinâmica molecular, no entanto, favorece a hipótese de exclusão de água em misturas contendo trealose como osmólito³⁸. Espectros vibracionais no infra-vermelho de suspensões de proteínas em misturas contendo carboidratos também apontam para o mecanismo de exclusão da água devido à verificação de ligações de hidrogênio diretas entre proteína e osmólito⁴⁷. Por fim, um estudo de dinâmica molecular com acetona ou isopropanol em água sugere partição do meio na superfície da proteína, com o co-solvente concentrado nas regiões não-polares²⁴.

1.5. Subtilisina Carlsberg

A subtilisina Carlsberg (SC) é uma serina protease, também conhecida como subtilisina A ou subtilase A. Faz parte de uma família de proteases chamadas de subtilisinas, cujo nome deriva da bactéria da qual foi primeiramente isolada, *Bacillus subtilis*⁴⁸. SC, em particular, é uma enzima extracelular secretada por *Bacillus licheniformis*, com pH ótimo alcalino e constituída por uma única cadeia contendo 274 aminoácidos⁴⁹. Os resíduos Ser221, His64 e Asp32 são os responsáveis pela sua atividade catalítica. SC possui um único resíduo de triptofano, na posição 113. Sua estrutura é dada na Figura 1.3. Acredita-se que, originalmente, a enzima estivesse envolvida em processos de esporulação, apesar de haver indicações de que atue apenas com função nutricional⁵⁰.

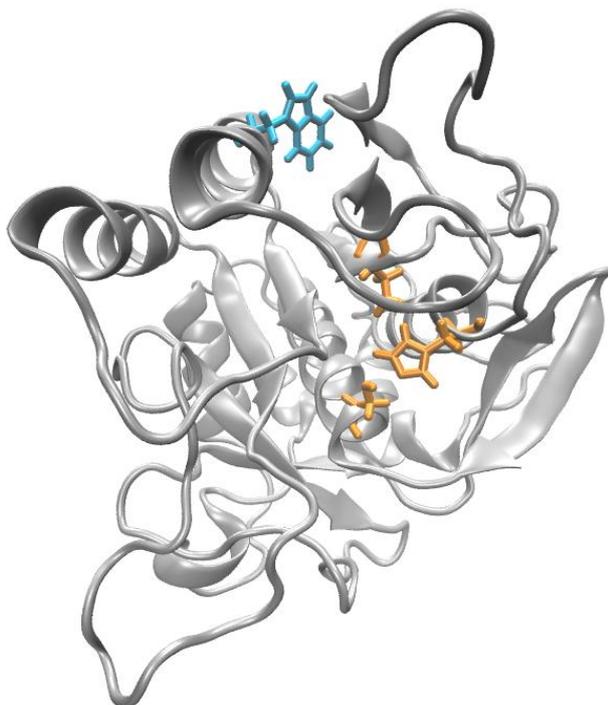


Figura 1.3. Estrutura da enzima subtilisina Carlsberg, com tríade catalítica (laranja) e resíduo de triptofano (azul) destacados.

SC destaca-se como uma enzima modelo dentre as proteases de interesse para investigação dos efeitos da adição de solventes orgânicos por ser estável em uma diversidade de solventes e disponível comercialmente^{20,51}. Diversos estudos relacionando atividade e

estrutura de SC em variados solventes foram realizados^{12,13,25,26}. SC é solúvel e ativa mesmo em 100% glicerol, apresentando atividade de transesterificação de éster etílico de N-acetil-L-fenilalanina com propanol 500x maior que em outros solventes orgânicos, como etileno glicol, N-metilformamida e 1,2 ou 1,3 propanodiol²⁰. Neste trabalho, estudamos a solvatação e anisotropia de fluorescência de SC em misturas de água e glicerol.

Capítulo 2

Simulações de Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular (MD) constituem uma importante ferramenta teórica que possibilita obter informações sobre o comportamento dinâmico de diversos sistemas em escala molecular⁵². Quase 40 anos se passaram desde a primeira simulação de uma proteína⁵³, e hoje os mais variados sistemas podem ser simulados realisticamente, permitindo o estudo de propriedades de líquidos puros, proteínas, ou de sistemas mais complexos.

As simulações de MD clássicas baseiam-se na maior parte das vezes na construção de um modelo que representa cada átomo como uma partícula pontual sujeita a interações intra- e intermoleculares com os outros átomos do sistema. Através do cálculo do potencial definido por essas interações e do uso das equações de movimento de Newton, configurações sucessivas podem ser obtidas. As posições e velocidades das partículas em cada instante do tempo constituem uma trajetória, a partir da qual pode-se estudar a evolução temporal de propriedades do sistema simulado.

Simulações de MD clássicas são usadas no estudo de sistemas grandes demais para serem investigados por mecânica quântica, e que podem ser tratados sem considerar explicitamente os elétrons. Nessas situações, a dinâmica do sistema é modelada satisfatoriamente pelos potenciais clássicos e permite a investigação de diversos fenômenos estruturais e dinâmicos, muitos inclusive que dificilmente são acessíveis a técnicas experimentais⁵⁴.

Neste capítulo serão tratados os conceitos principais do método de dinâmica molecular, e na última seção serão apresentados os detalhes das simulações conduzidas neste estudo.

2.1. Campos de força e potenciais de interação

Em MD, as interações entre átomos do sistema são tratadas através de potenciais clássicos, que são parametrizados para reproduzir de forma simplificada porém eficiente as interações em nível microscópico. O conjunto da forma funcional dos potenciais e sua parametrização é chamado de Campo de Força⁵⁵. A energia potencial é dada como função somente das posições dos átomos do sistema, uma simplificação baseada na aproximação de Born-Oppenheimer⁵⁶.

Exemplos de campos de força que apresentam sucesso na simulação de proteínas são CHARMM^{57,58}, OPLS⁵⁹, AMBER⁶⁰ e GROMOS⁶¹. Esses campos de força descrevem as interações entre diferentes átomos pela soma de interações não ligadas (também chamadas de interações intermoleculares, mas que podem envolver átomos distantes na mesma molécula) e ligadas (ou interações intramoleculares). A forma funcional dos campos de força é um compromisso entre eficiência computacional e exatidão da modelagem.

No caso do campo de força CHARMM, usado neste trabalho, até 5 termos são usados para modelar as interações de átomos próximos em uma estrutura molecular, os potenciais ligados. Os três principais representam as variações de energia associadas com o estiramento das ligações químicas, deformações angulares e torções diedrais. Esses tipos de movimentos são esquematizados na Figura 2.1.

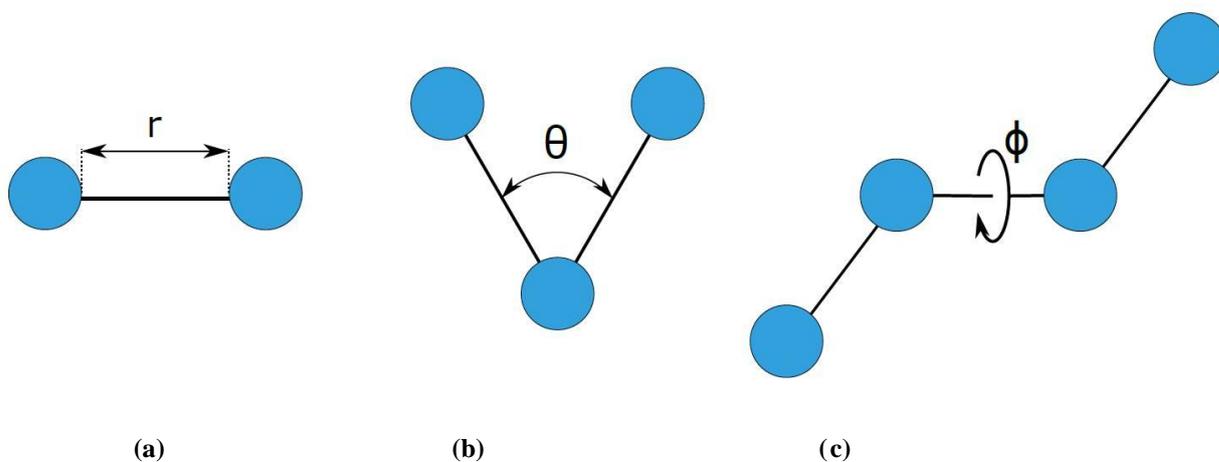


Figura 2.1. Esquema dos movimentos intramoleculares sobre os quais são definidos os potenciais das interações intramoleculares: (a) estiramento das ligações, (b) deformação angular e (c) torção diedral.

O estiramento das ligações é descrito por um potencial harmônico conforme Eq. 2.1, onde k_b é a constante de força, r é a separação entre os átomos e r_0 é a distância de equilíbrio.

$$V_b(r) = k_b(r - r_0)^2 \quad (2.1)$$

As deformações de ângulos em moléculas com três ou mais átomos também são representados por potenciais harmônicos, Eq. 2.2, sendo k_θ a constante de força associada à deformação angular, θ o ângulo formado entre os átomos i, j e k e θ_0 o ângulo de equilíbrio:

$$V_a(\theta) = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.2)$$

Em condições normais, as ligações e os ângulos entre átomos apresentam pouco desvio dos seus valores de menor energia, de modo que é apropriado tratar essas interações com potenciais harmônicos. As variações na estrutura e na energia relativa de um sistema são mais fortemente dependentes das torções diedrais e das interações não ligadas.

As torções diedrais envolvem 4 átomos ligados sucessivamente e são modeladas por somas de funções trigonométricas, para representar o potencial periódico associado com as interações entre átomos vizinhos devido a rotações ao redor da ligação central. Na Eq. 2.3, k_ϕ é a constante de força do diedro, n é a multiplicidade, que determina o número de pontos de mínima energia na curva potencial quando a ligações é rotacionada completamente, ϕ é o valor do ângulo diedro, e δ é o valor do ângulo de fase.

$$V_t(\phi) = \sum_n k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \quad (2.3)$$

No campo de força CHARMM há ainda dois outros termos referentes às interações ligadas. Um deles representa as torções impróprias, ou deformações-fora-do-plano, representadas na Figura 2.2. Esse termo é importante para fornecer geometrias corretas de grupos como carbono sp^2 , mantendo as ligações entre o carbono e átomo vizinhos no mesmo plano. Os parâmetros são k_ω , a constante de força da torção imprópria, ω , o ângulo fora do plano, e ω_0 o ângulo de mínima energia:

$$V_i(\omega) = k_\omega(\omega - \omega_0)^2 \quad (2.4)$$

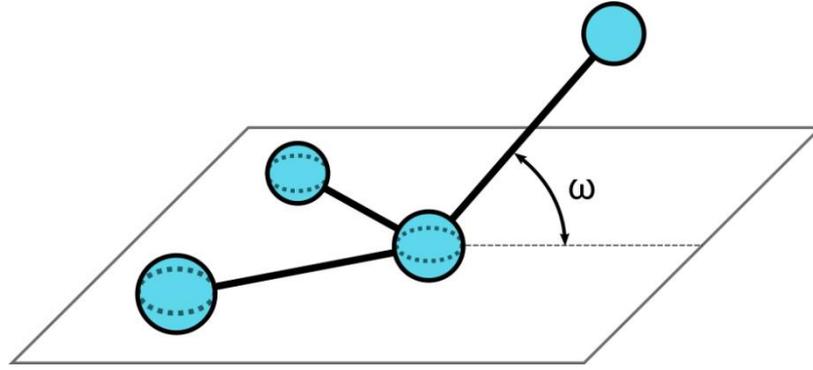


Figura 2.2. Representação da torção imprópria, ou deformação-fora-do-plano.

Por fim, o termo de Urey-Bradley representa deformações angulares pela interação não ligada entre átomos 1,3, ou seja, separados por duas ligações covalentes (Eq. 2.5). Nesse caso, k_u é a constante de força, u a distância entre os átomos e u_0 a distância de mínima energia.

$$V_{UB}(u) = k_u(u - u_0)^2 \quad (2.5)$$

A soma das interações intramoleculares, V^{Intra} , é então dada por:

$$\begin{aligned} V^{Intra} = & \sum_{\text{ligações}} k_b(r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \\ & + \sum_{\text{diédros}} k_\phi[1 + \cos(n\omega - \delta)] + \sum_{\text{Impróprios}} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \\ & + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u(u - u_0)^2 \end{aligned} \quad (2.6)$$

As interações entre átomos não ligados, V^{Inter} , são descritas pela soma do potencial de Coulomb, que modela as interações eletrostáticas, e de Lennard-Jones, referente às interações do tipo van der Waals, entre cada par de átomos:

$$V^{Inter} = \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.7)$$

O primeiro termo representa o potencial de Coulomb, no qual q_i e q_j são a carga dos átomos não ligados i e j , separados por uma distância r_{ij} , e o segundo termo representa o

potencial de Lennard-Jones, onde σ_{ij} é a soma dos raios de van der Waals (distância na qual a energia é nula), e ε_{ij} , a profundidade do poço de energia potencial. O modelo empírico de Lennard-Jones possui um termo atrativo, que varia com r_{ij}^{-6} e está relacionado com as interações de London, e um termo repulsivo que se torna predominante a distâncias curtas e é devido à repulsão de curto alcance causada pela sobreposição das nuvens eletrônicas.

Assim, a representação do potencial atuante em cada partícula do sistema é dada pela soma das interações inter e intramoleculares, Eq. 2.8.

$$V^{Total} = V^{Intra} + V^{Inter} \quad (2.8)$$

Um passo importantíssimo no desenvolvimento de um campo de força satisfatório é a definição dos parâmetros de cada interação presente no sistema simulado, isto é, distâncias e ângulos de equilíbrio, cargas parciais, etc. Esses parâmetros são muitas vezes definidos empiricamente, de forma que propriedades estruturais ou termodinâmicas medidas a partir das simulações melhor reproduzam resultados experimentais, ou mesmo definidos a partir de dados de cálculos *ab initio* realizados em sistemas similares mais simples⁵⁵.

Outra característica desejável dos parâmetros de campos de força é a sua transferibilidade, ou seja, a capacidade de serem utilizados para modelar outras moléculas similares, sem haver a necessidade da definição de parâmetros novos para cada interação no sistema em estudo. Isso facilita a aplicação dos campos de força, principalmente quando uma representação aproximada do sistema é satisfatória. No caso de estudos que requerem representação particularmente detalhada, no entanto, os parâmetros podem ser desenvolvidos especificamente⁵⁵.

2.2. Posições e velocidades iniciais

As posições e velocidades iniciais dos átomos são um pré-requisito para a condução de uma simulação, e devem ser definidas anteriormente à realização dos cálculos dos potenciais e obtenção das trajetórias.

As estrutura iniciais usadas para simular proteínas comumente são obtidas de experimentos, na maior parte das vezes por cristalografia de raios-X ou ressonância

magnética nuclear (RMN). A proteína é solvatada pelas moléculas de solvente, gerando uma caixa de solvatação ao redor do soluto. São também adicionados íons como sódio e cloro, visando manter a neutralidade do sistema e força iônica similar à de concentrações fisiológicas. O tamanho da caixa é definido de forma que a densidade corresponda à do sistema real nas mesmas condições termodinâmicas⁵⁶. As configurações iniciais para o solvente, em particular de misturas como as estudadas neste trabalho, podem ser geradas com o programa Packmol⁶².

A fim de minimizar efeitos de fronteira, a maior parte das simulações emprega condições periódicas de contorno⁵⁵. Geralmente o número de moléculas de solvente a ser adicionado é estimado de forma que a caixa gerada seja grande o suficiente para minimizar interações intermoleculares entre a proteína e suas imagens nas células periódicas, mas sem acarretar em custo computacional desnecessário.

A configuração inicial do sistema deve ser escolhida com certo cuidado para não apresentar interações fortemente desestabilizantes, já que isso pode prejudicar os primeiros passos ou mesmo comprometer o sucesso da simulação. Por essa razão, antes da produção da trajetória é comum realizar uma otimização da estrutura de forma a minimizar maus-contatos. Essa etapa de minimização da energia será tratada em mais detalhes na Seção 2.4.1.

Além das posições iniciais, as velocidades iniciais de cada átomo do sistema precisam ser definidas. As velocidades iniciais podem ser todas nulas, com o sistema deixado evoluir a partir do repouso. O mais comum, no entanto, é a atribuição aleatória de velocidades que pertençam a uma distribuição de Maxwell-Boltzmann para a temperatura simulada. A equação 2.9 fornece a probabilidade de uma partícula i de massa m_i apresentar velocidade v_{ix} na direção x a uma dada temperatura T ⁵⁵.

$$P(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T}\right] \quad (2.9)$$

2.3. Equações de movimento

Uma vez que o campo de força, posições e velocidades iniciais estejam estabelecidos, a dinâmica do sistema ao longo do tempo é obtida através da integração numérica das

equações de movimento de Newton, que são equações diferenciais de segunda ordem. Para cada átomo i de massa m , é possível calcular a aceleração $\mathbf{a}_i(t)$, a derivada segunda da posição em relação ao tempo $\left(\frac{\partial^2 \mathbf{r}_i(t)}{\partial t^2}\right)$, infringida pelas forças $\mathbf{F}_i(t)$ às quais ele está sujeito:

$$\mathbf{a}_i(t) = \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \quad (2.10)$$

A força atuante em cada átomo em um determinado instante, por sua vez, é obtida do gradiente da energia potencial total a que ele está exposto, como representado na Eq. 2.11.

$$\mathbf{F}_i(t) = -\nabla_i V [\mathbf{r}_i(t)]^{Total} \quad (2.11)$$

Devido à complexidade dos sistemas normalmente tratados e da dependência da energia potencial com as posições dos átomos, o potencial e as equações de movimento são calculados em sequências de intervalos de tempo bem curtos, ou passos de tempo, da ordem de poucos femtosegundos. Nesses curtos intervalos o potencial é considerado constante. Em cada iteração, as forças atuantes nos átomos são calculadas e usadas para gerar novas posições e velocidades em um intervalo de tempo imediatamente posterior. A repetição desse ciclo leva à obtenção das trajetórias dos átomos ao longo do tempo. Devido aos altos custos computacionais, simulações de dinâmica molecular costumam ser conduzidas por alguns poucos nanosegundos, apesar de simulações com tempo de amostragem muito mais longos, até a escala de microsegundos, serem mais recentemente encontradas na literatura^{63,64}.

Há diversos algoritmos disponíveis para realizar a integração das equações de movimento a partir da aceleração calculada pela Eq. 2.10 e das posições e velocidades iniciais. Dois deles serão tratados a seguir.

2.3.1. Algoritmo Verlet

O algoritmo *Verlet* utiliza as posições e acelerações em um tempo t , conjuntamente com as posições de um passo imediatamente anterior, $\mathbf{r}(t - \delta t)$, para calcular as posições seguintes $\mathbf{r}(t + \delta t)$ ⁶⁵. As posições da partícula i nos instantes $t \pm \delta t$ são aproximadas como expansões de Taylor ao redor de $\mathbf{r}(t)$:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \frac{1}{6}\frac{\partial^3\mathbf{r}(t)}{\partial t^3}\delta t^3 + \dots \quad (2.12)$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 - \frac{1}{6}\frac{\partial^3\mathbf{r}(t)}{\partial t^3}\delta t^3 + \dots \quad (2.13)$$

A equação resultante é então obtida pela soma das Eq. 2.12 e 2.13, onde foram desprezados os termos com dependência maior que δt^3 :

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2\mathbf{a}(t) \quad (2.14)$$

As velocidades não aparecem explicitamente nesse algoritmo, mas podem ser calculadas dividindo as diferenças nas posições nos instantes $t + \delta t$ e $t - \delta t$ por $2\delta t$, Eq. 2.15.

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t+\delta t) - \mathbf{r}(t-\delta t)}{2\delta t} \quad (2.15)$$

Esse método possui a desvantagem de que, para o primeiro passo da simulação, a posição em um instante anterior não é conhecida. Isso no entanto pode ser estimado pelo uso da equação de Taylor para $\mathbf{r}(t - \delta t)$, Eq. 2.13, com $t = 0$:

$$\mathbf{r}(-\delta t) = \mathbf{r}(0) - \delta t\mathbf{v}(0) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{a}(0) \quad (2.16)$$

2.3.2. Algoritmo velocity-Verlet

A variante “de velocidade” do algoritmo *Verlet* possui a vantagem de fornecer posições, velocidades e acelerações para um mesmo instante ($t + \delta t$) sem a necessidade de serem conhecidas as posições em ($t - \delta t$). As posições dos átomos nos instantes seguintes são calculadas em função da posição, velocidade e aceleração em t , como descrito na Eq. 2.17⁶⁶.

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 \quad (2.17)$$

A determinação da velocidade em $(t + \delta t)$, no entanto, envolve uma média das acelerações nos instantes t e $(t + \delta t)$, pois dessa forma as velocidades são calculadas com maior precisão do que no método *Verlet*⁵⁵:

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t [\mathbf{a}(t) + \mathbf{a}(t + \delta t)] \quad (2.18)$$

Por causa do método de cálculo de $\mathbf{v}(t + \delta t)$, o algoritmo *velocity-Verlet* é na realidade implementado em três etapas: primeiramente as posições no instante de tempo seguinte são calculadas segundo a equação 2.17. As velocidades em um instante de tempo intermediário, $\mathbf{v}(t + \frac{1}{2} \delta t)$, são então calculadas de acordo com a equação 2.19.

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2} \delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t \mathbf{a}(t) \quad (2.19)$$

Por fim, as forças no instante seguinte são determinadas, uma vez que se conhecem as posições $\mathbf{r}(t + \delta t)$, gerando $\mathbf{a}(t + \delta t)$, permitindo assim o cálculo de $\mathbf{v}(t + \delta t)$:

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t + \frac{1}{2} \delta t) + \frac{1}{2} \delta t \mathbf{a}(t) \quad (2.20)$$

2.4. Etapas da simulação

As simulações de dinâmica molecular envolvem propriamente três etapas: primeiramente é realizada uma minimização da energia do sistema inicial, seguida de equilibração da estrutura minimizada nas condições termodinâmicas de interesse. Somente então, na etapa de produção, são obtidas as trajetórias que serão utilizadas para análise. As etapas anteriores à etapa de produção são necessárias pois, na grande maioria dos casos, as configurações iniciais apresentam maus contatos entre os átomos ou torções locais que podem gerar enormes potenciais repulsivos e desestabilizar a simulação. Além disso, a energia total do sistema precisa ser equilibrada para atingir a energia interna termodinâmica nas condições desejadas. A seguir os conceitos básicos dessas três etapas são apresentados em mais detalhes.

2.4.1. Minimização da energia

Na minimização, as coordenadas dos átomos são variadas, de modo a minimizar a energia potencial do sistema e atingir uma estrutura sem sobreposição de átomos e uma energia total satisfatória. Diversos algoritmos permitem realizar essa etapa, e encontram-se otimizados em softwares de simulações de dinâmica molecular⁵⁵.

2.4.2. Equilibração

Após a minimização segue-se para a etapa de equilibração, pois geralmente a configuração de mínima energia gerada não corresponde a uma estrutura adequada para as condições termodinâmicas em que se deseja realizar a simulação. Nesse ponto propriedades como temperatura e pressão são controlados para atingir os valores termodinâmicos. O tempo de equilibração vai depender do tempo necessário para que as propriedades de interesse estejam corretamente amostradas nas condições termodinâmicas de interesse e flutuem em torno de um valor médio.

Em sistemas não homogêneos, como o caso de proteínas em solução, um procedimento típico é primeiramente realizar a minimização e equilibração do solvente e de contra-íons da solução, com os átomos da proteína mantidos fixos. Somente depois o sistema inteiro é minimizado e equilibrado, podendo ainda envolver etapas nas quais a cadeia principal da proteína é mantida fixa, para finalmente permitir a relaxação do sistema como um todo.

2.4.3. Produção

Por fim, a evolução temporal do sistema pode ser obtida na fase de simulações produtivas. É nessa etapa que posições e outras propriedades dos sistemas são gravadas para a realização das análises das propriedades do sistema.

2.5. Ensembles e controle das condições termodinâmicas

Um ensemble corresponde a um grande conjunto de réplicas de um sistema termodinâmico. Sob a hipótese ergódica, na qual todas as configurações do sistema podem ser amostradas por uma das réplicas em tempo suficientemente longo, médias de propriedades do ensemble podem ser substituídas pelas médias temporais sobre a evolução temporal de uma das réplicas⁵⁵.

O tipo de ensemble simulado depende das propriedades que se deseja calcular. Nas simulações, temperatura (T), pressão (P), número de partículas (N), volume (V) ou potencial químico (μ) podem ser mantidos constantes. Dessa forma, ensembles comumente simulados são o ensemble *microcanônico* (no qual N, V e E são mantidos constantes), o ensemble canônico (NVT) e o ensemble isotérmico-isobárico (NPT). O ensemble NPT é utilizado para simular grande variedade de situações experimentais, que são geralmente conduzidas nas condições de temperatura e pressão constantes. A seguir serão discutidas as técnicas utilizadas neste estudo para se manter temperatura e pressão constantes nas simulações de MD. Nesses casos as equações de movimento são modificadas de forma a permitir amostragem do ensemble desejado.

2.5.1. Controle da temperatura

A dinâmica de Langevin é um dos métodos utilizados para manter a temperatura de uma simulação aproximadamente constante. Esse método simula o acoplamento de um banho térmico à caixa de simulação, e as partículas na caixa são submetidas a forças adicionais devidas a choques estocásticos com as partículas do banho. As forças extras são causadas por fricção com o banho, um termo dissipativo, e por flutuações randômicas devido a colisões com moléculas do banho, um termo impulsivo. A equação de movimento dos átomos se torna:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i(t)}{\partial t^2} = -\nabla_i V(\mathbf{r}) - m_i \gamma \frac{\partial \mathbf{r}_i(t)}{\partial t} + \sqrt{2\gamma k_B T m_i} R(t) \quad (2.21)$$

onde γ é o coeficiente de fricção e $R(t)$ as forças aleatórias, onde k_B é a constante de

Boltzmann e T a temperatura do banho⁵⁵. A fricção é proporcional à velocidade da partícula. Quanto maior for o valor de γ , maior o acoplamento com o banho externo. Por fim, as forças aleatórias são associadas a uma temperatura e fornecem energia ao sistema⁶⁷. $R(t)$ é uma variável aleatória gaussiana com média zero e desvio padrão 1.

2.5.2. Controle da pressão

No software de simulações NAMD, a pressão é mantida constante através de alterações no volume (e conseqüentemente tamanho) da caixa de simulação utilizando uma versão do método de Nosé-Hoover⁶⁸. Similarmente ao acoplamento de um banho térmico no caso do controle de temperatura, o volume da caixa é adicionado como grau de liberdade, de forma a representar um pistão externo acoplado ao sistema. Assim, o volume varia durante a simulação, determinado pelo equilíbrio entre a pressão interna do sistema e a pressão externa desejada.

2.6. Interações de longo alcance

A parte computacionalmente mais intensa de uma simulação de dinâmica molecular é o cálculo das interações intermoleculares, os potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb, devido ao grande número pares de átomos.

Pela dependência com r^{-6} , as energias calculadas pelo potencial de Lennard-Jones são mais importantes a distâncias curtas, de forma que é comum não serem calculadas entre pares de átomos localizados a distâncias maiores que um certo limite (ou *cutoff*) pré-estabelecido, sem a inserção de erros significativos com essa aproximação. Valores por volta de 10 Å são rotineiramente empregados⁵⁵.

As interações Coulômbicas, no entanto, não podem ser submetidas aos mesmos *cutoffs* pois são interações de maior alcance. Nesses casos, interações entre partículas de caixas vizinhas não podem ser desconsideradas sem induzir grandes erros na dinâmica e estrutura do sistema. Um método utilizado com sucesso em simulações de proteínas, DNA e outros sistemas é o método de Somas de *Ewald*, e uma de suas variantes, *Particle Mesh Ewald*.

O método das Somas de *Ewald* foi derivado em 1921 para tratar da energética de cristais iônicos. Esse método considera a interação de uma partícula com as partículas na caixa de referência e com todas as outras nas caixas periódicas repetidas. O potencial de interação adquire a forma da Eq. 2.22 para n caixas onde $\mathbf{n} = (n_x L, n_y L, n_z L)$, sendo n_x, n_y e n_z números inteiros, é o vetor posição das células, excluindo-se a interação $i = j$ quando $n = 0$ ⁶⁹.

$$V = \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + \mathbf{n}|} \quad (2.22)$$

A somatória em 2.22 converge muito lentamente no espaço real, porém, converge rapidamente no espaço recíproco. Usando transformada de Fourier o potencial pode assim ser calculado de forma eficiente e razoavelmente rápida.

Particle Mesh Ewald (PME) é um desenvolvimento do método de somas de *Ewald* e utiliza transformadas rápidas de Fourier e outros procedimentos para acelerar o cálculo de potenciais de longo alcance⁷⁰. Esse método atualmente encontra-se implementado em diversos programas de simulação e é usado rotineiramente em simulações de sistemas complexos com condições periódicas de contorno.

2.7. Detalhes das simulações

Neste estudo utilizou-se o campo de força CHARMM27⁵⁷, e os sistemas foram preparados de modo a conter a proteína subtilisina Carlsberg em misturas de glicerol em água. Para cada proporção foram realizadas 10 simulações independentes de 20 ns cada. A configuração inicial foi gerada a partir de uma simulação de SC em vácuo a 815 K, utilizando a estrutura 1SBC do *Protein Data Bank* determinada por cristalografia de raio X⁷¹. Essa simulação em alta temperatura, na qual a proteína foi mantida fixa com exceção do único triptofano, foi realizada para se obter uma estrutura contendo a cadeia lateral desse resíduo exposto ao solvente, como será discutido no Capítulo 5.

As configurações iniciais da proteína na caixa foram obtidas com o software Packmol⁶². O sistema foi preparado em caixas cúbicas com condições periódicas de contorno, contendo 22000 moléculas de água do modelo TIP3P⁷² e íons de sódio e cloro para manter a neutralidade do sistema. O número de moléculas de glicerol adicionados em cada caso e as dimensões das caixas estão organizados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Composição das misturas de glicerol/água e dimensões das caixas.

Proporção de glicerol (% m/m)	Número de moléculas de glicerol na simulação	Aresta da caixa (Å)
0	0	89,16
9	430	91,85
17	860	94,40
23	1290	96,82
29	1720	99,12
33	2150	101,33

A parametrização das moléculas de glicerol foi realizada por comparação e analogia com moléculas de carboidratos e com a cadeia principal de triacilglicerídeos definidas no campo de força CHARMM. O esquema da molécula de glicerol e a descrição das cargas parciais e dos tipos de átomo utilizados são dados na Figura 2.3 e Tabela 2.2, respectivamente.

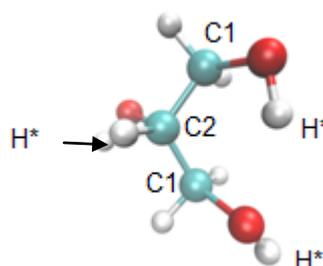


Figura 2.3. Representação da molécula de glicerol utilizada nas simulações. Carbonos em ciano, oxigênios em vermelho e hidrogênios em branco. Hidrogênios das hidroxilas são indicados como H*.

Tabela 2.2. Cargas parciais e tipo dos átomos da molécula de glicerol.

Átomo	Carga parcial	Tipo de átomo
Oxigênio	-0.66	OHL
Hidrogênio H*	0.43	HOL
Hidrogênio H de carbono secundário	0.09	HAL2
Hidrogênio H de carbono terciário	0.09	HAL1
Carbono C1	0.05	CTL2
Carbono C2	0.14	CTL1

O software NAMD⁷³ foi utilizado para realizar as simulações. As interações não ligadas de curto alcance (potencial de Lennard-Jones) foram avaliadas para átomos que se encontravam até um raio de 12 Å de distância, e os potenciais de Coulomb foram calculados via *Particle Mesh Ewald*. Utilizou-se *timestep* de 2 fs. As simulações foram realizadas a 298,15 K e 1 atm de pressão, com controle de temperatura usando um termostato de Langevin e pressão pelo emprego de barostato de Nosé-Hoover. As trajetórias geradas foram visualizadas utilizando o software VMD⁷⁴. As figuras de estruturas proteicas deste trabalho foram realizadas utilizando esse software.

As etapas da simulação em água e glicerol foram:

- 1000 passos de minimização de energia do solvente, mantendo todos os átomos da proteína fixos;
- 200 ps de simulação a pressão e temperatura constantes, mantendo a proteína fixa;
- 500 passos de minimização de energia da proteína, mantendo os carbonos α fixos;
- 200 ps de simulação a pressão e temperatura constantes, mantendo os carbonos α fixos;
- 2 ns de simulação a pressão e temperatura constantes, com todo o sistema livre;
- 20 ns de simulações produtivas.

Capítulo 3

Objetivos

Neste trabalho, a enzima subtilisina Carlsberg foi estudada em misturas de glicerol em água por meio de simulações de dinâmica molecular, com dois objetivos principais:

- Compreender a solvatação de SC nas misturas binárias, e levantar possíveis causas moleculares do efeito estabilizador do glicerol;
- Verificar a dinâmica reorientacional do resíduo de triptofano de SC e sua correlação com os decaimentos de anisotropia de fluorescência experimentais. Comparar a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações com os decaimentos experimentais, e correlacionar o resultado macroscópico à dinâmica do fluoróforo em escala molecular.

Capítulo 4

Solvatação de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol

O estudo da solvatação de enzimas em misturas binárias de água com solventes orgânicos é de grande interesse teórico e aplicado, tanto para a compreensão do efeito desses solventes no comportamento enzimático como para o desenvolvimento de modelos úteis para a otimização das enzimas nesses meios diferenciados. O glicerol destaca-se como um osmólito que promove um aumento da estabilidade enzimática mesmo em temperaturas ou presença de agentes desnaturantes, como sais em alta concentração. Por essa razão, ele é utilizado há anos em grandes concentrações durante o processo de extração de proteínas²⁸.

A solvatação de subtilisina Carlsberg em meios contendo proporções variadas de glicerol foi investigada por Lakshmikanth e Krishnamoorthy através da técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, utilizando a fluorescência do único resíduo de triptofano da proteína⁴⁶. Os tempos de correlação rotacional associados às taxas de decaimento da anisotropia da fluorescência se mostraram pouco dependentes da viscosidade do meio, sugerindo que há partição entre água e glicerol na proximidade da superfície enzimática, com a água envolvendo preferencialmente a proteína⁴⁶. Nesse contexto, as simulações de Dinâmica Molecular destacam-se pela capacidade de simular as condições do estudo e fornecer informações em escala microscópica, visando complementar as informações sugeridas pelos resultados experimentais.

4.1 Metodologia

Seis sistemas contendo SC em diferentes proporções de glicerol em água foram preparados conforme descrito no capítulo 2. Para cada proporção, dez simulações de 20 ns cada foram realizadas. As análises conduzidas para estudar a solvatação de SC envolveram o

cálculo da função de distribuição soluto-solvente e da energia livre de interação proteína-solvente.

A função de distribuição radial, $g(r)$, descreve a probabilidade de encontrar uma partícula a uma distância r de uma outra partícula de referência em relação à mesma probabilidade em um sistema homogêneo⁷⁵. Desse modo, ela está relacionada com a variação da densidade de matéria a cada distância da partícula de referência, e indica o efeito da presença dessa partícula nas outras partículas constituintes do meio. Uma vez que proteínas e solventes não são esféricos, a função de distribuição foi calculada usando a mínima distância entre pares de átomos na estrutura. A normalização é feita calculando a distribuição das moléculas de solvente na ausência de interações entre soluto e solvente, ou seja, em uma situação homogênea. Essa função é chamada de função de distribuição soluto-solvente, g_{ss} . A análise foi realizada com programa desenvolvido pelo grupo⁷⁶, tomando a água ou o glicerol como solventes.

A partir da função de distribuição, é possível calcular a energia livre de interação de acordo com a relação termodinâmica:

$$\Delta G(r) = -RT \ln g_{ss}(r) \quad (4.1)$$

4.2 Resultados

4.2.1. Simulação dos solventes

Primeiramente, simulações com água e glicerol na ausência de proteína foram conduzidas a 298 K e 1 atm. As misturas simuladas continham 0%, 9% e 33% (m/m) de glicerol em água. Uma simulação de 20 ns foi realizada em cada proporção.

As funções de distribuição água-água calculadas a partir das simulações estão apresentadas na Figura 4.1. Independentemente da concentração, a forma bem definida da função de distribuição indica a formação de ligações de hidrogênio, com a distância na qual o pico da função é máxima correspondendo à distância média O---H de uma ligação de hidrogênio entre moléculas de água em solução à temperatura ambiente. Esse perfil está de acordo com encontrado na literatura³⁸. A figura 4.1 oferece ainda a informação adicional de

que o glicerol promove maior organização das moléculas de água na mistura, devido ao aumento no primeiro pico com o aumento da concentração de glicerol.

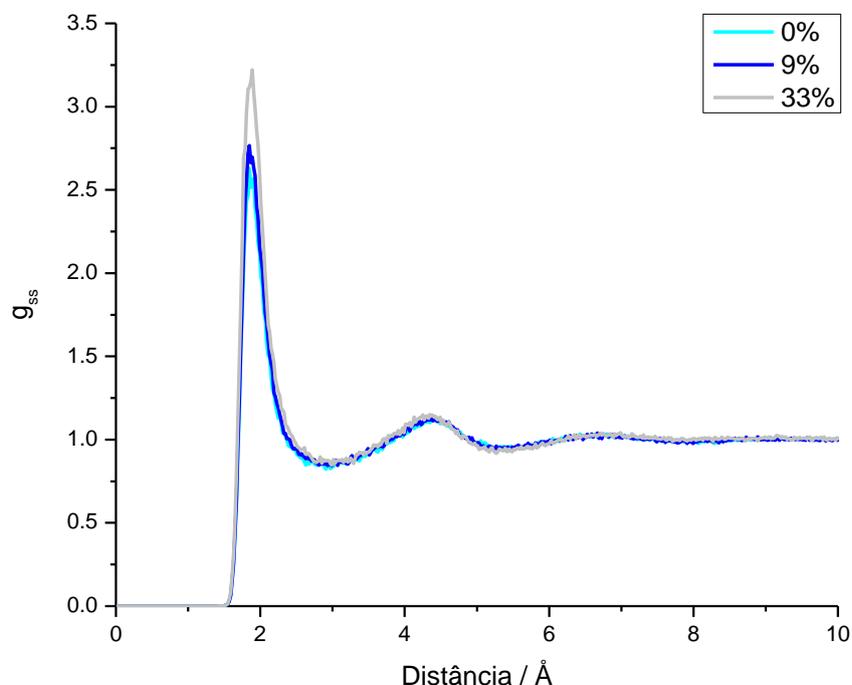


Figura 4.1. Funções de distribuição água-água para diferentes concentrações de solução de glicerol/água.

O mesmo cálculo foi realizado para o glicerol a 9 e 33% (m/m) (Figura 4.2). Nesse caso vê-se que o primeiro pico de solvatação é mais largo, devido ao maior tamanho das moléculas de glicerol e sua maior flexibilidade, o que tornam a interação menos organizada. A localização desse pico, no entanto, corresponde às distâncias características de uma ligação de hidrogênio. A função para ambos os solventes converge para a unidade, o comportamento esperado devido às longas distâncias entre as moléculas nesses casos.

A similaridade entre os perfis nas concentrações distintas indica ainda que não há partição dos solventes, água e glicerol, com o aumento da concentração de glicerol. A solução permanece homogênea e diluída, o que está de acordo com o resultado experimental e permite a análise da solvatação da proteína sem complicações adicionais.

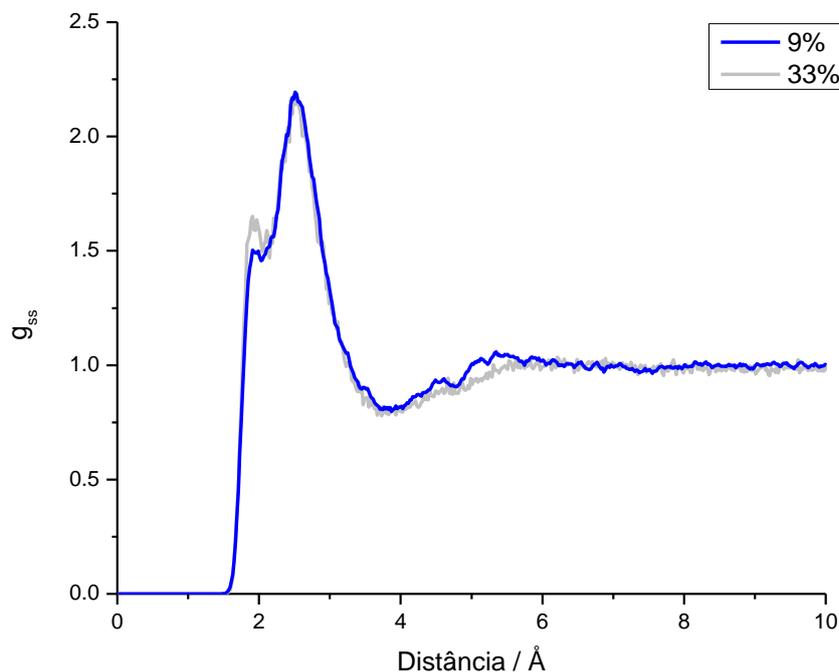


Figura 4.2. Funções de distribuição glicerol-glicerol para diferentes concentrações de solução de glicerol/água.

4.2.2. Solvatação de subtilisina Carlsberg

A solvatação de subtilisina Carlsberg por água e glicerol foi então analisada a partir das simulações de dinâmica molecular. Para obter quantitativamente uma indicação da interação dos solventes com a proteína, calculou-se o número de ligações de hidrogênio estabelecidas entre a proteína e o solvente. Os critérios geométricos utilizados para determinação de uma ligação de hidrogênio foram distância máxima entre os átomos pesados da proteína e do solvente de 3 Å, presença de hidrogênio entre eles e ângulo X---H-X de até 20° fora da linearidade. As ligações de hidrogênio entre resíduos da proteína também foram calculadas, assim como o número total de ligações de hidrogênio realizadas pela proteína (com solventes e com ela mesma). Os valores médios das 10 simulações em cada proporção estão apresentados na Figura 4.3.

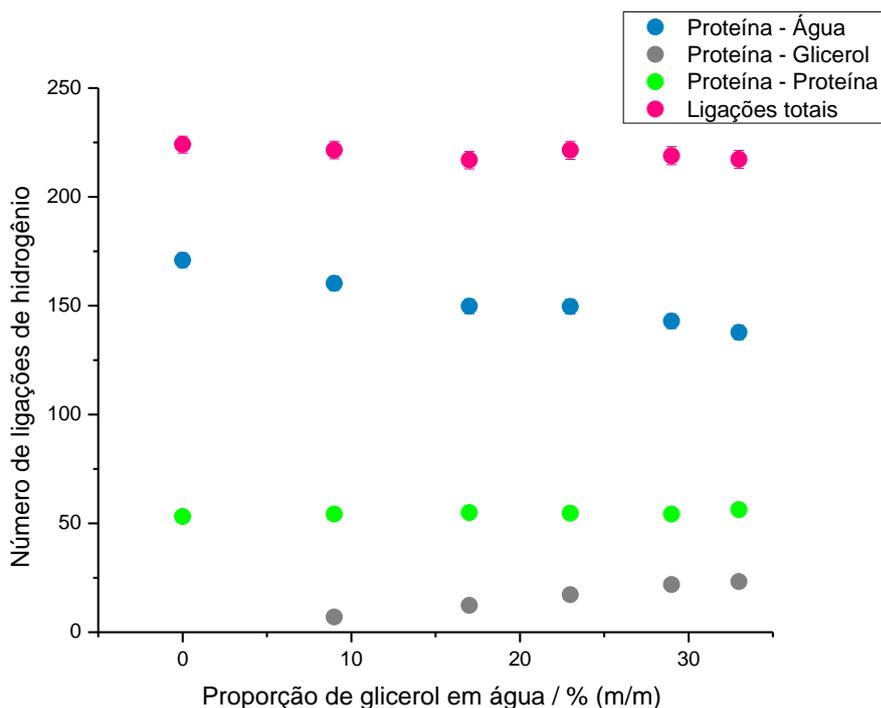


Figura 4.3. Número médio de ligações de hidrogênio realizadas com a proteína.

Na ausência de glicerol em solução, a proteína apresenta um número máximo de ligações de hidrogênio com a água. A adição de 9 a 33% em massa de glicerol leva à redução gradativa no número de interações entre água e proteína, evidenciando que ocorre exclusão de parte das moléculas de água na primeira camada de solvatação. As moléculas de glicerol, ao contrário, estabelecem um maior número de ligações de hidrogênio com a proteína à medida que há mais glicerol em solução. A substituição das ligações de hidrogênio proteína-água por proteína-co-solvente foi verificada em outros estudos computacionais utilizando trealose, acetona, isopropanol e formamida^{24,38}. Desse modo, uma pequena porção das moléculas de glicerol substitui a água na superfície da proteína e interage diretamente com ela. Ainda que ocorra essa substituição, o aumento no número de interações com o glicerol não ocorre na mesma proporção que a redução no número de interações com a água, de modo que há uma tendência de redução no número de ligações de hidrogênio totais realizadas pela proteína com os solventes. Esse dado é mostrado na Tabela 4.1, juntamente com os outros valores correspondentes a ligações de hidrogênio proteína-proteína e totais.

As interações perdidas com os solventes são compensadas por ligações de hidrogênio internas, realizadas entre os próprios resíduos da proteína, de modo que o número de ligações de hidrogênio totais realizadas pela proteína se mantém essencialmente constante, dentro das

flutuações observadas.

Tabela 4.1. Número de ligações de hidrogênio realizadas pela proteína

Proporção glicerol/água (% m/m)	Número de ligações de hidrogênio					totais
	proteína - água	proteína- glicerol	proteína- solventes	proteína- proteína		
0	171 ± 3	0	171 ± 3	53 ± 2		224 ± 4
9	160 ± 3	7 ± 1	167 ± 4	54 ± 2		221 ± 4
17	151 ± 3	12 ± 1	163 ± 4	55 ± 2		218 ± 4
23	150 ± 3	17 ± 1	167 ± 4	55 ± 2		221 ± 4
29	143 ± 3	22 ± 2	165 ± 4	54 ± 2		219 ± 4
33	138 ± 3	23 ± 2	161 ± 4	56 ± 2		217 ± 4

Uma das causas propostas do efeito estabilizador de osmólitos é a alteração da dinâmica da água solvatando a proteína. Para estudar essa possibilidade, o tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio realizadas entre SC e água foi calculado, e a fração da observação de cada intervalo de tempo de sobrevivência está relacionado nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

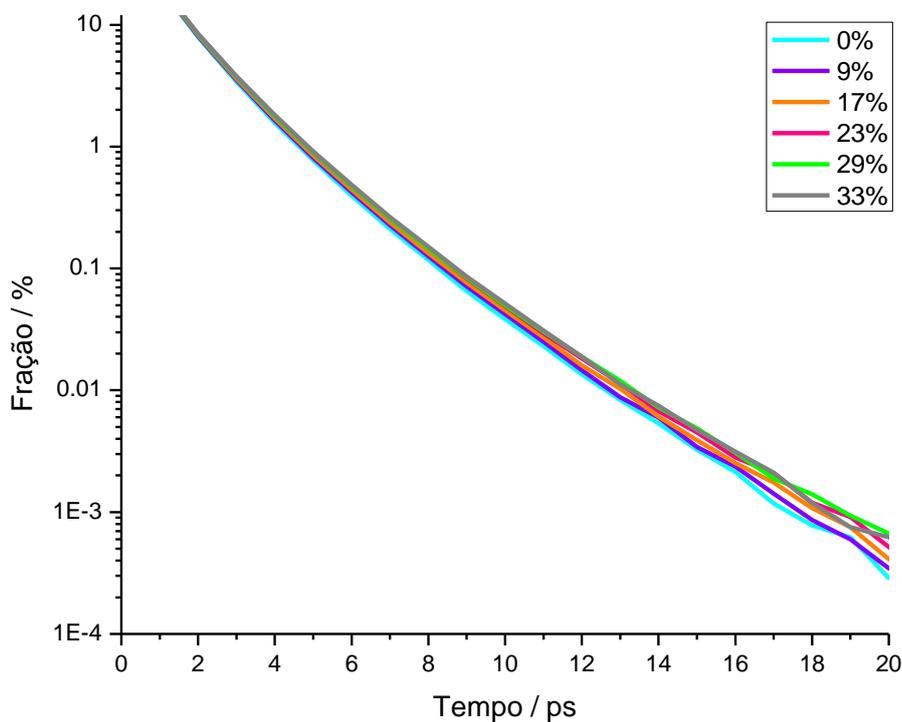


Figura 4.4. Fração de observação em função do tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água.

Verifica-se que não há uma grande diferença entre os sistemas para um mesmo intervalo de tempo de sobrevivência, e que a maioria das ligações de hidrogênio sobrevive apenas por tempos curtos. A Figura 4.5 mostra o histograma em detalhe para os tempos de sobrevivência menores que 1 ps e entre 1 e 2 ps. As ligações extremamente breves, que sobrevivem por menos que 1 ps, são mais frequentes em água, sendo menos frequentes conforme há mais glicerol em solução. Já para o intervalo seguinte, de ligações que sobrevivem entre 1 e 2 ps, há uma inversão no comportamento, e ligações com tempo de sobrevivência maiores são mais frequentes nos meios mais ricos em glicerol. Essa tendência se mantém para os tempos de sobrevivência mais longos (Figura 4.6), ainda que a diferença entre as distintas proporções seja bem reduzida. Esses resultados indicam que o glicerol tem um efeito sobre a dinâmica da água na primeira camada de solvatação, mas esse efeito parece ser bastante sutil, e portanto a alteração da dinâmica da água não deve ser a causa principal do efeito estabilizador do glicerol sobre a estrutura da proteína.

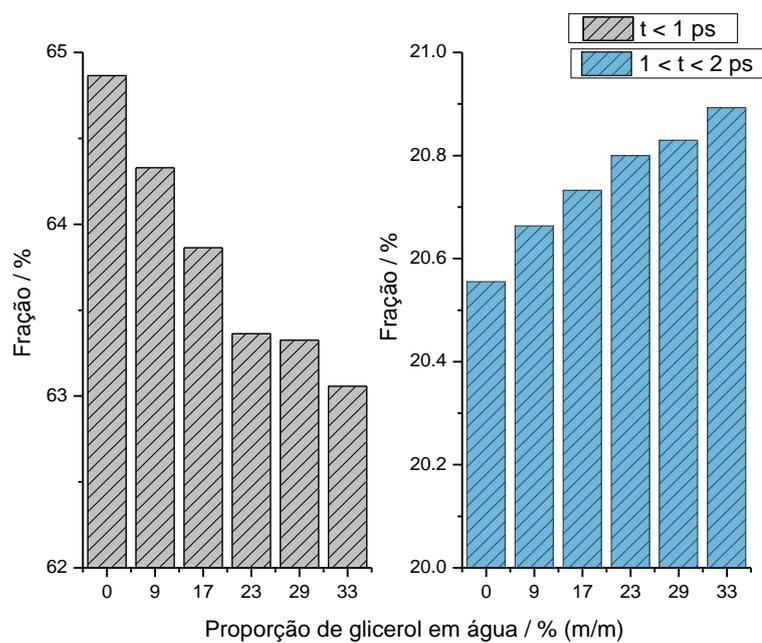


Figura 4.5. Fração de observação das ligações de hidrogênio proteína-água com tempo de sobrevivência menor do que 1 ou entre 1 e 2 ps.

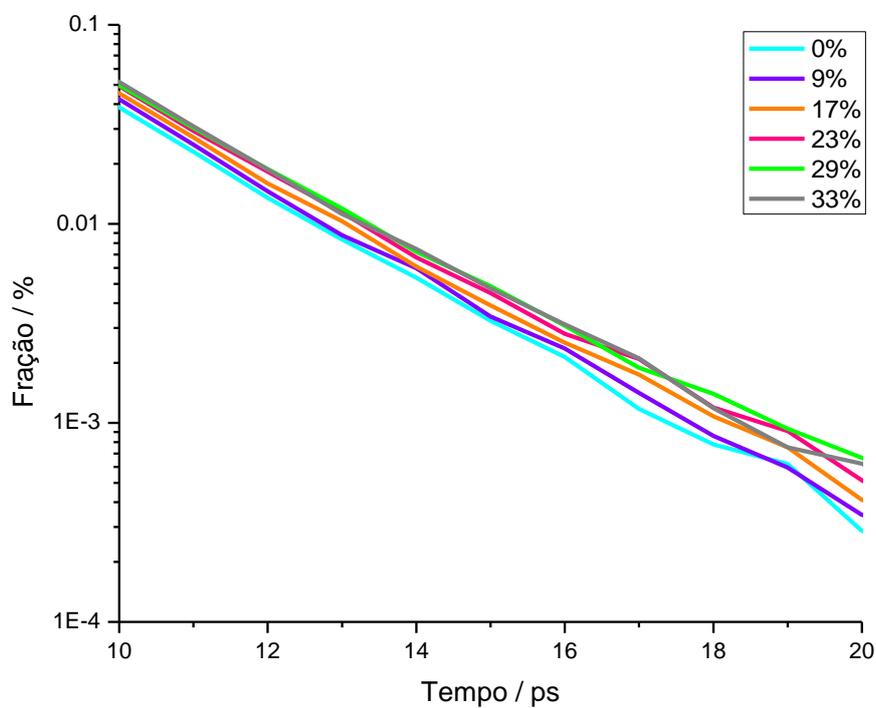


Figura 4.6. Fração de observação em função do tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio proteína-água para ligações com maior tempo de sobrevivência.

A seguir foi realizado o cálculo da função de distribuição soluto-solvente, sendo a proteína o soluto. Na Figura 4.7 mostra-se a função de distribuição proteína-água. As curvas correspondem ao valor médio das dez simulações independentes em cada proporção. O valor unitário do g_{ss} a partir de aproximadamente 6 Å indica que as moléculas de água localizadas a distâncias grandes da superfície da proteína são indiferentes à interação com ela, fazendo parte do *bulk*. A função de distribuição pode ser utilizada para calcular a energia livre da interação água proteína, conforme Eq. 4.1. O perfil de energia livre em função da distância mínima da superfície proteica está representado na Figura 4.8.

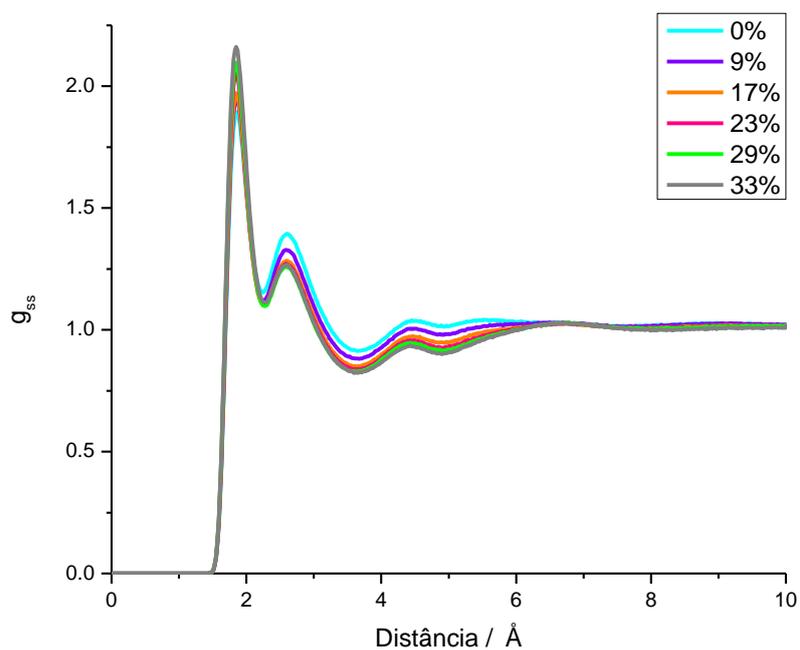


Figura 4.7. Funções de distribuição proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução.

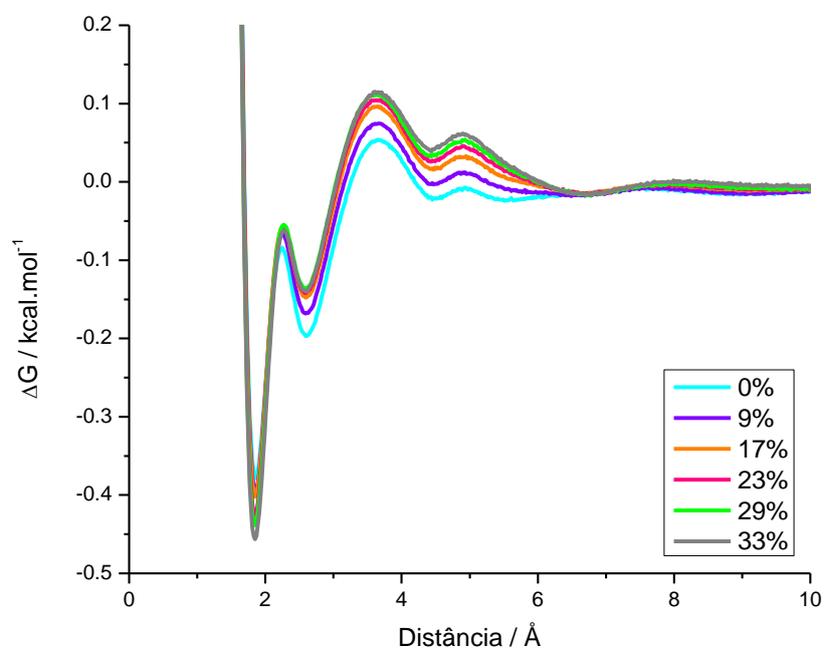


Figura 4.8. Perfis de energia livre da interação proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução.

Os dois vales de energia mínimas, referentes aos dois picos de g_{ss} , indicam distâncias da superfície proteica nas quais as interações com a água são mais favoráveis, levando a maior densidade relativa de moléculas de água. Esses vales representam assim as duas primeiras camadas de solvatação de água e são mostrados em mais detalhes na Figura 4.9.

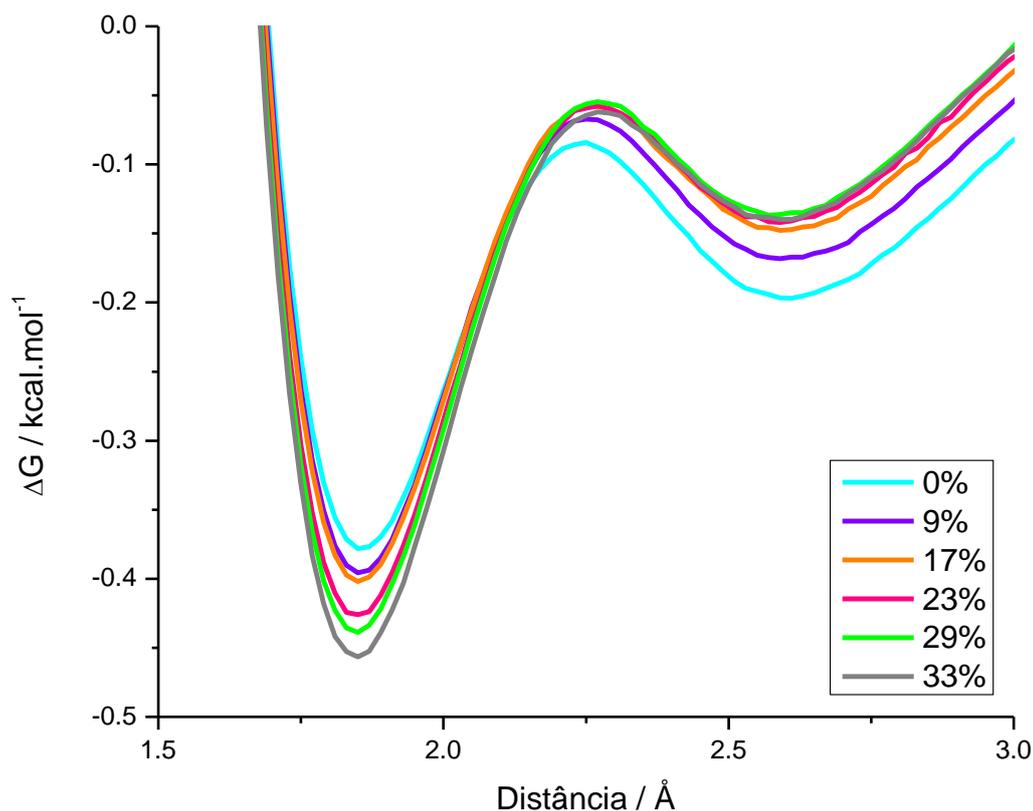


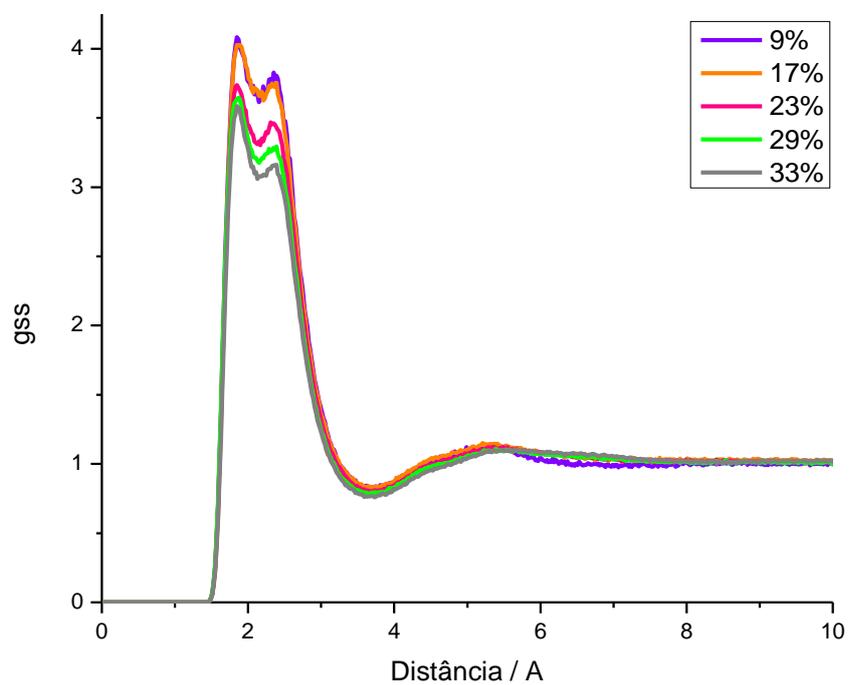
Figura 4.9. Detalhe dos perfis de energia livre da interação proteína-água para as diferentes proporções de glicerol em solução.

Observa-se mais claramente na Figura 4.9 que há variações gradativas na energia livre de interação com a mudança na concentração de glicerol. Com o aumento da proporção de glicerol, ocorre estabilização das moléculas de água na primeira camada de solvatação, como indicado pelos valores de energia livre mais negativos de 0 a 33% (m/m). Essa estabilização pode parecer surpreendente dado que foi verificada exclusão de moléculas de água realizando ligações de hidrogênio com a proteína com a adição de glicerol, conforme Figura 4.3. Porém, a função de distribuição e o perfil de energia livre evidenciam que, ainda que a densidade de

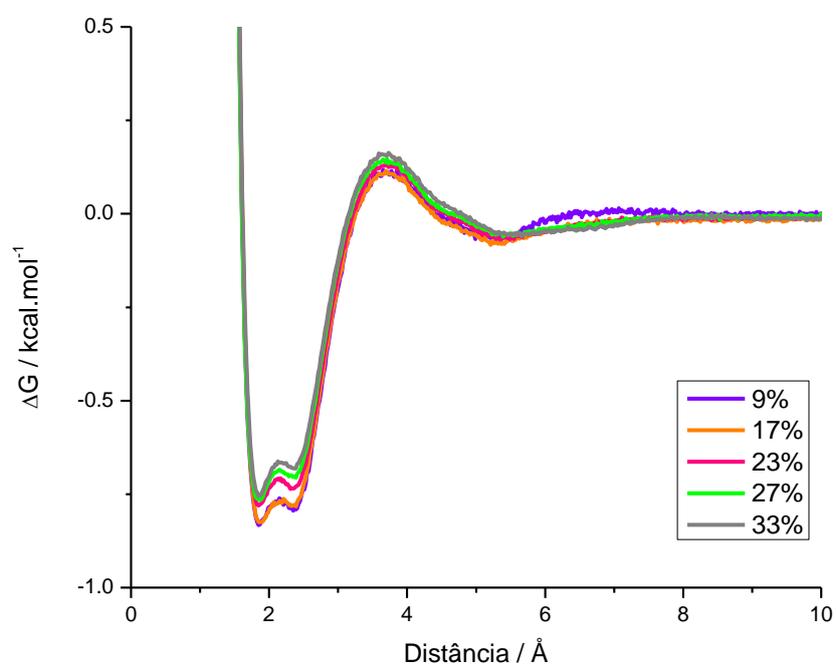
moléculas de água próximas à proteína reduza com o incremento na concentração de glicerol, ela não acompanha a redução na densidade de moléculas de água no *bulk*. A presença do glicerol, portanto, resulta na estabilização da água na superfície da proteína.

Na segunda camada de solvatação ocorre comportamento oposto: a energia livre é mínima a 0%, e aumenta à medida que há mais glicerol em solução. Nesse caso, o aumento acentuado de 0 a 9% indica que há maior desestabilização da água nessas proporções, e que entre 23 e 33% já não há efeito da presença do glicerol. A desestabilização da água devido à adição de glicerol indica que o co-solvente tende a ocupar o volume correspondente à segunda camada de solvatação da água, excluindo-a dessas distâncias da superfície da proteína.

As funções de distribuição e os perfis de energia livre aplicados para o glicerol como solvente são expostos na Figura 4.10. Nas regiões de interação favoráveis proteína-glicerol, ocorre aumento da energia livre com aumento de concentração do co-solvente (Figura 4.10b), um indicativo de que a interação proteína-glicerol se torna menos favorável nessas condições.



(a)



(b)

Figura 4.10. (a) Funções de distribuição proteína-glicerol e (b) Perfil de energia livre da interação proteína-glicerol para as diferentes proporções de glicerol em solução.

A fim de investigar em mais detalhes a interação dos solventes com a proteína, o perfil de energia livre foi calculado para a água e o glicerol em relação aos diferentes tipos de resíduos da proteína: carregados, polares-não-carregados e hidrofóbicos. Os perfis de energia livre da interação entre cada um desses grupos de resíduos e os solventes estão na Figura 4.11. Neles são mostradas apenas as curvas correspondentes às proporções 0, 9, 23 e 33% glicerol/água para facilitar a visualização.

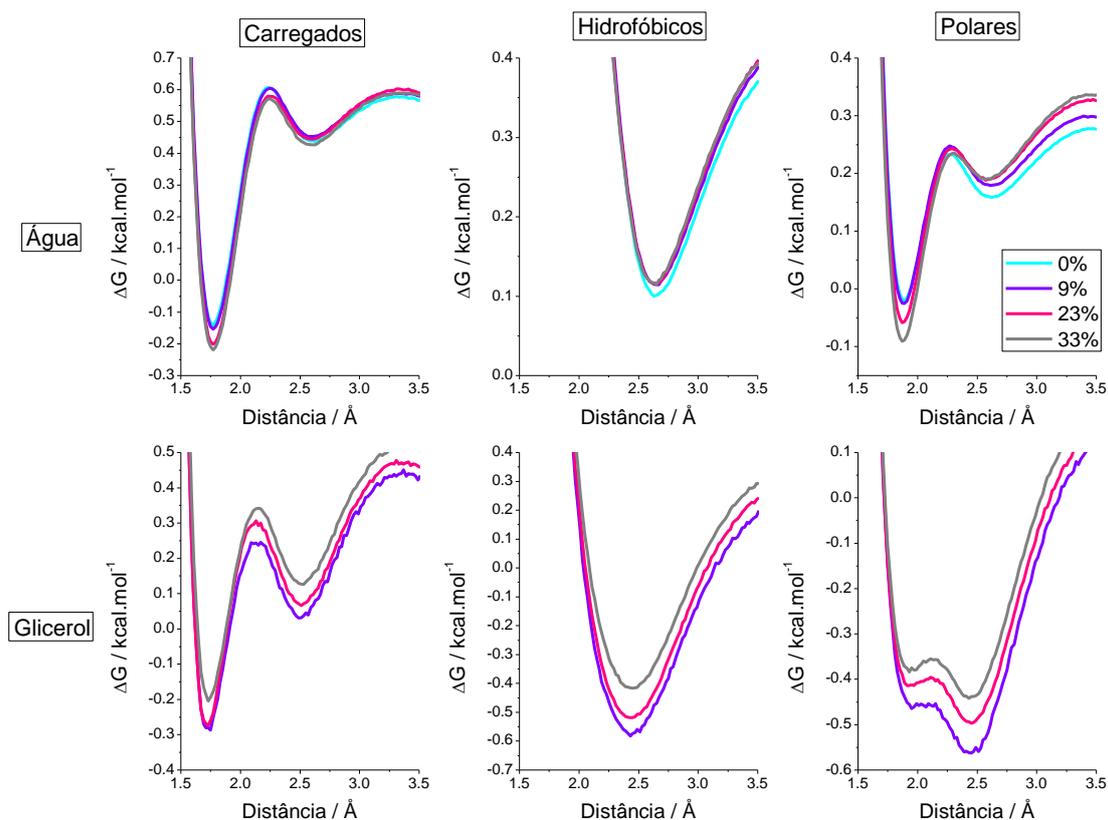


Figura 4.11. Detalhes dos perfis de energia livre da interação proteína-água e proteína-glicerol para os diferentes tipos de resíduos.

O formato dos perfis de energia livre entre resíduos carregados-água e polares-água são semelhantes, apresentando um primeiro vale mais pronunciado, correspondente às interações por ligações de hidrogênio. Não há esse vale para os resíduos hidrofóbicos, devido à ausência de ligações de hidrogênio com as cadeias laterais. O primeiro vale de energia livre para água e resíduos carregados e polares apresenta valores gradualmente mais negativos para

maiores concentrações de glicerol, uma tendência já observada para a interação com a proteína como um todo (Figura 4.9). Por sua vez, nos respectivos vales para o glicerol, ocorre o comportamento oposto, ou seja, desestabilização da interação proteína-glicerol. Ocorre assim hidratação preferencial nos resíduos carregados e polares da superfície da proteína, em detrimento da interação glicerol-proteína.

Referentemente à água na segunda camada de solvatação, comportamentos distintos entre a solvatação dos resíduos são observados. Para os resíduos carregados, não há variação significativa nos valores de energia livre entre as diferentes proporções de glicerol em água, havendo somente pequenas flutuações, provavelmente devido a diferenças de amostragem entre as simulações independentes. Valores próximos de energia livre entre as diferentes proporções indicam que não há variação na intensidade de interação entre resíduos carregados e água, comportamento que não havia sido observado até o momento. Já para os dois outros tipos de resíduos, um aumento mais pronunciado na energia livre é visto com a adição de 9% em massa de glicerol, com variações cada vez menores para as outras proporções. A mudança na energia livre de 0 a 9% se deve à exclusão expressiva de moléculas de água da segunda camada de solvatação pelo glicerol. As simulações com maiores concentrações de glicerol também indicam a exclusão da água pelo glicerol, mas ela se dá em menor proporção, de modo que de 23 a 33% não há diferenças significativas e entende-se que a eliminação de água na segunda camada de solvatação passa a acompanhar a redução de concentração de água da solução.

No caso das funções de distribuição proteína-glicerol, os perfis de energia livre associados a todos os tipos de resíduos se tornam mais positivos com o aumento da concentração de glicerol. Isso indica que, apesar de haver exclusão da água pelo solvente orgânico, ainda assim o glicerol tem a intensidade de sua interação com a proteína proporcionalmente reduzida.

Finalmente, observando-se os valores de energia livre da interação dos solventes com os diferentes tipos de resíduos, mostrados na Figura 4.12, verifica-se que para a água os valores mais negativos são alcançados com os resíduos carregados, enquanto para o glicerol isso ocorre com os resíduos hidrofóbicos e polares. Desse modo, a partição da água na superfície da proteína não é uniforme, e esta interage preferencialmente com os resíduos carregados. Já o glicerol se concentra nos resíduos hidrofóbicos e polares, interagindo preferencialmente com eles em relação aos resíduos carregados. Também é possível ver que,

na primeira camada de solvatação, os solventes são estabilizados mais próximos de resíduos carregados que de resíduos polares, provavelmente causado pela maior intensidade de interação resíduos carregados-solventes devido às suas cargas localizadas.

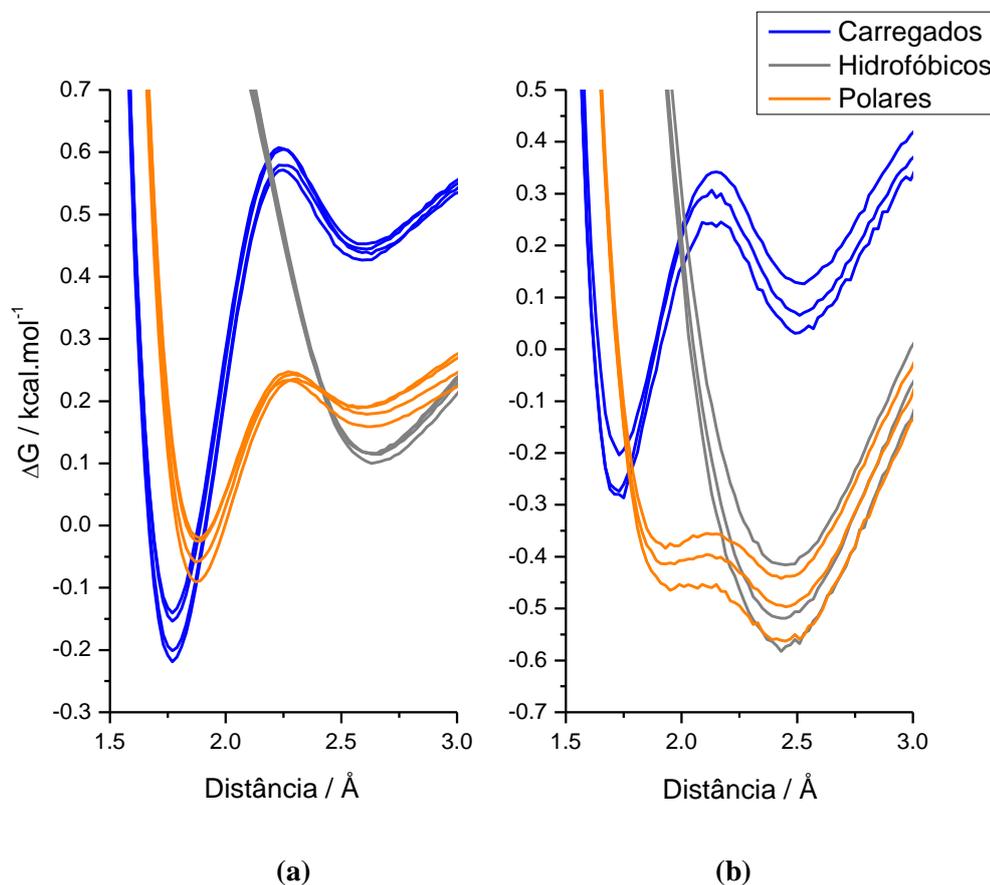


Figura 4.12. Detalhes das funções de distribuição (a) proteína-água e (b) proteína-glicerol para os diferentes tipos de resíduos.

Em seguida buscamos estender a análise da interação entre solventes e os diferentes tipos de resíduos levando em consideração também a posição destes na proteína e exposição ao solvente. Na Figura 4.13 a diferença no número médio de moléculas de solvente solvatando a proteína de 0 a 33% glicerol (m/m) foi calculado para cada resíduo separadamente. Para a contagem do número de moléculas solvatando cada resíduo foi utilizado um *cutoff* de 3 Å. Observa-se que as variações no número de moléculas de água e glicerol são bastante simétricas, mas que o aumento no número de moléculas de glicerol não se dá na mesma proporção que a redução no número de moléculas de água.

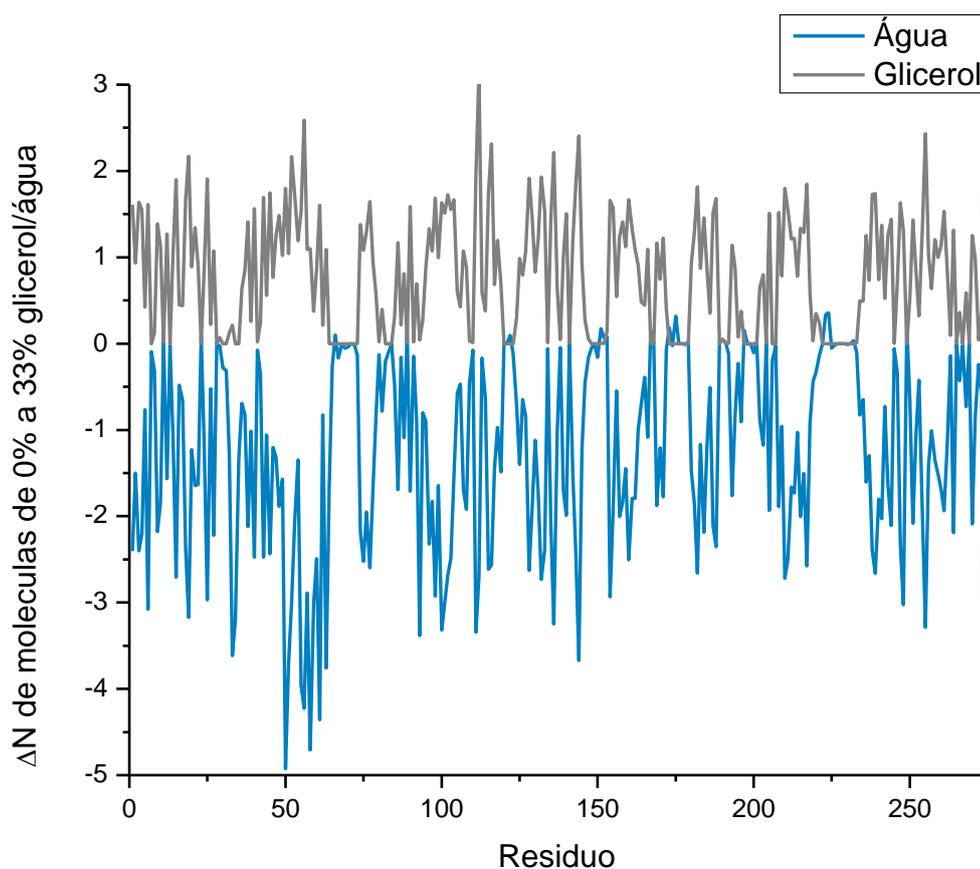


Figura 4.13. Variação no número médio de moléculas de solvente a até 3 Å de cada resíduo entre 0 e 33% glicerol (m/m).

A variação no número de moléculas de glicerol como função da variação no número de moléculas de água está representada na Figura 4.14. Existe um comportamento comum, representado pela reta de regressão obtida através de um ajuste que elimina valores discrepantes⁷⁷. A tendência comum indica o padrão de substituição da água pelo glicerol para os resíduos em geral: em média 0,67 moléculas de glicerol por molécula de água excluída. Interpretamos esta substituição comum como sendo determinada pelos diferentes volumes moleculares e natureza química dos solventes, quando a estrutura não impõe outras restrições.

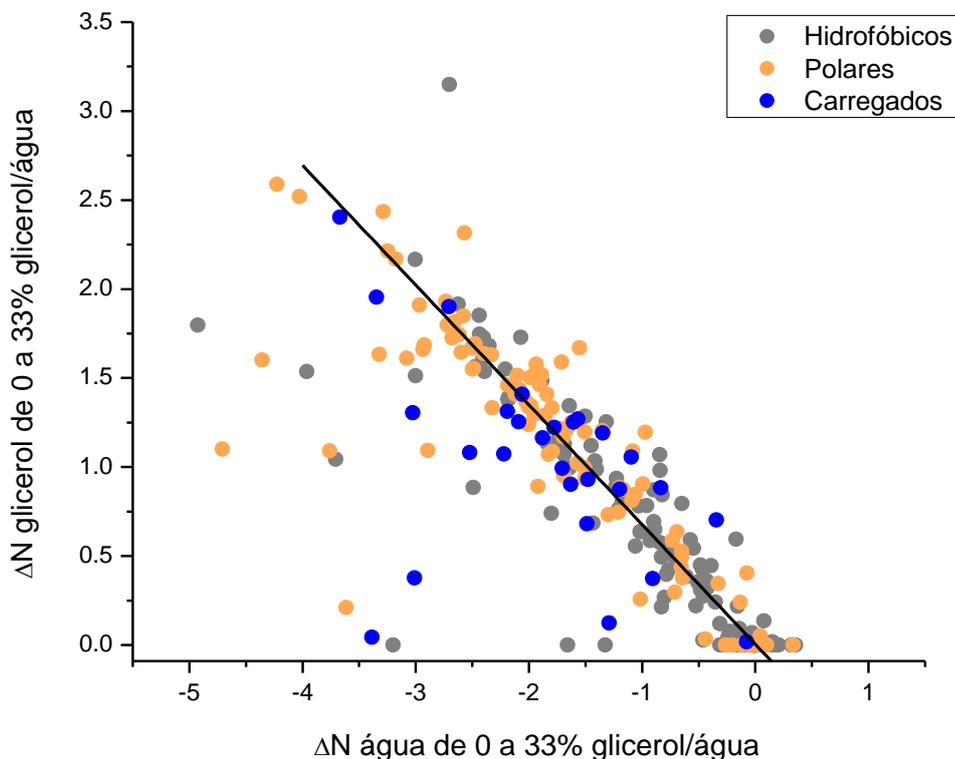


Figura 4.14. Aumento no número de moléculas de glicerol a até 3 Å em função da redução do número de moléculas de água à mesma distância de cada resíduo entre 0 e 33% glicerol (m/m). A reta representa a tendência comum para os resíduos, desconsiderando os valores discrepantes.

Há, no entanto, alguns resíduos que fogem dessa tendência. O único resíduo com variações notadamente discrepantes favorecendo a solvatação por glicerol é o único triptofano da estrutura. Esse resíduo destaca-se dos outros pois, como será discutido mais profundamente no próximo capítulo, durante as simulações ocorrem mudanças na orientação da sua cadeia lateral, com grande influência na sua exposição ao solvente. Conforme será discutido, observa-se grande tendência de solvatação por glicerol quando este resíduo está em uma de suas conformações (Figura 4.15), o que provavelmente resulta nesse comportamento médio discrepante.

Os outros resíduos que se destacam apresentam redução na solvatação por água mas sem haver substituição por glicerol. Apesar de se encontrarem próximos à superfície, suas cadeias laterais são localizadas entre loops pouco flexíveis, de forma que a inserção das moléculas maiores de glicerol é mais dificultada do que para a água. Isso é exemplificado na Figura 4.15 para os resíduos com $\Delta N_{\text{água}}$ entre -3 e -4 e $\Delta N_{\text{glicerol}}$ menor que 0,5 (Thr33,

Gly34, Asp60 e Lys94). As ligações de hidrogênio intramoleculares realizadas por esses resíduos foram verificadas em 0 e 33%. A redução no número de moléculas de água a até 3 Å leva Thr33, Asp60 e Lys94 a realizarem um maior número de ligações de hidrogênio com outros resíduos da proteína, compensando a perda dessas interações estabilizadoras. Apenas Gly34 não apresenta alteração no número de ligações de hidrogênio intramoleculares, que permanece nulo tanto em água pura quanto em 33% glicerol.

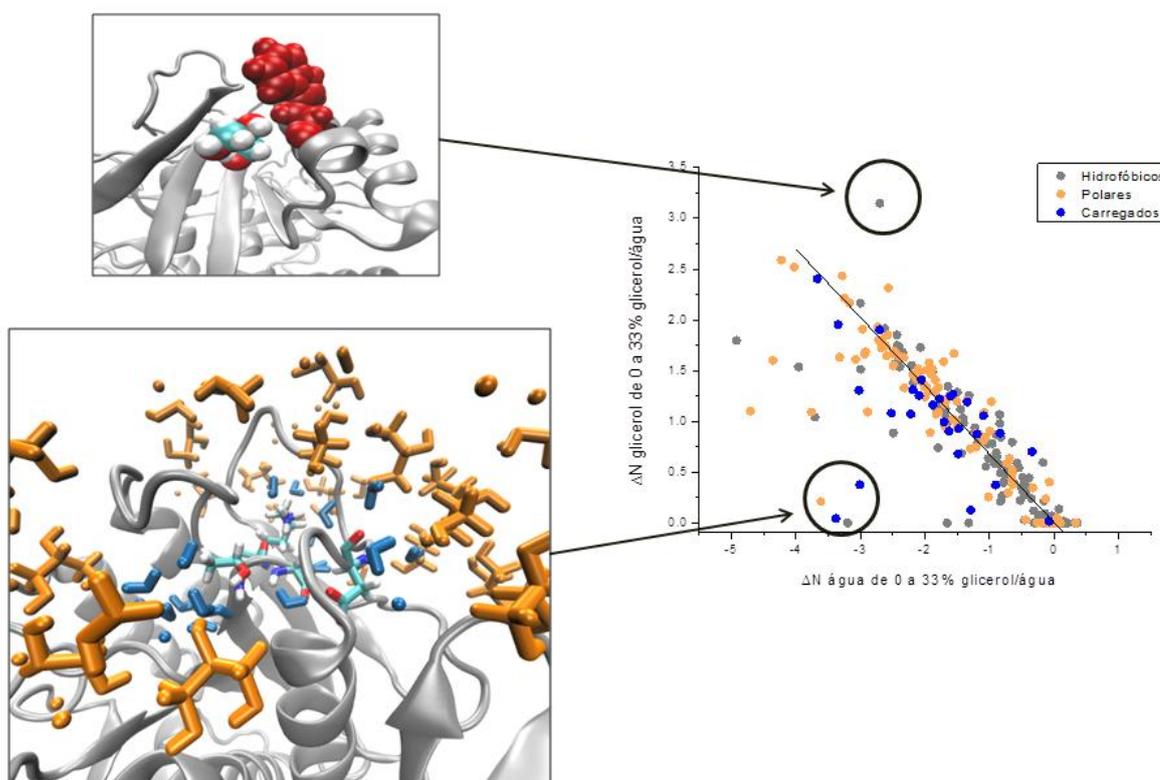


Figura 4.15. Representação molecular de alguns dos valores discrepantes da Figura 4.14. Na imagem superior esquerda o triptofano é representado em vermelho e uma molécula de glicerol é destacada. Na imagem inferior esquerda, são mostrados os resíduos Thr33, Gly34, Asp60 e Lys94. Água (azul) é representada a até 5 Å dos resíduos e glicerol (laranja) a até 10 Å.

Por fim, a relação da variação no número de moléculas de solventes com a posição na proteína e polaridade de cada resíduo pode ser visualmente verificada na Figura 4.16. A redução no número de moléculas de água solvatando a proteína e o aumento no número de moléculas de glicerol são mais pronunciados em resíduos da superfície proteica, em particular em regiões de *loop*. Fica evidente também que, apesar de haver redução no número

de moléculas de água solvatando os resíduos catalíticos (destacados), não há interação pronunciada destes com moléculas de glicerol a 33% (m/m). Além disso, o núcleo majoritariamente hidrofóbico de SC não apresenta exclusão de água ou penetração por glicerol. A ausência de co-solvente no núcleo da proteína e no sítio catalítico são consistentes com a preservação da atividade proteica nessas condições.

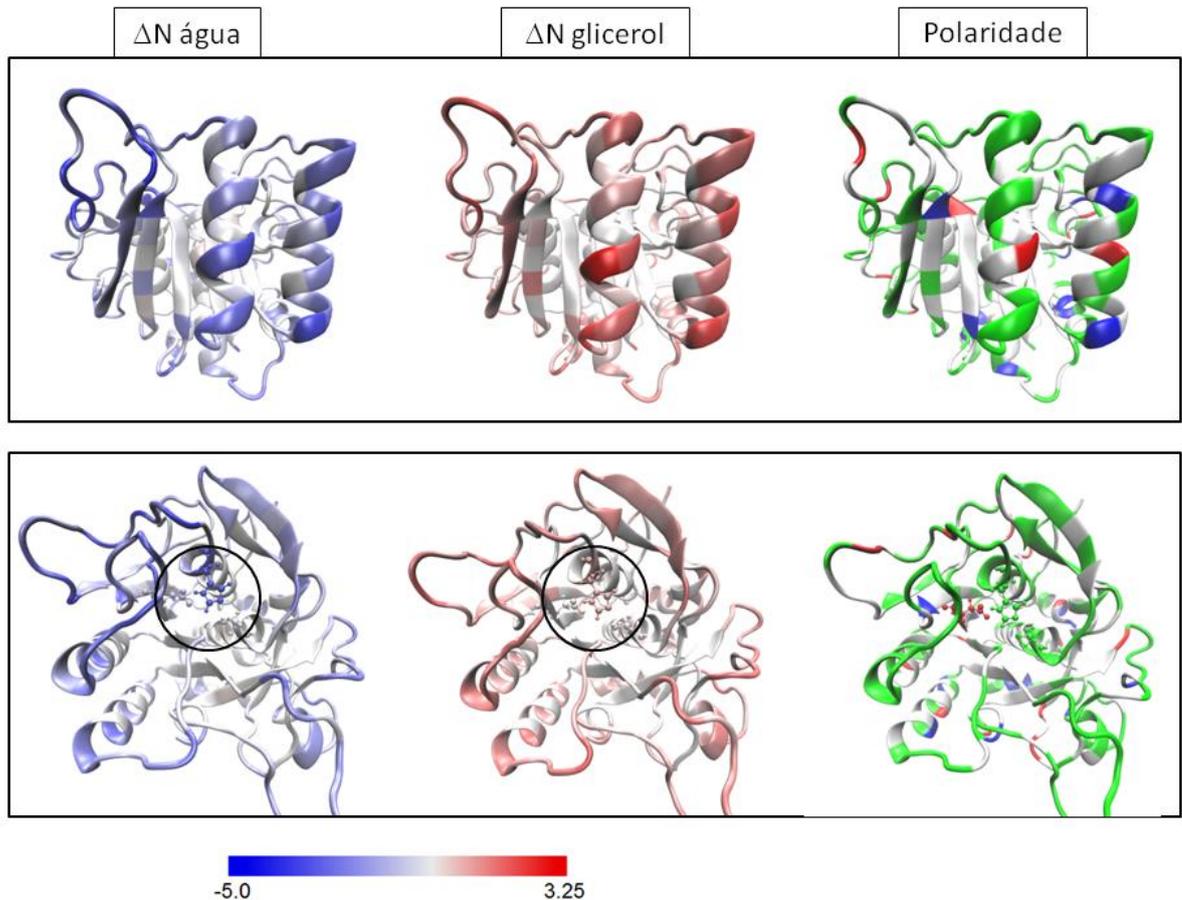


Figura 4.16. Duas vistas de SC, destacando a variação no número de moléculas de água (ΔN água, imagens à esquerda) e glicerol (ΔN glicerol, imagens centrais) a até 3 Å de cada resíduo. Nas imagens à direita são indicadas as polaridades dos resíduos: carregados em azul e vermelho, hidrofóbicos em branco e polares em verde.

4.2.3. Adsorção de glicerol na superfície proteica

As desestabilizações progressivas da interação proteína-glicerol (Figuras 4.10 e 4.11) com aumento da concentração de glicerol sugerem a ocorrência de um processo de saturação dos sítios que interagem com o co-solvente. Para estudar essa possibilidade, procuramos descrever estas interações segundo um modelo de adsorção, sendo o glicerol o adsorbato. Na Figura 4.17 mostra-se o número médio de moléculas de glicerol presentes em distâncias menores que a do segundo mínimo da energia livre, para cada tipo de resíduo separadamente. A unidade de concentração de mol.L⁻¹ foi usada em vez de proporção mássica pois as curvas de saturação costumam ser dadas nessa unidade de concentração. Vê-se que, a partir de aproximadamente 23% (concentração de glicerol de 2,48 mol.L⁻¹), o aumento no número de moléculas de glicerol próximas à proteína deixa de ser proporcional ao aumento na concentração total. As curvas indicam que nas concentrações simuladas inicia-se um processo de saturação da superfície da proteína, mas até a proporção de 33% esta se encontra longe da saturação completa.

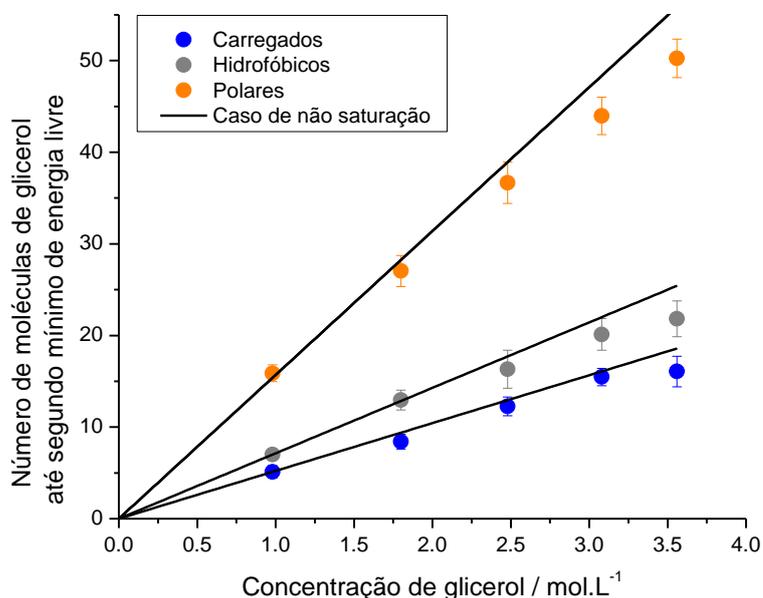


Figura 4.17. Número médio de moléculas de glicerol até o segundo mínimo de energia livre em função da concentração. As linhas constantes representam a extrapolação para condição sem saturação.

A saturação dos sítios foi investigada através de dois modelos de adsorção, de

Langmuir e de Freundlich. O modelo de Langmuir é um modelo mais simples, que supõe a adsorção em sítios equivalentes, na forma de monocamadas. A adsorção é representada pela reação entre o adsorbato e o sítio vazio, levando à formação de um complexo, com uma constante de equilíbrio K_{eq} . A partir dessas suposições, a equação da isoterma de Langmuir é derivada como mostrada na Eq. 4.2⁷⁸. Ela também é representada na sua forma mais comum, linearizada, na Eq. 4.3., onde N_{ads} é a concentração da substância adsorvida em uma quantidade determinada de adsorbente, aqui utilizada como número de moléculas de glicerol próximas à proteína. N_{max} é a concentração máxima de adsorbato que pode ser absorvida (nesse caso número de moléculas de glicerol/proteína), também chamado de capacidade máxima de adsorção, K_{eq} a constante de equilíbrio da adsorção, relacionada com a energia livre da interação adsorbato-sólido, e c a concentração de adsorbato em solução⁷⁹.

$$N_{ads} = \frac{N_{max} \cdot K_{eq} \cdot c}{(1 + K_{eq} \cdot c)} \quad (4.2) \qquad \frac{c}{N_{ads}} = \frac{1}{N_{ads} \cdot K_{eq}} + \frac{c}{N_{max}} \quad (4.3)$$

Já o modelo de Freundlich é um modelo empírico, que descreve melhor a adsorção quando esta ocorre na forma de multicamadas e em sítios não uniformes (Eq. 4.4). A forma linearizada da equação também é usada mais frequentemente para os cálculos dos parâmetros de adsorção (Eq. 4.5).

$$N_{ads} = K_F \cdot c^{1/n} \quad (4.4) \qquad \log(N_{ads}) = \log K_F + \frac{1}{n} \log(c) \quad (4.5)$$

A interpretação física dos parâmetros de Freundlich não é trivial, e há grande ambiguidade na literatura. A forma da equação 4.4 evidencia que o parâmetro n determina a rapidez com que N_{ads} aumenta com a concentração de adsorbato em solução, de forma que é relacionado com a afinidade dos sítios. Supondo-se que os sítios de adsorção são heterogêneos, em concentrações baixas de adsorbato os sítios de maior afinidade seriam preenchidos, e em concentrações altas os sítios de menor afinidade. O fato do expoente ser n^{-1} , no entanto, resulta em comportamentos distintos dependendo do valor de c . Para concentrações de adsorbato menor do que a unidade, N_{ads} aumenta conforme n aumenta. Já quando c é maior do que 1, há inversão na tendência e N_{ads} diminui com o aumento de n . Valores de n maiores, portanto, implicam em adsorção rápida em concentrações baixas seguidas de adsorção mais lenta conforme há maior concentração de adsorbato. Isso sugere uma maior diferença entre as afinidades dos sítios de maior e menor afinidades, ou seja, n é

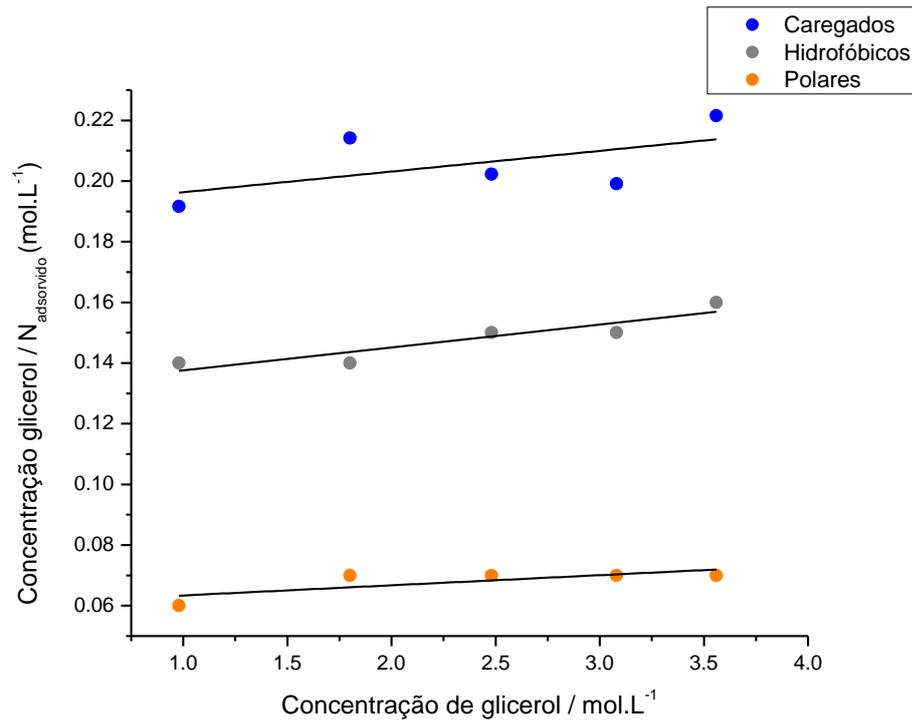
um indicativo da diversidade dos sítios de ligação. Desse modo, quanto maior n , mais heterogênea é a superfície⁸⁰. O segundo parâmetro, K_f , não tem uma interpretação clara, pois está relacionado tanto com o número de sítios quanto com as afinidades.

Os dados foram tratados de acordo com a forma linearizada dos modelos (Figura 4.18), e os parâmetros calculados estão organizados na Tabela 4.2.

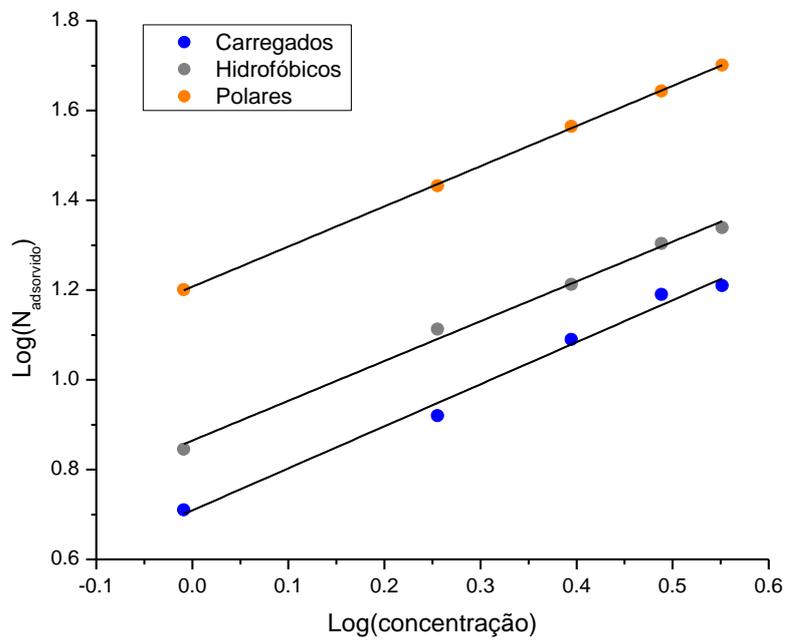
Tabela 4.2. Parâmetros de Langmuir e de Freundlich para adsorção do glicerol na proteína

Resíduos adsorbentes	Langmuir			Freundlich		
	r	K_{eq} (L/mol)	N_{max} (glicerol/proteína)	r	K_f (glicerol/proteína)/(L/mol) ^(1/n)	n
Carregados	0,58	0,036	146,63	0,99	5,12	1,07
Hidrofóbicos	0,92	0,058	132,63	0,99	7,32	1,13
Polares	0,76	0,056	303,03	0,99	16,12	1,12

A linearização dos dados na Figura 4.18 e os valores de r de Pearson sugerem que estes são melhor adaptados ao modelo de Freundlich, um modelo provavelmente mais adequado para descrever a superfície irregular e com variação de potencial eletrostático de uma proteína. No entanto, ambas as isotermas não linearizadas construídas utilizando os parâmetros da Tabela 4.2 fornecem bom ajuste para os dados na faixa de concentração estudada, conforme mostrado na Figura 4.19.



(a)



(b)

Figura 4.18. Isotermas de adsorção linearizadas do glicerol na superfície da proteína segundo os modelos de (a) Langmuir e (b) Freundlich.

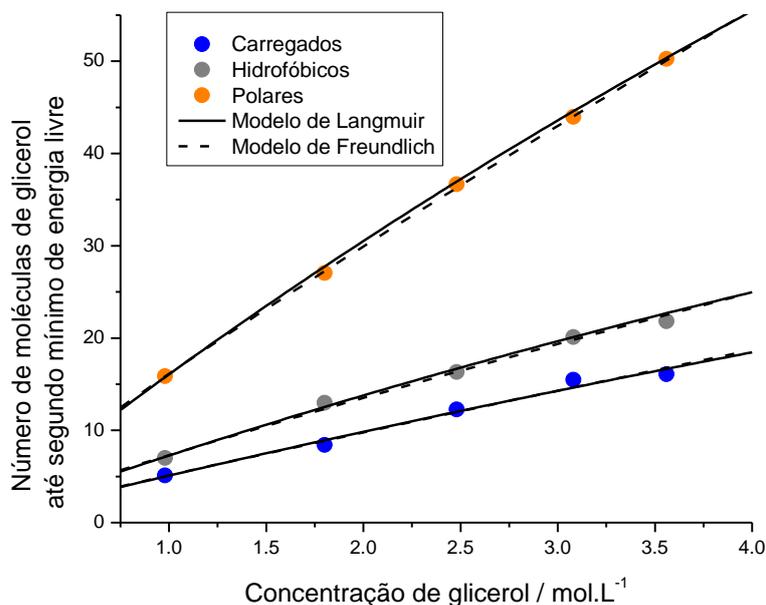


Figura 4.19. Dados de adsorção do glicerol das simulações e isoterma de adsorção previstas pelos modelos de Langmuir e Freundlich. As isoterma foram construídas utilizando os parâmetros calculados na forma linear.

Segundo o modelo de Langmuir, cujos parâmetros são mais facilmente interpretados, os resíduos polares apresentam maior capacidade de adsorção do solvente, como se deduz do valor elevado de N_{max} . Esse comportamento provavelmente está relacionado com o fato de que há um maior número de resíduos polares localizados na superfície de SC. Além disso, K_{eq} para os resíduos hidrofóbicos e polares são similares, e maiores do que para os resíduos carregados, indicando que a interação do glicerol com os resíduos hidrofóbicos e polares é semelhante, e a adsorção nestes é mais favorável do que nos resíduos carregados.

O parâmetro n do modelo de Freundlich pode indicar certa heterogeneidade nos sítios de adsorção para todos os resíduos, dado que é maior do que 1 em todos os casos. De qualquer maneira, deve ser mantido em mente que, nas concentrações estudadas, o sistema se encontra distante da saturação. Novos estudos em concentrações mais altas de glicerol devem permitir melhores estimativas dos parâmetros.

Outra possível causa das desestabilizações progressivas da interação proteína-glicerol com a concentração de glicerol é a formação de clusters de glicerol no *bulk* da solução. A formação de clusters de trealose foi observada em um estudo de simulação computacional³⁸.

A similaridade das funções de distribuição glicerol-glicerol a 10 e 33% (m/m) (Figura 4.2), no entanto, elimina esta possibilidade, evidenciando que se tratam de soluções homogêneas. Caso houvesse formação de clusters, seria esperado um aumento pronunciado na função de distribuição em curtas distâncias, devido ao aumento de densidade relativa próximas a moléculas de glicerol.

4.3 Conclusões

Neste capítulo a solvatação da proteína subtilisina Calrsberg em meios com glicerol e água foi estudada a partir de simulações de dinâmica molecular em seis concentrações, variando de 0 a 33% glicerol (m/m). Primeiramente, funções de distribuição dos solventes foram calculadas para simulações realizadas na ausência da proteína. Os perfis calculados concordaram com valores disponíveis na literatura e evidenciaram que os solventes formam misturas homogêneas nas faixas de concentrações estudadas.

A solvatação de SC foi verificada por meio do cálculo do número de ligações de hidrogênio realizadas pela proteína com os solventes e com ela mesma, do tempo de sobrevivência das ligações de hidrogênio realizadas com a água, e da função de distribuição e energia livre de interação proteína-água e proteína-glicerol. A energia livre também foi calculada para a interação entre os solventes e os diferentes tipos de resíduos da proteína: carregados, polares-não-carregados e hidrofóbicos. A variação no número de moléculas de solventes a até 3 Å de cada resíduo entre 0 e 33% glicerol/água foi calculada e relacionada com a posição e exposição destes na proteína e suas polaridades. Finalmente, a hipótese de saturação da superfície proteica pelo glicerol foi investigada segundo os modelos de isoterma de Langmuir e de Freundlich.

Foi verificado que em misturas contendo glicerol e água, a proteína interage com ambos os co-solventes. A adição do glicerol leva à exclusão de parte das moléculas de água próximas à proteína, mas essas interações perdidas são substituídas por interações com o glicerol ou com outros resíduos da proteína. A presença do glicerol em solução leva a uma leve redução na taxa de substituição de ligações de hidrogênio e concentração relativa de água a distâncias pequenas da superfície da proteína. Verifica-se também que, com a adição do solvente orgânico, a interação proteína-glicerol perde progressivamente importância em

relação à interação proteína-água. Esses resultados favorecem a hipótese de hidratação preferencial, mas não há partição definida entre os solventes na superfície da proteína. Além disso, a água interage preferencialmente com os resíduos carregados, e o glicerol, com os resíduos hidrofóbicos e polares.

As sutis estabilização da interação da proteína com a água da primeira camada de solvatação e redução da taxa de substituição de ligações de hidrogênio fornecem informações a nível molecular do efeito estabilizador do glicerol. No entanto, a pronunciada substituição de moléculas de água pelo co-solvente na superfície da proteína sugerem que a interação proteína-glicerol também pode estar relacionada com o efeito estabilizador do glicerol. Além disso, a ausência de penetração significativa de glicerol no interior hidrofóbico da proteína ou no sítio catalítico são consistentes com atividade enzimática nesses meios.

Por fim, observou-se que a adição de glicerol em uma solução aquosa pura leva à exclusão de parte das moléculas de água presentes na segunda camada de solvatação. Esse comportamento, no entanto, não é tão pronunciado para adições subsequentes de glicerol, resultado que sugere a hipótese de saturação da superfície da proteína ou formação de clusters em solução. As isotermas de adsorção obtidas indicaram que a adsorção do glicerol é mais favorável nos resíduos hidrofóbicos e polares do que nos carregados, e que os resíduos polares têm maior capacidade de adsorção. A formação de clusters não é sugerida pelas funções de distribuição glicerol-glicerol.

Capítulo 5

Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol

A solvatação de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol foi investigada experimentalmente através da técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo⁴⁶. A fim de correlacionar o resultado experimental com a dinâmica do fluoróforo em escala molecular, o cálculo da anisotropia de fluorescência foi realizado nas simulações de SC em diferentes proporções de glicerol. Neste capítulo serão apresentados os conceitos dessa técnica experimental, seguido das equações que permitem o cálculo da anisotropia a partir de simulações de dinâmica molecular. Em seguida serão discutidos os resultados obtidos a partir das simulações de SC.

5.1. Metodologia

5.1.1. A técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo

A anisotropia da emissão de uma sonda fluorescente excitada por luz polarizada depende da sua dinâmica reorientacional²⁶. Quando acoplada a uma proteína, a sua dinâmica reorientacional pode também ser influenciada pela dinâmica da proteína como um todo. Por essa razão, quando a sonda fluorescente encontra-se covalentemente ligada a uma proteína, essa técnica permite obter indiretamente informações sobre a mobilidade da macromolécula. Além disso, pelo fato da dinâmica reorientacional ser determinada pelas propriedades do meio em que o fluoróforo se encontra, a anisotropia de fluorescência pode ser usada para o estudo das propriedades dinâmicas do meio.

Os conceitos envolvidos nessa técnica estão esquematizados na Figura 5.1. Em uma solução de moléculas isotropicamente orientadas, aquelas orientadas de forma que o momento de dipolo de absorção seja aproximadamente paralelo à polarização da luz incidente

terão maior probabilidade de serem excitadas. Isso pois a probabilidade de absorção depende do ângulo entre o momento de dipolo de absorção e a polarização da luz, e é máxima quando esses vetores são paralelos. Esse é um fenômeno, portanto, de fotoseleção.

Cada molécula excitada eventualmente emitirá um fóton polarizado de acordo com a orientação de seu momento de dipolo de emissão. Logo após a excitação, os fluoróforos excitados apresentam momentos de dipolo de transição anisotrópicos devido à fotoseleção, e a luz emitida nesse momento apresenta polarização e anisotropia máximas. A polarização da fluorescência diminui à medida que os fluoróforos se reorientam em solução, o que faz com que cada fóton emitido apresente polarização diferente da do pulso de excitação⁸¹. Em tempo longo, a emissão torna-se completamente despolarizada. Assim, como a velocidade de despolarização da fluorescência depende da dinâmica reorientacional do fluoróforo, essa técnica fornece uma indicação da dinâmica do sistema estudado.

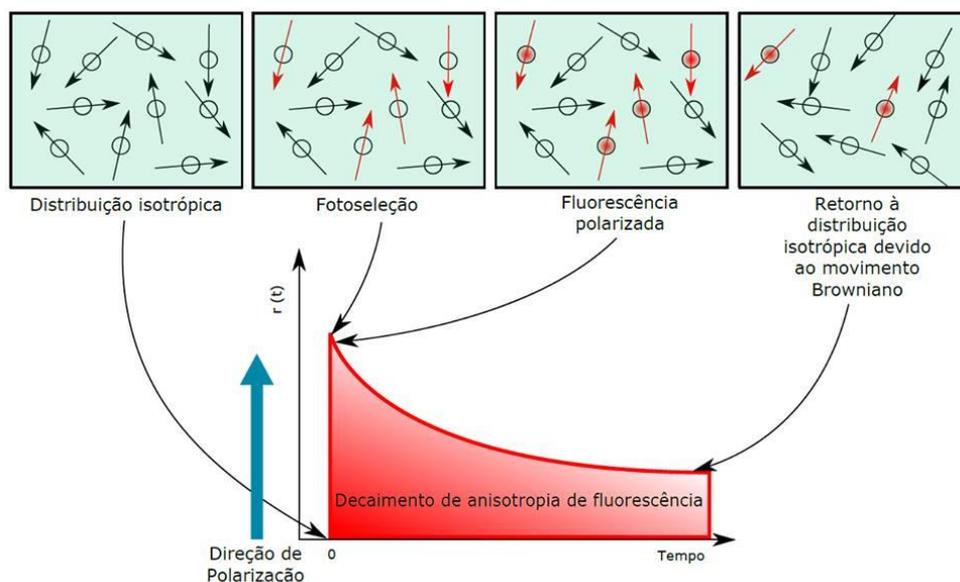


Figura 5.1. Representação esquemática dos eventos envolvidos após excitação de uma sonda fluorescente por luz polarizada. As flechas representam o vetor momento de dipolo de transição de moléculas do fluoróforo presentes em uma solução.

A anisotropia da fluorescência de uma solução de fluoróforos excitada por luz polarizada é acompanhada através da medida das intensidades de fluorescência com polarização paralela (I_{\parallel}) e perpendicular (I_{\perp}) à polarização do feixe de excitação, e é definida

na Eq. 5.1.

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (5.1)$$

A expressão experimental da anisotropia pode ser reescrita em função da dinâmica reorientacional dos vetores de momento de dipolo de absorção e emissão da molécula fluorófora, conforme Eq. 5.2,

$$r(t) = \frac{2}{5} \langle P_2[\mu_a(0) \cdot \mu_e(t)] \rangle \quad (5.2)$$

onde μ_a e μ_e são vetores normalizados orientados nas direções dos momentos de dipolo de absorção e de emissão, respectivamente, e $P_2(x) = \frac{1}{2}(3x^2 - 1)$ o polinômio de Legendre de segunda ordem^{82,83}. Essa equação permite que os resultados experimentais de anisotropia de fluorescência sejam reproduzidos a partir de simulações de dinâmica molecular^{84,85}, pois as trajetórias geradas nas simulações fornecem a orientação do momento de dipolo de absorção e emissão em função do tempo. A média na Eq. 5.2 é estimada a partir da média temporal calculada ao longo de toda a simulação para intervalos de tempo t_m (Eq. 5.3), onde o ângulo entre μ_a e μ_e para os instantes t_n e $t_n + t_m$, respectivamente, são calculados a partir da trajetória.

$$\langle P_2[\mu_a(0) \cdot \mu_e(t_m)] \rangle \cong \frac{1}{(N-m)} \sum_{n=1}^{N-m} P_2[\mu_a(t_n) \cdot \mu_e(t_n + t_m)] \quad (5.3)$$

O triptofano apresenta dois estados eletrônicos excitados de energias muito semelhantes, 1L_a e 1L_b , que são diferentemente estabilizados em função da polaridade do meio⁸⁶. O estado 1L_a sofre maior estabilização em solventes polares devido a interações entre o anel e as moléculas de solvente, e a direção do momento de dipolo de transição associado a esse estado foi portanto utilizado como o momento de dipolo de absorção do triptofano.

O ângulo entre os momentos de dipolo de absorção e emissão é dado pela Eq. 5.4, onde θ é o ângulo entre os dipolos e r_0 a anisotropia observada no instante inicial do experimento⁸⁴. O momento de dipolo de emissão foi calculado utilizando os valores de anisotropia de fluorescência iniciais obtidos experimentalmente para SC nas misturas de glicerol em água.

$$\frac{r_0}{0,4} = \frac{3 \cos \theta^2 - 1}{2} \quad (5.4)$$

Os valores de r_0 experimentais apresentaram variações nas diferentes misturas, de modo que o ângulo entre os vetores de absorção e emissão calculado pela Eq. 5.4 não foi constante para todos os cálculos. A variação, no entanto, é pequena, de 27,8° a 34,2°. Os momentos de dipolo utilizados para o cálculo em 0% glicerol estão representados na Figura 5.2.

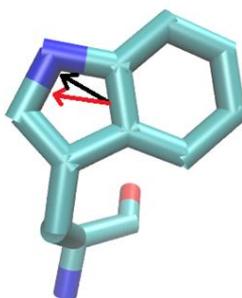


Figura 5.2. Representação do triptofano e dos momentos de dipolo de absorção (preto) e emissão (vermelho) em 0% glicerol. O momento de dipolo de absorção corresponde ao momento de dipolo de transição associado à excitação ao estado 1L_a . O momento de dipolo de emissão foi definido em função da anisotropia inicial, Eq. 5.4.

5.1.2. O estudo experimental de SC em água e glicerol

A relação entre mobilidade reorientacional e viscosidade do meio foi usada por Lakshmikanth e Krishnamoorthy para estudar a solvatação de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol, contendo 0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/m) de glicerol. A relação de Stokes-Einstein para um rotor esférico (Eq. 5.5) descreve a dependência do tempo de correlação rotacional (ϕ) com a viscosidade do meio (η), o volume molecular (V) e a temperatura⁴⁶

$$\phi = \frac{\eta V}{kT} \quad (5.5)$$

A presença de um único resíduo de triptofano em SC facilitou a escolha da sonda fluorescente, não sendo necessário o uso de um fluoróforo externo. Experimentalmente, a

excitação do triptofano foi realizada em 295 nm e a intensidade de fluorescência medida em 360 nm, um procedimento comum para estudos baseados na fluorescência de triptofanos em proteínas, pois assim evita-se a interferência dos outros resíduos fluorescentes: fenilalanina ($\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ems}} = 282 \text{ nm}$) e tirosina ($\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ems}} = 303 \text{ nm}$)⁸⁶. A pouca variação nos tempos de correlação rotacional obtidos dos decaimentos de anisotropia experimentais com o aumento da viscosidade do meio devido à adição de glicerol levaram os autores a concluir que há heterogeneidade no microambiente da proteína, com a água solvatando-a preferencialmente.

5.1.3. Preparo das configurações iniciais das simulações

Com o intuito de obter um entendimento microscópico do comportamento da proteína e da sonda obtidos experimentalmente, a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo foi calculada a partir das simulações de dinâmica molecular de SC em água e glicerol. As mesmas simulações estudadas no Capítulo 4 foram utilizadas nesta parte do projeto.

Experimentos de supressão da fluorescência com iodeto indicaram que o triptofano de SC encontrava-se exposto ao solvente⁴⁶. No entanto, a estrutura cristalográfica de SC apresenta o triptofano encaixado em um bolso hidrofóbico, representado na Figura 5.3. Por essa razão, foram geradas configurações iniciais para as simulações nas quais o triptofano foi exposto ao solvente. Para isso, uma simulação em alta temperatura (815K), em vácuo, com a proteína fixa exceto pela cadeia lateral do triptofano, foi realizada. A temperatura elevada foi utilizada para promover maior mobilidade da proteína e assim permitir que o triptofano acessasse um maior número de conformações. As conformações do triptofano na estrutura cristalográfica e na estrutura gerada e utilizada como ponto de partida para as simulações estão indicadas na Figura 5.4.

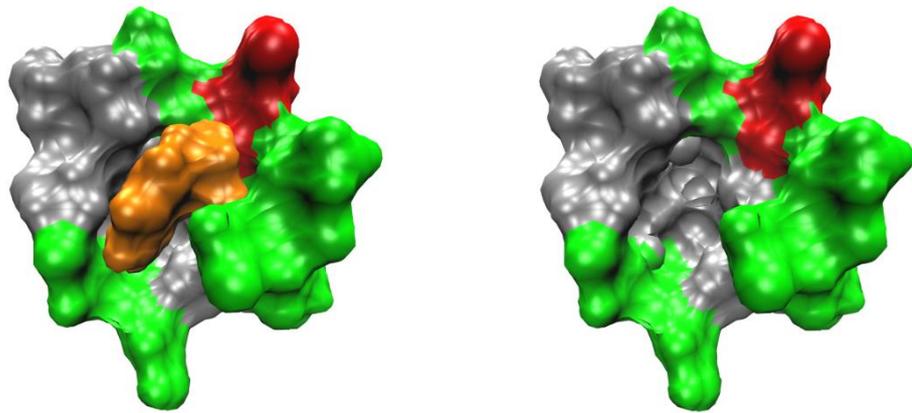


Figura 5.3. Visualização do bolso ocupado pelo triptofano (em laranja) na conformação cristalográfica usando representação *surface*. Resíduos apolares são mostrados em cinza, polares não carregados em verde e carregados em vermelho.

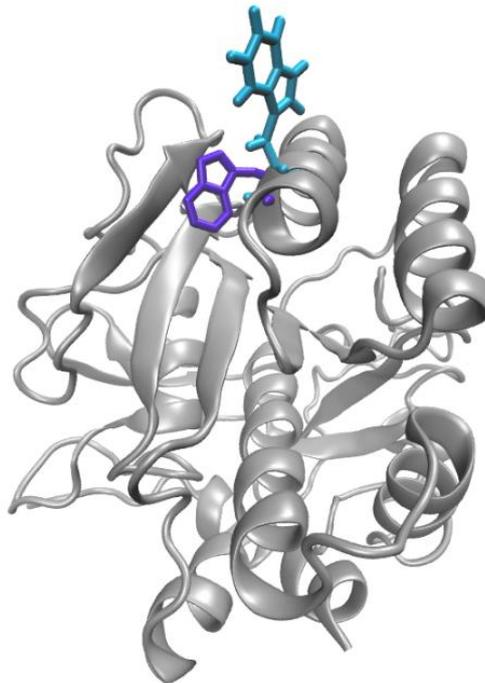


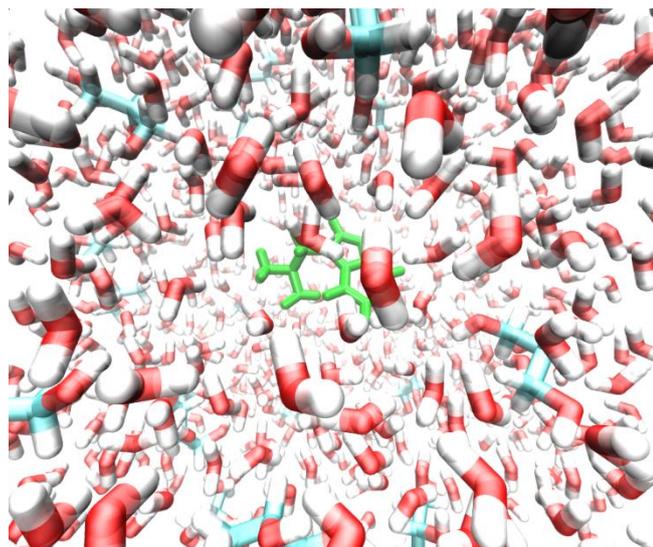
Figura 5.4. Representação das conformações do triptofano na estrutura cristalográfica de SC (em roxo) e na estrutura gerada a partir de simulação a 815K em vácuo com proteína fixa (ciano).

5.2. Resultados

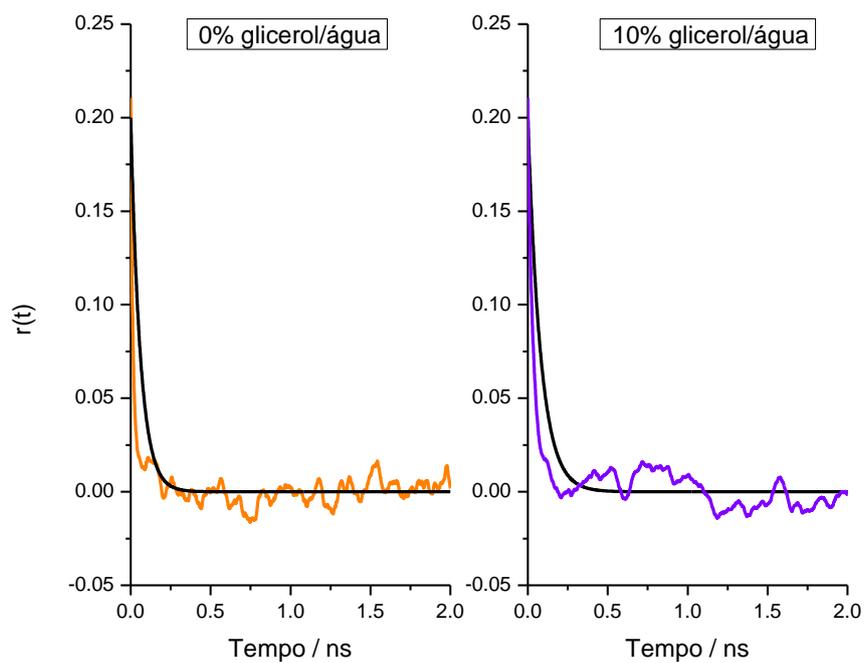
5.2.1. Anisotropia do triptofano livre em solução

O cálculo da anisotropia de fluorescência resolvida no tempo a partir de simulações de dinâmica molecular é possível pelo uso da equação 5.2^{84,85,87}. Buscou-se validar as condições de simulação, realizando-se o cálculo em um sistema mais simples: o aminoácido de triptofano livre em solução de glicerol em água (Figura 5.5a). Simulações do triptofano em 0 e 10% (m/m) glicerol/água foram conduzidas a 298 K e 1 atm por 20 ns. Os decaimentos de anisotropia de fluorescência previstos pelas simulações estão expostos na Figura 5.5b, comparados com os decaimentos experimentais do triptofano livre nas mesmas condições, reportados na literatura⁴⁶.

Os decaimentos de anisotropia obtidos a partir das simulações são ligeiramente mais rápidos do que os medidos experimentalmente, pois a total despolarização da anisotropia ocorre a tempos mais curtos. Um decaimento mais rápido em tempos curtos é geralmente esperado nas simulações em relação aos experimentos, porque estes podem não possuir resolução temporal suficiente para captar os movimentos mais rápidos. Estes exemplos mostram que as simulações são capazes de reproduzir razoavelmente bem os decaimentos experimentais, e que os decaimentos simulados são ligeiramente mais rápidos.



(a)



(b)

Figura 5.5. (a) Representação do sistema de triptofano (verde) em 10% glicerol/água e (b) Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo do triptofano livre em solução calculada a partir das simulações de dinâmica molecular (coloridas) e experimentais (pretas).

5.2.2. Anisotropia de subtilisina Carlsberg em misturas de água e glicerol

O cálculo da anisotropia de fluorescência resolvida no tempo foi estendido às simulações de SC em água e glicerol. Os decaimentos obtidos são apresentados na Figura 5.6, e na Figura 5.7 eles são comparados aos decaimentos experimentais⁴⁶.

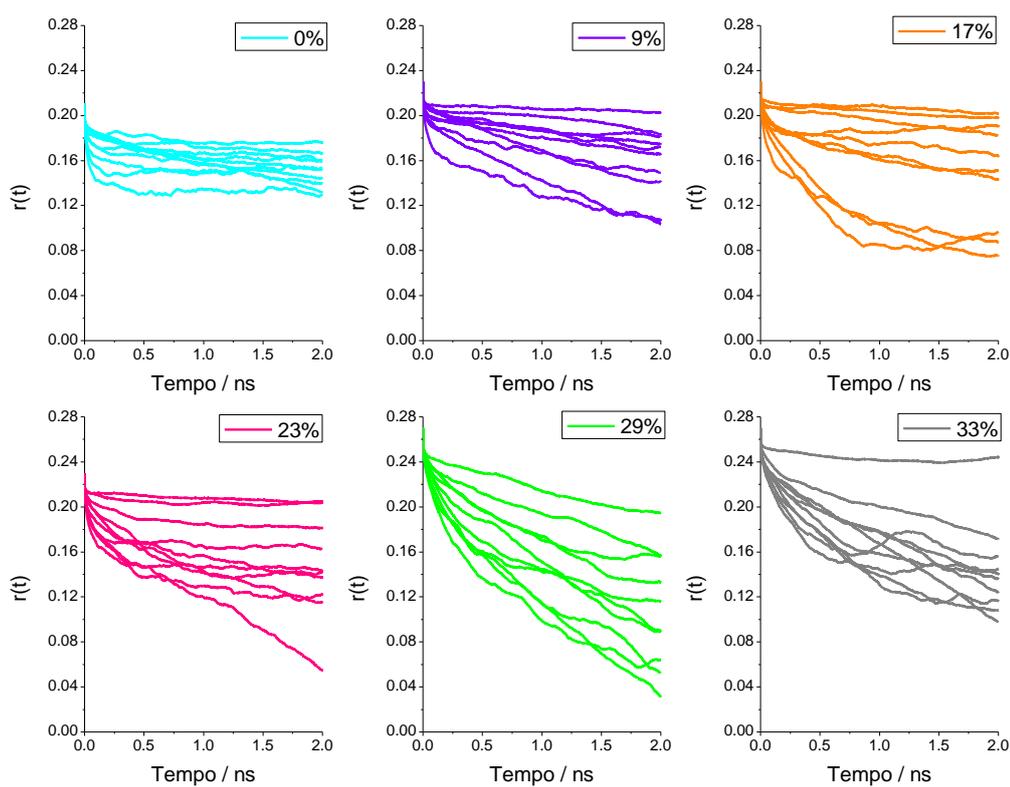


Figura 5.6. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular.

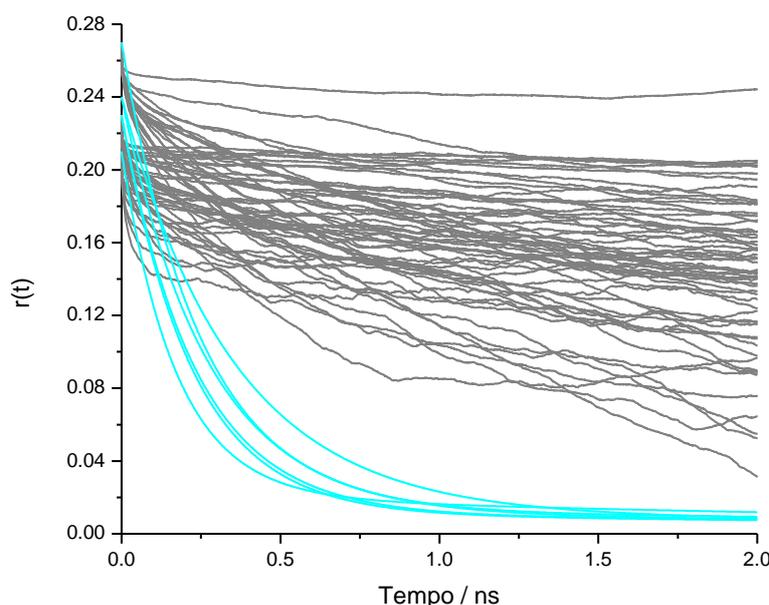


Figura 5.7. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular (preto) e experimentais (azul).

Verifica-se que há uma grande variação entre os decaimentos calculados a partir das trajetórias de SC e que, além disso, ao contrário dos resultados para o triptofano livre, eles diferem dos decaimentos experimentais. Os decaimentos experimentais são mais acentuados, o que implica em uma dinâmica reorientacional do triptofano mais rápida. A inspeção visual da dinâmica do triptofano e da proteína nas trajetórias geradas evidenciaram que as variações entre as curvas calculadas se devem principalmente à presença de duas populações de conformações do triptofano na proteína: uma na qual este encontra-se exposto ao solvente e apresenta grande liberdade de movimento (chamada de conformação A), e outra na qual o triptofano encontra-se no interior de um bolso majoritariamente hidrofóbico da proteína, com apenas uma lateral do anel indol exposta à água e movimentação muito restrita pela presença dos resíduos próximos (conformação B). Essa conformação corresponde ao triptofano na estrutura cristalográfica. As duas conformações são ilustradas na Figura 5.8.

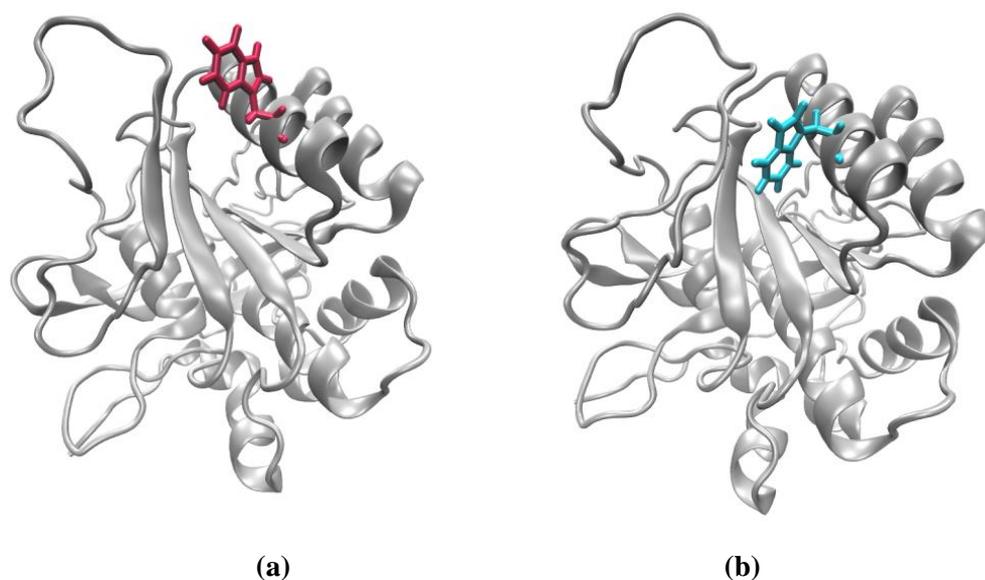


Figura 5.8. Representação das conformações do triptofano amostradas nas simulações: **(a)** Conformação A, triptofano exposto ao solvente e **(b)** Conformação B, cadeia lateral do triptofano encaixada em bolso apolar com somente uma das laterais dos anéis exposta ao solvente.

Em todas as simulações nas quais ocorre a mudança de orientação do triptofano e encaixe no bolso, o triptofano não torna a adquirir a conformação A, sendo completamente estabilizado na conformação B (cristalográfica) na escala de tempo da simulação. O triptofano na conformação A apresenta grande liberdade de movimento devido à sua exposição ao solvente, enquanto que na conformação cristalográfica sua movimentação é muito restrita. As variações de mobilidade devido à exposição do triptofano ao solvente resultaram na grande variedade de decaimentos de anisotropia vistos na Figura 5.6. A correlação das curvas de anisotropia com a mobilidade e conformação do triptofano em 29% glicerol (m/m) é dada na Figura 5.9 como exemplo dessas observações. As imagens da posição do triptofano ao longo do tempo também evidenciam a estabilização do triptofano na conformação cristalográfica, pois este não torna a adquirir a conformação A após inserção no bolso.

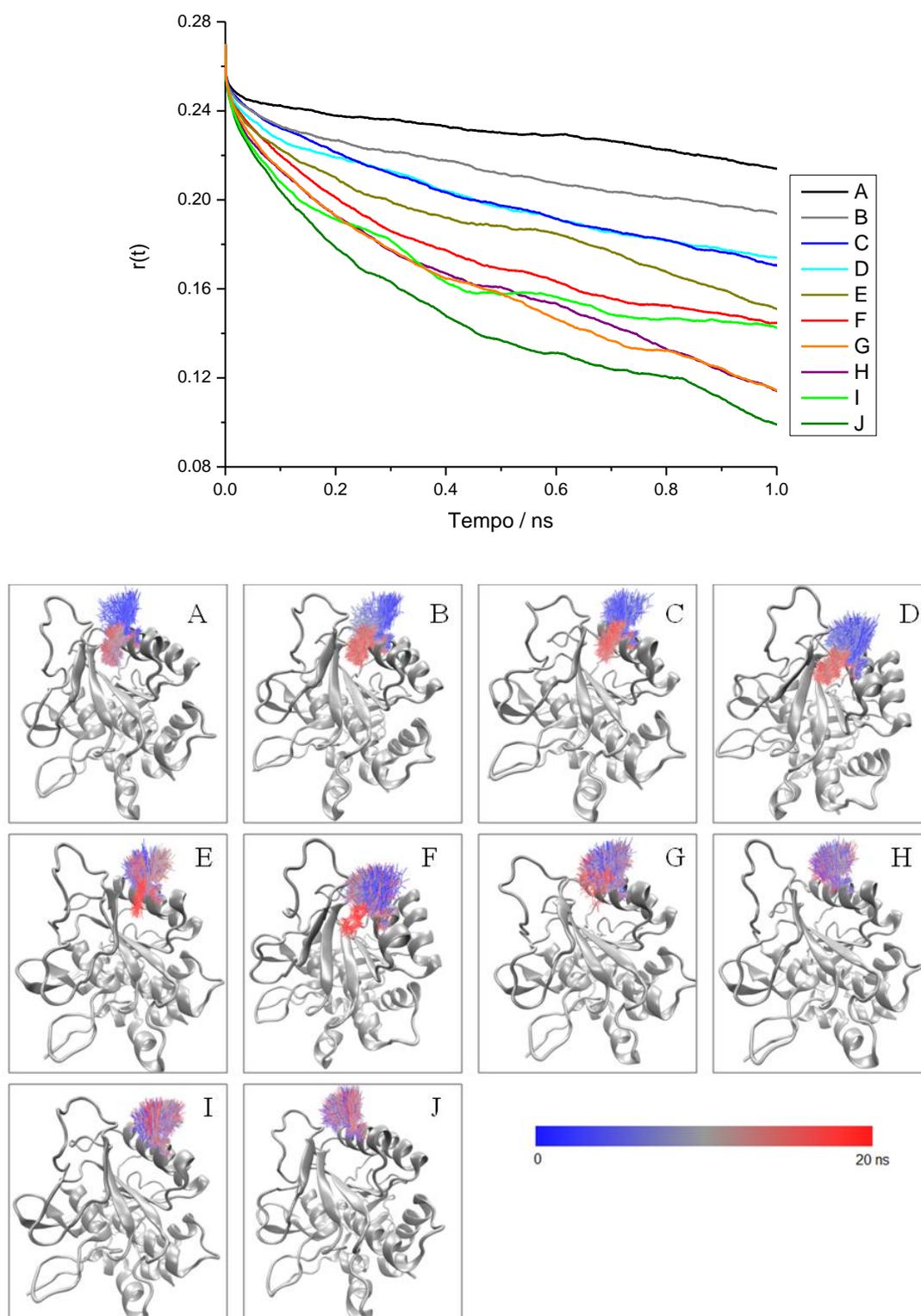


Figura 5.9. Correlação da mobilidade do triptofano com o decaimento da anisotropia a 29% glicerol (m/m). Os decaimentos são associados à dinâmica do resíduo de triptofano (destacado em vermelho e azul) nas respectivas simulações. Nas imagens de A a F são mostradas as posições do triptofano a cada 0,1 ns de simulação. A escala de cores indica a evolução temporal de sua posição.

Na Figura 5.10, as curvas de anisotropia de fluorescência teóricas são diferenciadas de acordo com a conformação do triptofano nas respectivas simulações. As curvas correspondentes a simulações que amostraram o triptofano na conformação B em algum momento da trajetória são representadas em cinza, enquanto curvas correspondentes a trajetórias nas quais o triptofano permaneceu o tempo todo exposto ao solvente são coloridas. Para uma mesma proporção de mistura, observa-se que os decaimentos mais rápidos, principalmente em tempos de correlação pequenos, menores que 1 ns, correspondem todos a simulações nas quais o triptofano permanece a trajetória completa exposto ao solvente. No entanto, mesmo nessa conformação a extensão da mobilidade pode variar, de modo que há diferenças entre as curvas de simulações que amostraram somente A. Algumas, que apresentaram mobilidade do triptofano reduzida, geraram curvas de anisotropia com taxas de decaimento mais semelhantes às de simulações nas quais o triptofano adquire a conformação B, ocorrendo inclusive sobreposição das curvas em tempos mais longos.

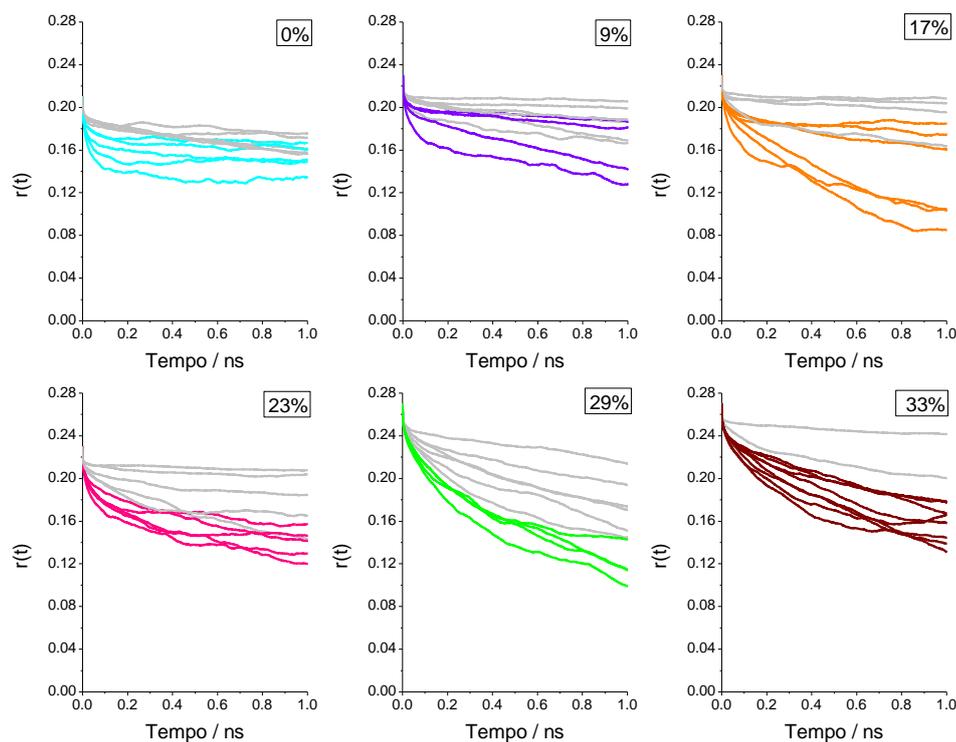


Figura 5.10. Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo calculada a partir das simulações de dinâmica molecular. Curvas correspondentes às simulações nas quais a conformação A é amostrada exclusivamente são destacadas, enquanto curvas correspondentes à simulações no qual ocorre amostragem de B são mostradas em cinza.

A distância entre o carbono da cadeia lateral de um resíduo de alanina localizado no interior do bolso hidrofóbico e o carbono 5 do anel indol do triptofano, segundo a numeração da Figura 5.11c, foi escolhida como uma medida quantitativa da exposição do triptofano ao solvente. Quando o triptofano está exposto, essa distância flutua em torno de 11 Å, e diminui drasticamente quando sua cadeia lateral passa para o interior do bolso, adquirindo valores por volta de 5 Å (Figura 5.11). O tempo de máxima exposição do triptofano ao solvente foi então definido como o instante no qual a distância entre triptofano e alanina deixa de flutuar em torno do valor associado à conformação A. Para simulações nas quais somente A é amostrado foi considerado tempo de exposição de 20ns, o tempo total das simulações. O tempo de exposição ao solvente está então relacionado com a amostragem da conformação A.

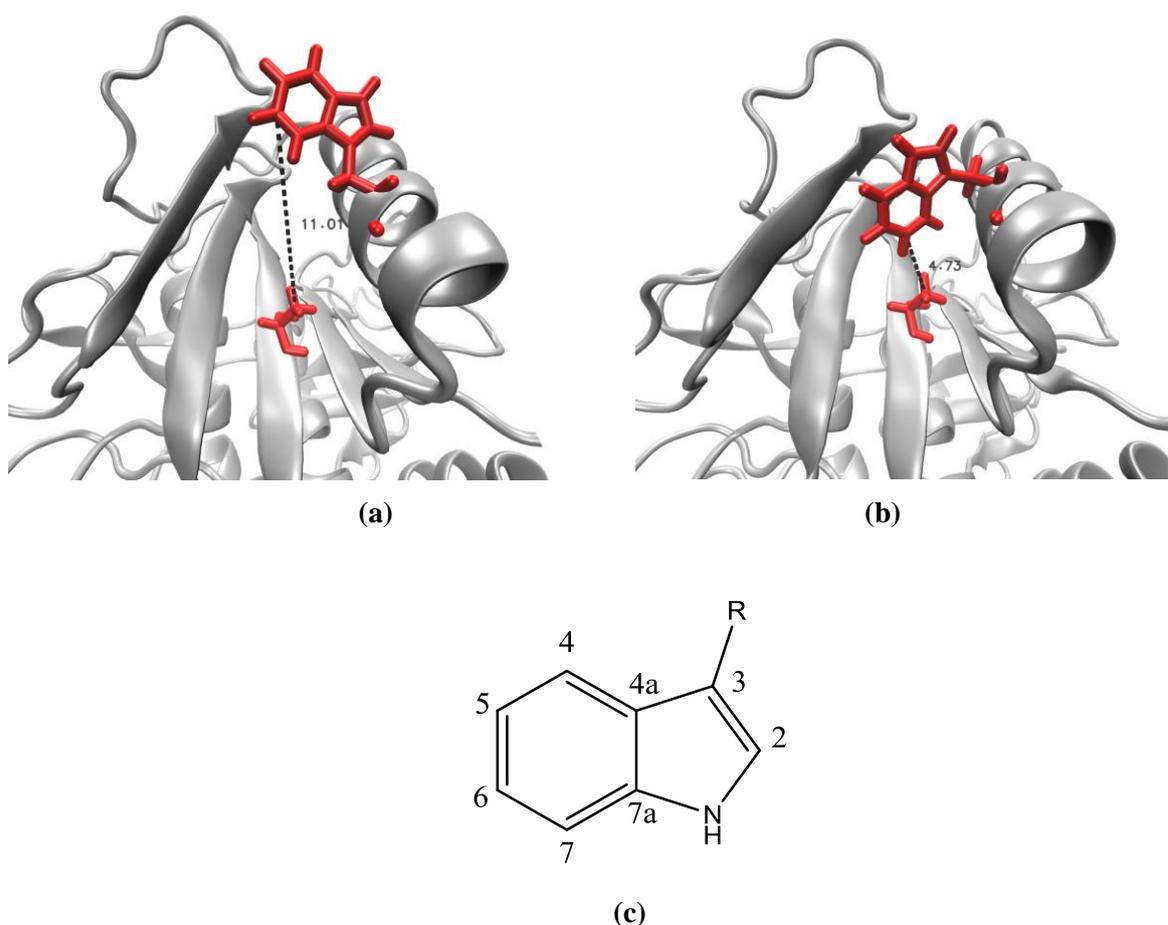


Figura 5.11. Representação da distância triptofano-alanina utilizada como medida indireta da exposição do triptofano ao solvente. São mostradas distâncias típicas quando triptofano possui (a) conformação A e (b) conformação B. Em (c) é indicada a numeração dos carbonos do anel indol do triptofano.

A correlação da anisotropia de fluorescência resolvida no tempo em 0,2 ns com o tempo de exposição do triptofano ao solvente, na Figura 5.12, evidencia que, de maneira geral, simulações nas quais a conformação A é a única amostrada apresentaram decaimentos de anisotropia mais acentuados em tempos curtos. As taxas de decaimento se tornaram mais lentas à medida que B é amostrado por maior proporção do tempo nas simulações, em concordância com a tendência mostrada na Figura 5.8 para 29% glicerol.

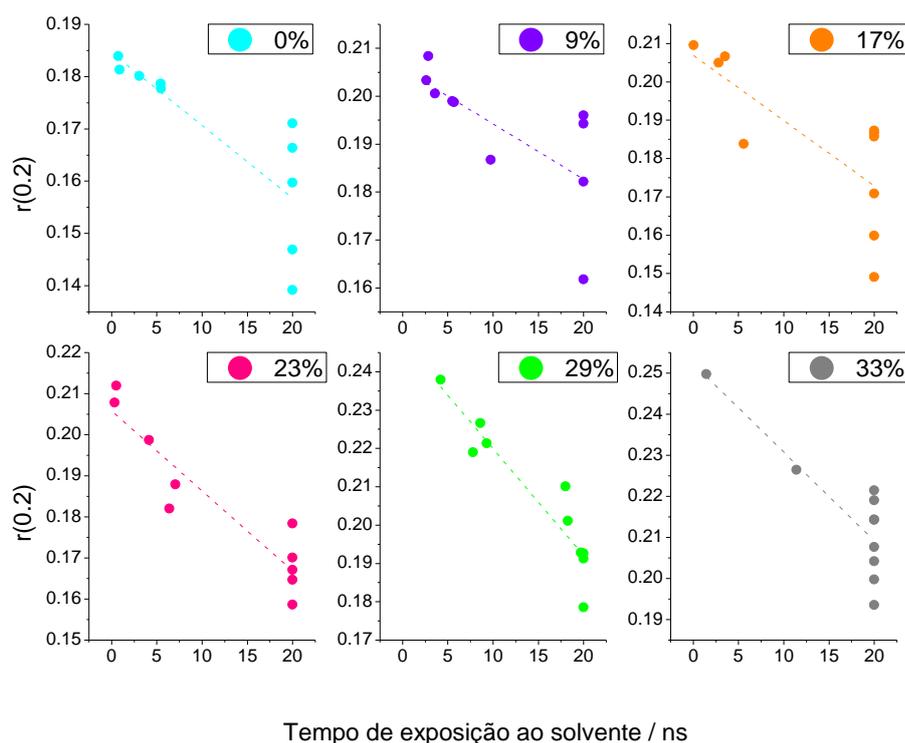


Figura 5.12. Anisotropia de fluorescência a 0,2 ns em função do tempo de exposição do triptofano ao solvente, na conformação A. Simulações nas quais A é amostrado exclusivamente são mostradas com tempo de exposição de 20 ns, tempo total das simulações. As retas tracejadas são utilizadas para mostrar a tendência dos dados.

A Figura 5.12 indica que, com algumas exceções, simulações nas quais B é a população majoritária apresentaram os decaimentos mais lentos. A dinâmica reorientacional nesses casos se deve principalmente à rotação da proteína. Na Figura 5.13 a descorrelação da posição de uma hélice de SC em 33% glicerol/água é utilizada como referência para indicar a despolarização da fluorescência causada pelo *tumbling* natural da proteína, e pode ser verificada a similaridade dessa curva com o decaimento de anisotropia mais lentos na Figura 5.6.

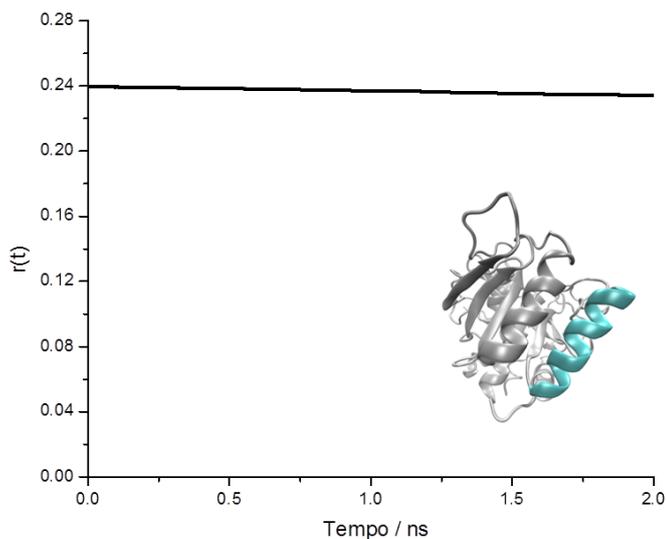


Figura 5.13. Descorrelação da anisotropia de fluorescência devido à dinâmica rotacional da proteína como um todo. O cálculo foi realizado considerando uma hélice de SC, em destaque.

Na Figura 5.6 é possível ver que os valores de anisotropia iniciais, $r(0)$, são distintos para cada proporção de mistura. Esses valores correspondem aos determinados no estudo experimental e estão relacionados com o ângulo entre os vetores de momento de dipolo de absorção e emissão do triptofano. A fim de poder melhor comparar o comportamento entre as diferentes proporções, o valor correspondente de anisotropia inicial foi subtraído da anisotropia a 0,2 ns, e os dados para todas as simulações são mostrados na Figura 5.14. Desse modo pode ser melhor visto que as simulações seguem uma mesma tendência geral, e que os valores de anisotropia a um dado momento são dependentes da anisotropia inicial exibida em cada proporção de solvente. É aparente, também, que não é possível com estas simulações distinguir claramente o efeito da concentração de glicerol na mobilidade reorientacional do triptofano, já que não se observa uma tendência clara dos dados apresentados na Figura 5.14.

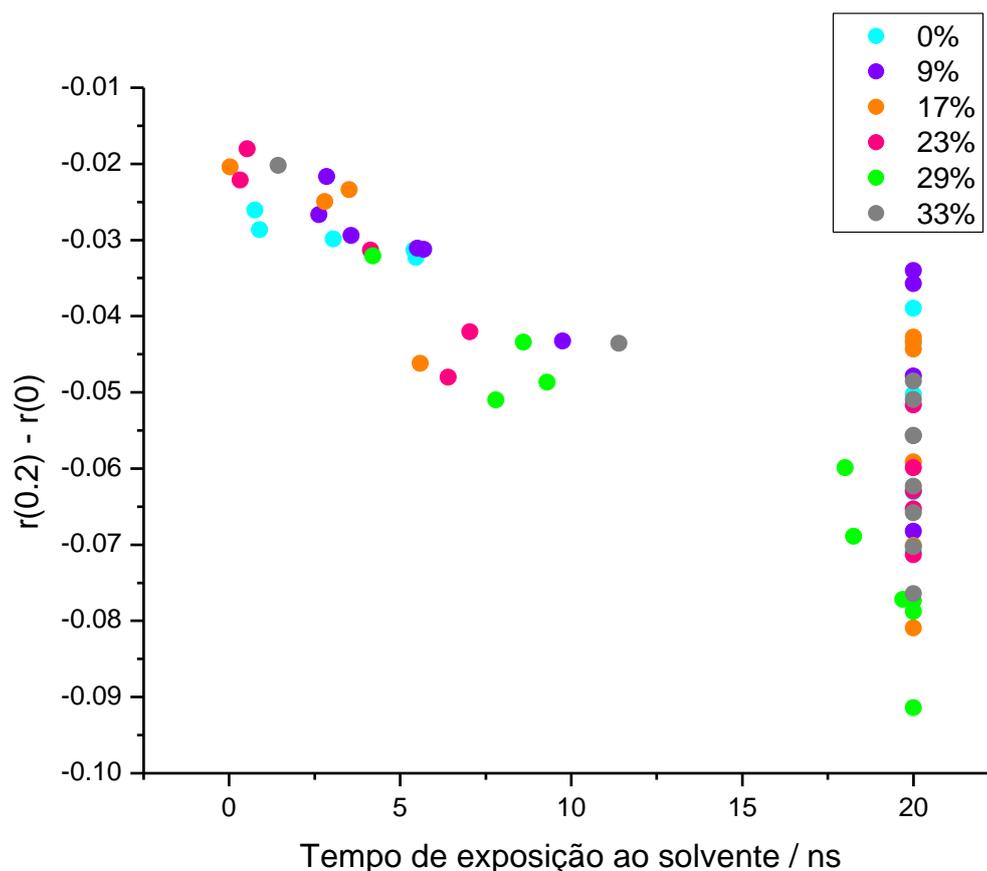


Figura 5.14. Anisotropia inicial subtraída da anisotropia de fluorescência a 0,2 ns, em função do tempo de exposição do triptofano ao solvente, na conformação A.

A Tabela 5.1 organiza o número de simulações nas quais ocorre amostragem do triptofano na conformação B em algum momento durante as trajetórias. Também é dado o tempo médio no qual o triptofano permanece exposto ao solvente, correspondente à média do tempo de exposição ao solvente (como definido pela distância triptofano-alanina) nas dez simulações em cada proporção. É interessante que, apesar da estrutura de partida possuir o triptofano em conformação com grande exposição ao solvente, estruturas com o triptofano excluído do solvente foram amostradas em 47% das simulações. Além disso, é surpreendente que as curvas de anisotropia calculadas a partir dessas simulações sejam tão distintas das experimentais, em qualquer concentração de solução.

Tabela 5.1. Número de simulações que amostram a conformação B do triptofano de SC.

Proporção glicerol/água (%)	Número de simulações que amostram conformação B	Tempo médio de exposição ao solvente (ns)
0	5	$7,6 \pm 2,7$
9	6	$11,0 \pm 2,5$
17	4	$13,2 \pm 2,8$
23	5	$11,7 \pm 2,8$
29	6	$14,1 \pm 2,0$
33	2	$17,2 \pm 2,0$

A Tabela 5.1 indica também que o tempo médio de exposição do triptofano é, com exceção das simulações a 23%, maior conforme há mais moléculas de glicerol em solução, e que portanto as simulações com maiores proporções de glicerol apresentam uma maior fração de população na conformação A. A inspeção visual das trajetórias confirma essa tendência. Isso ocorre pois à medida que o número de moléculas de glicerol aumenta nas simulações, o bolso hidrofóbico tende a ser ocupado por um glicerol, o que impede a penetração do triptofano e força sua exposição ao solvente. Na Figura 5.15 é mostrado um instante de uma das simulações contendo uma molécula de glicerol no bolso e com o triptofano na conformação A. A cadeia carbônica do glicerol o torna um solvente preferível para realizar interação com os resíduos apolares do bolso em comparação com a água, favorecendo a sua inserção. Uma crescente exposição de resíduos de triptofano ao solvente com aumento da concentração do co-solvente também foi verificada em simulações de dinâmica molecular de mioglobina em misturas de água e etanol, para frações molares de etanol menores do que 0,15⁸⁸.

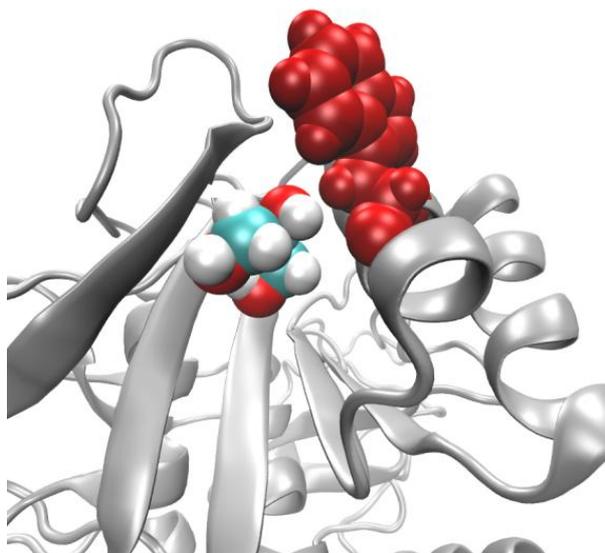


Figura 5.15. *Snapshot* de uma trajetória que mostra o glicerol (carbonos representados em ciano, oxigênio em vermelho e hidrogênios em branco) ocupando o bolso hidrofóbico e impedindo a inserção do triptofano, representado em vermelho.

5.2.3. *Influência do ambiente na fluorescência do triptofano*

As simulações de dinâmica molecular evidenciaram total inconsistência entre a conformação cristalográfica e os resultados experimentais. No caso em estudo, as distinções entre o cálculo de anisotropia experimental e teórico podem ser ao menos parcialmente explicadas levando-se em conta a intensidade de fluorescência da sonda. Como há uma grande disparidade entre as curvas calculadas a partir de simulações nas quais B é amostrado e as curvas experimentais, procurou-se então estudar as razões que explicariam a maior contribuição da fluorescência da conformação A na anisotropia de fluorescência verificada experimentalmente.

A fluorescência do triptofano é extremamente sensível à polaridade do ambiente em que se encontra, sendo de grande vantagem para o estudo de mudanças conformacionais de proteínas ou de interações com outras moléculas⁸⁶. Uma das causas dessa dependência é o efeito do potencial eletrostático do ambiente no espectro de fluorescência do triptofano. Na excitação para o estado 1L_a , a densidade eletrônica se desloca do anel pirrol para o anel benzênico (Figura 5.16a), de forma que a presença de cargas positivas próximas ao anel benzênico ou negativas próximas ao pirrol estabilizam o estado excitado, contribuindo para a

redução da diferença de energia com o estado fundamental. Com isso, ocorre aumento do comprimento de onda de fluorescência⁸⁹. Além disso, em um estudo utilizando QM/MM em diversas proteínas fluorescentes, Vivian e Callis concluíram que o deslocamento de Stokes, isto é, a diferença entre λ_{abs} e λ_{ems} , é modesto quando a exposição do triptofano à água ocorre pelas arestas do anel indol, enquanto que quando uma ou as duas faces estão expostas, o pico de fluorescência ocorre por volta de 350nm⁹⁰.

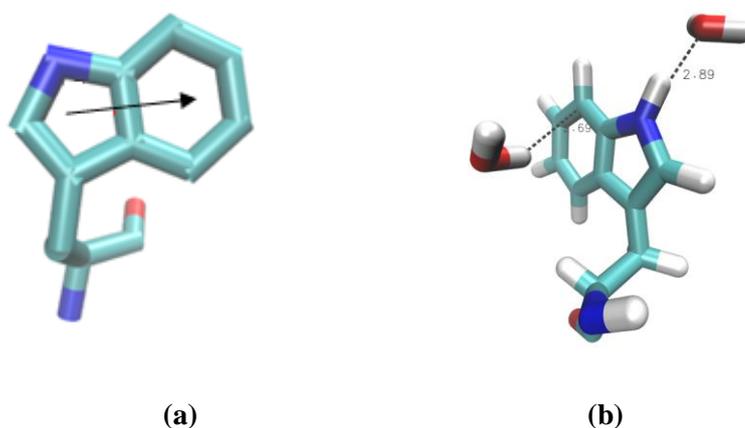


Figura 5.16. (a) Representação do deslocamento de densidade eletrônica na cadeia lateral do triptofano durante excitação ao estado S_1 ; (b) Moléculas de água próximas ao triptofano em um *frame* de uma simulação, indicando possível estabilização do estado excitado.

Nas simulações, quando o triptofano encontra-se no bolso hidrofóbico somente a aresta do anel é exposta ao solvente, as faces estando protegidas pelos outros resíduos. Nesse bolso também não há a presença de resíduos carregados perto da cadeia lateral do triptofano (Figura 5.3). Dessa forma, quando o triptofano encontra-se na conformação cristalográfica, o estado excitado é provavelmente pouco estabilizado. Já quando o triptofano está exposto ao solvente, é verificada a presença de moléculas de água orientadas de forma que a carga parcial negativa do oxigênio possa estabilizar o anel pirrol e o hidrogênio estabilizar o anel benzênico (Figura 5.16b). Por essas razões, é plausível supor que haja um deslocamento para o azul (comprimentos de onda menores) no espectro de fluorescência do triptofano quando na conformação B.

O espectro de fluorescência de SC calculado a partir de simulações QM/MM que apresentam conformações com o triptofano excluído do solvente⁹⁰ concordam com o deslocamento para o azul da emissão fluorescente. Nesses casos, tem-se $\lambda_{\text{max}} \cong 320 \text{ nm}$, distinto do comprimento de onda atribuído à fluorescência da proteína quando esta apresenta

o triptofano exposto, onde $\lambda_{\max} \cong 360$ nm. Como no estudo experimental da anisotropia de fluorescência de SC as intensidades de fluorescência foram registradas a 360 nm, é possível que desse modo a fluorescência do estado A tenha se sobressaído à da população na conformação B. No entanto, um fato que desfavorece esse raciocínio é o espectro de fluorescência de SC dado no estudo de Lakshmikanth e Krishnamoorthy. O espectro apresenta máximo centrado em aproximadamente 360 nm, sem a presença de ombros no comprimento de onda esperado para a conformação B⁴⁶.

O ambiente em que o triptofano se encontra também afeta a intensidade de fluorescência e o rendimento quântico devido à existência de processos não radiativos que levam ao relaxamento do estado excitado⁹¹. O grupo amida da ligação peptídica pode ser um supressor do triptofano. Esse efeito foi demonstrado por Pan e Barkley no estudo da supressão da fluorescência de um hexapeptídeo circular contendo apenas um triptofano em diferentes posições na cadeia e nenhum outro resíduo que pudesse atuar como supressor. Os resultados mostraram grande variação do rendimento quântico em função da posição do triptofano⁹¹. Assim, evidenciou-se a dependência desse tipo de mecanismo com a conformação da cadeia lateral e proximidade com a ligação peptídica. Além disso, em proteínas, há oito cadeias laterais de resíduos que podem levar à supressão da fluorescência do triptofano: histidina, glutamina, asparagina, glutamato, aspartato e cisteína, que envolvem mecanismo de supressão por transferência de elétron, e lisina e possivelmente tirosina, que acredita-se que suprimem por transferência de próton⁹². Os mecanismos requerem proximidade entre o supressor e o fluoróforo, a distâncias de até 10 Å.

Como as simulações realizadas se tratam de simulações clássicas, a possibilidade de ocorrer supressão da fluorescência não pôde ser quantitativamente verificada, restando apenas a previsão com base em argumentos qualitativos. Na supressão pela cadeia peptídica, um elétron é transferido do centro do anel indol para o carbono da carbonila mais próxima presente no *backbone*. O estado pós-transferência da carga será estabilizado se a transferência de elétron se der em direção a uma carga positiva ou em direção oposta a uma carga negativa⁸⁹. Quão mais estável este for, mais provável será a supressão da fluorescência pela amida da cadeia peptídica. No entanto, no bolso hidrofóbico da proteína não há resíduos carregados próximos que justifiquem a estabilização do estado pós-transferência de carga e portanto não há indicação de que a supressão da fluorescência da conformação B pela cadeia peptídica ocorra nesse caso.

Por fim, dentre os possíveis resíduos supressores do triptofano em SC, uma asparagina e duas tirosinas encontram-se a distâncias suficientemente pequenas (menos de 10 Å) quando o triptofano encontra-se na conformação cristalográfica, como representado na Figura 5.17. Outros resíduos supressores encontram-se a distâncias não condizentes com mecanismos de supressão de fluorescência.

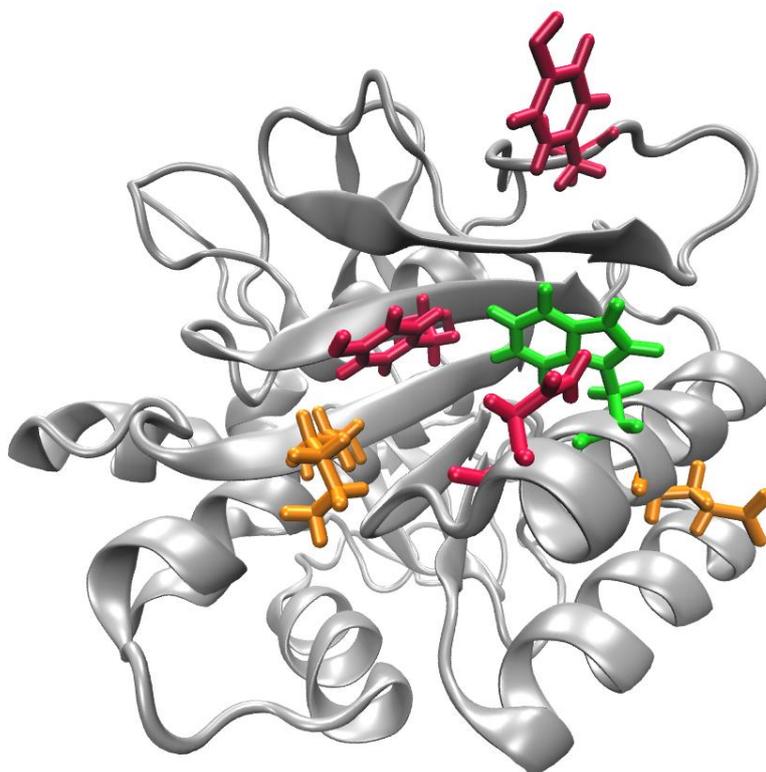


Figura 5.17. Representação do resíduo de triptofano (verde) e dos resíduo de asparagina e tirosina (vermelhos), possíveis supressores da fluorescência da conformação B. Outros resíduos supressores de fluorescência próximos estão representados em laranja.

As interações entre tirosina e triptofano que podem levar à supressão da fluorescência do triptofano provavelmente envolvem interações entre a hidroxila da tirosina e os carbonos 2, 4 ou 7 do triptofano⁹², utilizando a notação da Figura 5.11c. O resíduo de tirosina localizado em um *loop* da proteína, que se encontra mais distante do bolso, apresenta certa mobilidade nas simulações, diversas vezes encontrando-se distante mais do que 10 Å do triptofano. Por essa razão, a tirosina no bolso se apresenta como o resíduo supressor mais provável. No entanto, apesar da proximidade entre esse resíduo e o triptofano, a orientação da hidroxila da tirosina não parece condizente com transferência de próton para os carbonos 2, 4 ou 7 do anel indol, como pode ser visto na Figura 5.18. Por essa razão, achamos pouco

provável que esse resíduo possa levar à supressão da fluorescência da conformação cristalográfica.

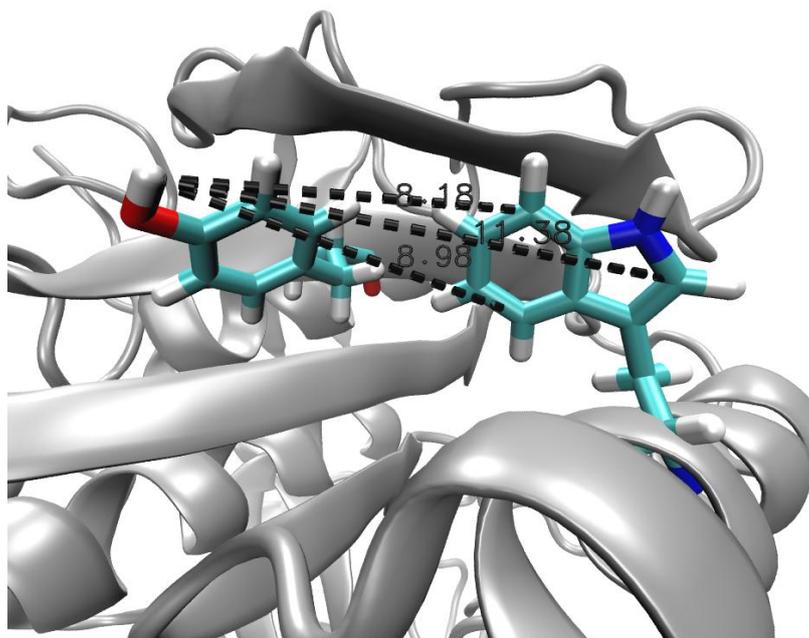


Figura 5.18. Representação dos resíduos de triptofano e tirosina. As distâncias entre o hidrogênio da hidroxila da tirosina e os carbonos 2, 4 e 7 do anel indol são indicadas.

A asparagina promove a supressão por meio de transferência de elétron, porém o mecanismo exato não é definido⁹². Como a cadeia lateral desse resíduo possui um grupo amida, é razoável supor que a supressão envolva transferência de elétron do anel indol para a carbonila da cadeia lateral, de maneira similar ao mecanismo de supressão pela cadeia peptídica. Sob essa suposição, a estabilidade do estado pós-transferência de carga pode ser presumida, como para a supressão pela cadeia peptídica, caso haja grupos com carga negativa próximos ao anel do triptofano e grupos positivos próximos à asparagina. Essa possibilidade foi investigada através da inspeção visual das simulações. Há um resíduo de lisina cuja cadeia lateral é localizada espacialmente próxima à asparagina, porém ele não permanece orientado em direção a esse resíduo durante toda a trajetória, devido à interação com outro resíduo na direção oposta. A presença de moléculas de água próximas à asparagina poderia, no entanto, assegurar a estabilização do estado suprimido mesmo nesses casos. A estabilização da carga parcial positiva no triptofano provavelmente também depende exclusivamente da interação com moléculas de água, pois o único resíduo positivo próximo ao bolso, glutamato, não se

encontra orientado de forma a permitir interação, como mostrado na Figura 5.19a. As possibilidades de interações estabilizadoras do estado suprimido, como visto em dois momentos das simulações, estão representados nas Figuras 5.19b e 5.19c. A supressão da fluorescência do triptofano quando na conformação B pelo resíduo de asparagina configura-se portanto como outra possibilidade da não-observação da dinâmica reorientacional desta população pela técnica experimental.

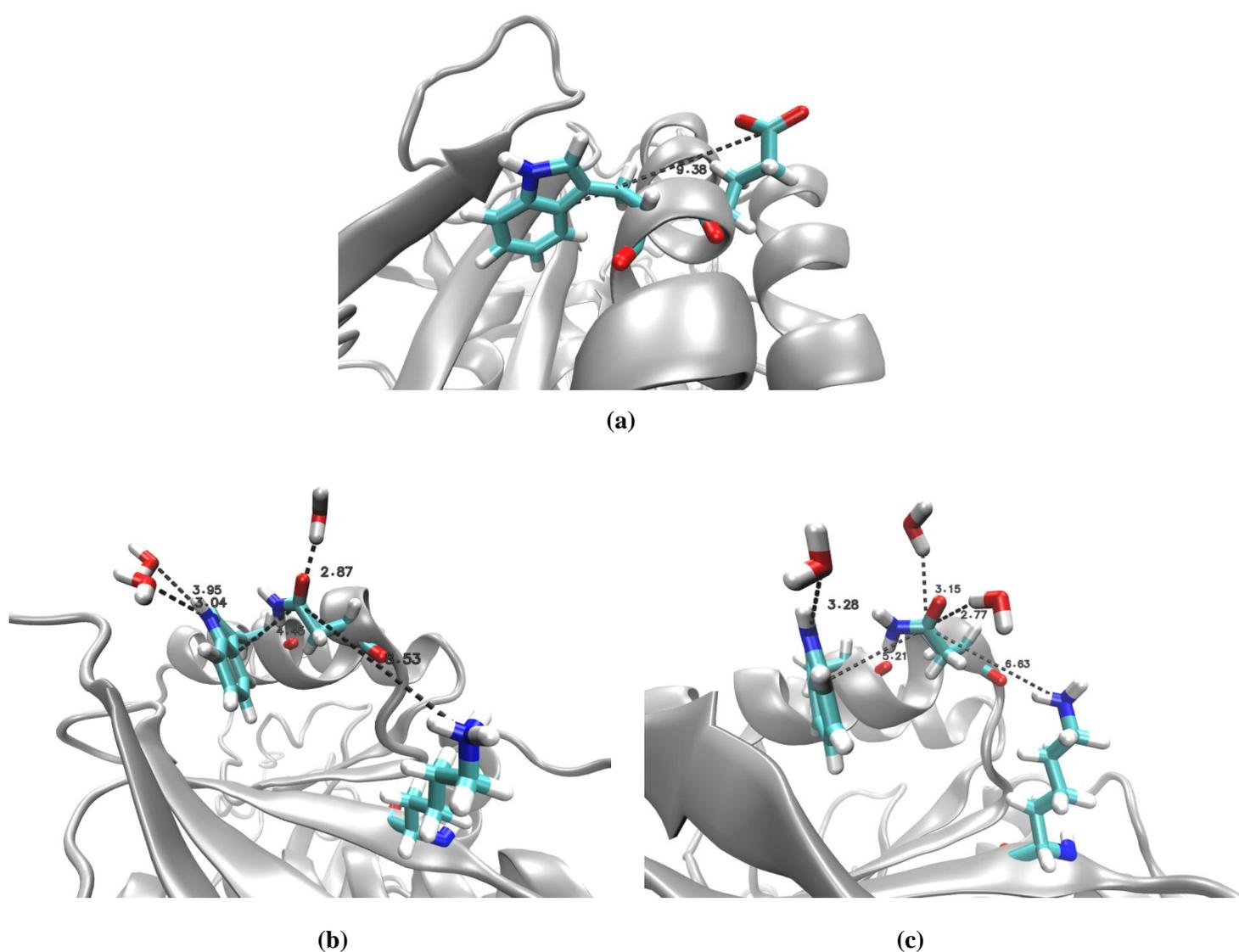


Figura 5.19. (a) Representação da distância triptofano-glutamato; (b) e (c) representações de interações entre triptofano e asparagina com resíduos laterais ou moléculas de água que promovam estabilização do estado pós-transferência de carga após supressão da fluorescência do triptofano por asparagina.

5.3. Conclusões

Neste capítulo a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo de SC foi calculada a partir das simulações de dinâmica molecular realizadas em seis proporções de glicerol em água, visando obter informações em nível molecular da dinâmica da proteína e do resíduo de triptofano. Os decaimentos de anisotropia teóricos foram calculados utilizando a equação 5.2, que relaciona a decorrelação dos momentos de dipolo do triptofano a partir da evolução temporal destes nas simulações.

Primeiramente, a correta representação do sistema pelas simulações foi verificada através do cálculo da anisotropia de fluorescência resolvida no tempo do triptofano, utilizando simulações do aminoácido de triptofano livre em solução a 0 e 10% (m/m) glicerol/água. As curvas experimentais e teóricas apresentaram grande semelhança, sugerindo representação satisfatória das condições experimentais pelas simulações.

A anisotropia de fluorescência resolvida no tempo foi então calculada para as simulações de SC em água e glicerol. Foi observada grande variação entre as curvas para uma mesma proporção de mistura, e diferenças pronunciadas com relação aos resultados experimentais. As simulações de dinâmica molecular evidenciaram que a conformação cristalográfica de SC não é consistente com a conformação em solução. As diferenças pronunciadas entre os decaimentos experimentais e calculados a partir de simulações nas quais o triptofano adquire a conformação B sugerem que somente a conformação no qual o triptofano é exposto ao solvente é amostrada experimentalmente.

Foram exploradas as possibilidades de que o estado com menor mobilidade tenha a observação de sua fluorescência reduzida por deslocamento do comprimento de onda de emissão ou por supressão, dada a sensibilidade do triptofano ao ambiente em que se encontra. O deslocamento da fluorescência para comprimentos de ondas menores do que os medidos experimentalmente pode ser a causa de tal disparidade, devido à falta de estabilização do estado excitado promovida pelo ambiente apolar do bolso no qual o triptofano se encaixa na conformação cristalográfica. Por fim, a supressão da fluorescência por um resíduo próximo de asparagina é também sugerida devido às possibilidades de interações estabilizadoras do estado pós-transferência de carga com um resíduo de lisina próximo ou com moléculas de água observadas nas simulações.

Capítulo 6

Conclusões finais

Neste trabalho, investigamos a solvatação de subtilisina Carlsberg em soluções aquosas de glicerol em nível microscópico, por meio de simulações de dinâmica molecular. Há significativa substituição das moléculas de água por moléculas de glicerol na superfície da proteína. No entanto, com o aumento da concentração de glicerol, há leve estabilização da água remanescente na primeira camada de solvatação dos resíduos carregados e polares, juntamente com desestabilização do glicerol. Ocorreu também sutil aumento do tempo de vida das ligações de hidrogênio proteína-água com o aumento da concentração de glicerol.

O estudo da interação do glicerol com os resíduos da proteína segundo modelos de adsorção indicaram que as energias livres de interação do glicerol com os resíduos hidrofóbicos e polares são similares, e menores do que a energia livre de interação com os resíduos carregados. Além disso, os resíduos polares podem adsorver um maior número de moléculas de glicerol, decorrentes do fato de serem predominantes na superfície proteica.

Nosso trabalho, portanto, sugere que efeitos distintos podem estar associados à estabilização promovida pelo glicerol: interações diretas proteína-glicerol, particularmente em regiões não carregadas, e a estabilização da primeira camada de hidratação dos resíduos hidrofílicos. Além disso, a ausência de penetração significativa de glicerol no interior hidrofóbico da proteína e no sítio catalítico é consistente com a preservação da atividade enzimática.

Os decaimentos de anisotropia calculados a partir da dinâmica do triptofano apresentaram grande variabilidade entre as simuações, e são distintos dos resultados experimentais obtidos por Lakshmikanth e Krishnamoorthy. As diferenças entre os decaimentos calculados e experimentais indicam uma incompatibilidade da conformação cristalográfica do triptofano com o decaimento de anisotropia experimental. A estrutura cristalográfica apresenta o triptofano inserido em um bolso hidrofóbico, e esta conformação leva a decaimentos de anisotropia mais lentos. Isso ocorre pois, nessas condições, sua

mobilidade é restrita. Os decaimentos de anisotropia experimentais, por sua vez, indicam mobilidade elevada do triptofano, consistente com sua exposição ao solvente.

Aqui, propomos que a inconsistência entre os decaimentos de anisotropia calculados e experimentais pode ser explicada, ao menos em parte, por uma seleção conformacional não-intencional na realização dos experimentos. Buscamos, portanto, explorar as razões que levariam a fluorescência do triptofano na conformação cristalográfica a não ser observada experimentalmente. Uma hipótese levantada é o deslocamento da fluorescência para comprimentos de ondas menores do que 360 nm, devido à ausência de estabilização do estado excitado promovida pelo ambiente apolar do bolso. Outra possível causa é a supressão da fluorescência devido à interação com um resíduo próximo de asparagina, um reconhecido supressor da fluorescência de triptofanos.

Referências bibliográficas

1. Whitesides, G. M. & Wong, C.-H. Enzymes as catalysts in synthetic organic chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **97**, 617–638 (1985).
2. Serdakowski, A. L. & Dordick, J. S. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol.* **26**, 48–54 (2008).
3. Hudson, E. P., Eppler, R. K. & Clark, D. S. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 637–643 (2005).
4. Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R. & Damborsky, J. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. *ACS Catal.* **3**, 2823–2836 (2013).
5. Burney, P. R., Nordwald, E. M., Hickman, K., Kaar, J. L. & Pfaendtner, J. Molecular dynamics investigation of the ionic liquid/enzyme interface: Application to engineering enzyme surface charge. *Proteins* **83**, 670–680 (2015).
6. Castro, G. R. & Knubovets, T. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**, 195–231 (2003).
7. Fuchs, C. S., Simon, R. C., Riethorst, W., Zepeck, F. & Kroutil, W. Synthesis of (R) - or (S) -valinol using w-transaminases in aqueous and organic media. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 5558–5562 (2014).
8. Kapoor, M., Majumder, A. B. & Gupta, M. N. Promiscuous Lipase-Catalyzed C–C Bond Formation Reactions Between 4 Nitrobenzaldehyde and 2-Cyclohexen-1-one in Biphasic Medium: Aldol and Morita–Baylis–Hillman Adduct Formations. *Catal. Letters* **145**, 527–532 (2015).
9. Doukyu, N. & Ogino, H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* **48**, 270–282 (2010).
10. Li, L., Ji, F., Wang, J., Li, Y. & Bao, Y. Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *Enzym. Microb. Technol.* **69**, 46–53 (2015).
11. Carrea, G. & Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chemie Int. Ed.* **39**, 2226–2254 (2000).
12. Affleck, R., Xu, Z. F., Suzawa, V. & Focht, K., Clark, D. S., Dordick, J. S. Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1100–1104 (1992).

13. Barbas, C. F., Matos, J. R., West, J. B. & Wong, C. A Search for Peptide Ligase : Cosolvent-Mediated Conversion of Proteases to Esterases for Irreversible Synthesis of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5162–5166 (1988).
14. Colleti-Previero, M. A., Previero, A. & Zuckerkandl, E. Separation of the proteolytic and esterase activities of trypsin by reversible structural modifications. *J. Mol. Biol.* **39**, 493–501 (1969).
15. Chaiken, I. M. Semisynthetic Peptides and Proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem* **11**, 255–301 (1981).
16. Homandberg, G. A. & Laskowski, M. Enzymatic Resynthesis of the Hydrolyzed Peptide Bond(s) in Ribonuclease S. *Biochemistry* **18**, 586–592 (1979).
17. Homandberg, G. A. & Chaiken, I. M. Trypsin-catalyzed conversion of staphylococcal nuclease-T fragment complexes to covalent forms. *J. Biol. Chem.* **255**, 4903–4909 (1980).
18. Inouye, K., Watanabe, K., Morihara, K., Tochino, Y., Kanaya, T., Emura, J. & Sakakibara, S. Enzyme-assisted semisynthesis of human insulin. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 751–752 (1979).
19. Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241–249 (2001).
20. Castro, G. R. Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents. *Enzym. Microb. Technol.* **25**, 689–694 (1999).
21. Khmel'nitsky, Y. L. & Rich, J. O. Biocatalysis in non-aqueous solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 47–53 (1999).
22. Kamal, Z., Yedavalli, P., Deshmukh, M. V & Rao, N. M. Lipase in aqueous-polar organic solvents : Activity , structure , and stability. *Protein Sci.* **22**, 904–915 (2013).
23. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. & Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81–87 (1987).
24. Khabiri, M., Minofar, B., Brezovský, J., Damborský, J. & Ettrich, R. Interaction of organic solvents with protein structures at protein-solvent interface. *J. Mol. Model.* **19**, 4701–4711 (2013).
25. Kamal, J. K. A., Xia, T., Pal, S. K., Zhao, L. & Zewail, A. H. Enzyme functionality and solvation of Subtilisin Carlsberg: from hours to femtoseconds. *Chem. Phys. Lett.* **387**, 209–215 (2004).
26. Broos, J., Engbersen, J. F. J., Verboom, W., Hoek, A. Van & Reinhoudt, D. N. Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12657–12663 (1995).

27. Branco, R. J. F., Graber, M., Denis, V. & Pleiss, J. Molecular mechanism of the hydration of *Candida antarctica* lipase B in the gas phase: Water adsorption isotherms and molecular dynamics simulations. *Chembiochem* **10**, 2913–2919 (2009).
28. Torres, S. & Castro, G. R. Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 271–277 (2004).
29. Roccatano, D. Computer simulations study of biomolecules in non-aqueous cosolvent/water mixture solutions. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 407–426 (2008).
30. Shokri, M. M., Ahmadian, S., Akbari, N. & Khajeh, K. Hydrophobic substitution of surface residues affects lipase stability in organic solvents. *Mol. Biotechnol.* **56**, 360–368 (2014).
31. Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Brezovsky, J., Prokop, Z., Sebestova, E., Hesseler, M., Khabiri, M., Plevaka, M., Kulik, D., Smatanova, I. K., Rezacova, P., Ettrich, R., Bornscheuer, U. T. & Damborsky, J. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 1959–1963 (2013).
32. Eppler, R. K., Hudson, E. P., Chase, S. D., Dordick, J. S., Reimer, J. A. & Clark, D. S. Biocatalyst activity in nonaqueous environments correlates with centisecond-range protein motions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15672–15677 (2008).
33. Singh, L. R., Poddar, N. K., Dar, T. A., Rahman, S., Kumar, R. & Ahmad, F. Forty years of research on osmolyte-induced protein folding and stability. *J. Iran. Chem. Soc.* **8**, 1–23 (2011).
34. Spickermann, D., Kara, S., Barackov, I., Hollmann, F. & Schwaneberg, U., Duenkelmann, P., Leggewie, C. Alcohol dehydrogenase stabilization by additives under industrially relevant reaction conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **103**, 24–28 (2014).
35. Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. & Record Jr., M. T. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of “osmotic stress” experiments in vitro. *Biochemistry* **39**, 4455–4471 (2000).
36. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. & Somero, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214–1222 (1982).
37. Shimizu, S. & Smith, D. J. Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. *J. Chem. Phys.* **121**, 1148–1154 (2004).
38. Paul, S. & Paul, S. Molecular insights into the role of aqueous trehalose solution on temperature-induced protein denaturation. *J. Phys. Chem. B* **119**, 1598–1610 (2015).
39. Knubovets, T., Osterhout, J. J., Connolly, P. J. & Klibanov, A. M. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1262–1267 (1999).

40. Castro, G. R. Properties of soluble alpha-chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzym. Microb. Technol.* **27**, 143–150 (2000).
41. Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9721–9726 (2002).
42. Singh, L. R., Poddar, N. K., Dar, T. A., Kumar, R. & Ahmad, F. Protein and DNA destabilization by osmolytes: the other side of the coin. *Life Sci.* **88**, 117–125 (2011).
43. Tang, K. E. S. & Bloomfield, V. A. Assessing accumulated solvent near a macromolecular solute by preferential interaction coefficients. *Biophys. J.* **82**, 2876–2891 (2002).
44. Liu, F., Ji, L., Zhang, L., Dong, X. & Sun, Y. Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **132**, 225103 (2010).
45. Back, J. F., Oakenfull, D. & Smith, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* **18**, 5191–5196 (1979).
46. Lakshmikanth, G. S. & Krishnamoorthy, G. Solvent-exposed tryptophans probe the dynamics at protein surfaces. *Biophys. J.* **77**, 1100–1106 (1999).
47. Kaushik, J. K. & Bhat, R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? *J. Biol. Chem.* **278**, 26458–26465 (2003).
48. Srimathi, S., Jayaraman, G. & Narayanan, P. R. Improved thermodynamic stability of subtilisin Carlsberg by covalent modification. *Enzym. Microb. Technol.* **39**, 301–307 (2006).
49. Smith, E. L., DeLange, R. J., Evans, W. H., Landon, M. & Markland, F. S. Subtilisin Carlsberg: V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; evolutionary relationships. *J. Biol. Chem.* **243**, 2184–2191 (1968).
50. Rawlings, N. D. & Salvesen, G. S. *Handbook of proteolytic enzymes - Volume 3*. (Academic Press, 2013).
51. Castillo, B., Solá, R. J., Ferrer, A., Barletta, G. & Griebenow, K. Effect of PEG Modification on Subtilisin Carlsberg Activity, Enantioselectivity, and Structural Dynamics in 1,4-Dioxane. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 9–17 (2008).
52. Karplus, M. & Kuriyan, J. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6679–6685 (2005).
53. Mccammon, J. A., Gelin, B. R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **267**, 585–590 (1977).
54. Karplus, M. & Mccammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 646–652 (2002).

55. Leach, A. R. *Molecular modelling - Principles and applications*. (Pearson Education, 2001).
56. Martínez, L., Borin, I. A. & Skaf, M. S. em *Métodos química teórica e Model. Mol.* (Morgon, N. H. & Coutinho, K.) (Editora Livraria da Física, 2007).
57. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187–217 (1983).
58. Mackerell, A. D., Bashford, D., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Fiel, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Teiher, W. E. & Roux, B. M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1997).
59. Jorgesen, W. L., Mazwell, D. S. & Tirado-River, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and propoerties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236 (1996).
60. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G. & Profeta, S. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765–784 (1984).
61. Hermans, J., Berendsen, H. J. C., Van Gunsteren, W. F. & Postina, J. P. M. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* **23**, 1513–1518 (1984).
62. Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G. & Martínez, J. M. PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.* **30**, 2157–5164 (2009).
63. Klepeis, J. L., Lindorff-Larsen, K., Dror, R. O. & Shaw, D. E. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 120–127 (2009).
64. Ugur, I., Marion, A., Aviyente, V. & Monard, G. Why does Asn71 deamidate faster than Asn15 in the enzyme triosephosphate isomerase? Answers from microsecond molecular dynamics simulation and QM/MM free energy calculations. *Biochemistry* **54**, 1429–1439 (2015).
65. Verlet, L. Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**, 98–103 (1967).
66. Swope, W. C., Anderson, H. C., Berens, P. H. & Wilson, K. R. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J. Chem. Phys.* **76**, 637–649 (1982).
67. Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*. (Jon Wiley and Sons, 2007).

68. Martyna, G. J., Tobias, D. J. & Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys* **101**, 4177–4189 (1994).
69. Ewald, P. Die berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* **64**, 325–348 (1921).
70. Darden, T. A., York, D. & Pedersen, L. Particle-mesh Ewald: An N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).
71. Neidhart, D. J. & Petsko, G. A. The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **2**, 271–276 (1988).
72. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys* **79**, 926–932 (1983).
73. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L. & Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comp. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
74. Humphery, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
75. Song, W., R., B. & Maroncelli, M. Intermolecular interactions and local density augmentation in supercritical solvation: a survey of simulation and experimental results. *J. Phys. Chem. A* **104**, 6924–6939 (2000).
76. Martínez, L. MDAnalysis, versão 15.012, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil (2014).
77. Andreani, R., Martínez, J. M., Martínez, L. & Yano, F. Programa Lovofit - Low order value optimization and applications. *J. Glob. Optim.* **43**, 1–22 (2008).
78. Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 (1918).
79. Linhares, L. A., Barboza Egreja Filho, F., Ianhez, R. & Augusta dos Santos, E. Aplicação dos modelos de Langmuir e Freundlich na adsorção de cádmio e chumbo em diferentes classes de solos brasileiros. *Rev. Tecnológica* **17**, 49–60 (2008).
80. Skopp, J. Derivation of the Freundlich adsorption isotherm from kinetics. *J. Chem. Educ.* **86**, 1341–1343 (2009).
81. Periasamy, A. & Clegg, R. M. *Flim Microscopy in Biology and Medicine*. (CRC Press, 2009).
82. Gordon, R. G. Molecular Collisions and the Depolarization of Fluorescence in Gases. *J. Chem. Phys.* **45**, 1643 – 1648 (1966).

83. Tao, T. Time-dependent fluorescence depolarization and brownian rotational diffusion coefficients of macromolecules. *Biopolymers* **8**, 609–632 (1969).
84. Ichiye, T. & Karplus, M. Fluorescence depolarization of tryptophan residues in proteins: a molecular dynamics study. *Biochemistry* **22**, 2884–2893 (1983).
85. Scott, D. R., Vardeman, C. F., Corcelli, S. A. & Baker, B. M. Limitations of time-resolved fluorescence suggested by molecular simulations: assessing the dynamics of T cell receptor binding loops. *Biophys. J.* **103**, 2532–2540 (2012).
86. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2006).
87. Batista, M. R. B. Estudo computacional da mobilidade da hélice 12 de receptores nucleares. (2013).
88. Ghosh, R., Samajdar, R. N., Bhattacharyya, A. J. & Bagchi, B. Composition dependent multiple structural transformations of myoglobin in aqueous ethanol solution: A combined experimental and theoretical study. *J. Chem. Phys.* **143**, 015103 (2015).
89. Callis, P. R. in *Methods Enzymol.* (Johnson, M. L. & Brand, L.) 10–13 (Academic Press, 2010).
90. Vivian, J. T. & Callis, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109 (2001).
91. Pan, C.-P. & Barkley, M. D. Conformational effects on tryptophan fluorescence in cyclic hexapeptides. *Biophys. J.* **86**, 3828–3835 (2004).
92. Chen, Y. & Barkley, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**, 9976–9982 (1998).