

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Curso de Química Medicinal

Gustavo Hagen

Avaliação *in silico* da enzima haloalcano desalogenase: Potenciais híbridos de Química Quântica/ Mecânica Molecular (QC/MM) para o estudo mecanístico da *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LinB).

Porto Alegre

2022

Gustavo Hagen

Avaliação *in silico* da enzima haloalcano desalogenase: Potenciais híbridos de Química Quântica/ Mecânica Molecular (QC/MM) para o estudo mecanístico da *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LinB).

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao curso de Química Medicinal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Ruggiero Bachega

Porto Alegre

2022

PREÂMBULO

Avaliação in silico da enzima haloalcano desalogenase: Potenciais híbridos de Química Quântica/ Mecânica Molecular (QC/MM) para o estudo mecanístico da Sphingomonas paucimobilis UT26 (LinB).

(A ser submetido ao periódico **Journal of Molecular Graphics and Modelling**)

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-molecular-graphics-and-modelling/1093-3263/guide-for-authors>

(Fator de impacto: 2.518)

Gustavo Hagen,^a José Fernando Ruggiero Bachega,^a

^a UFCSPA, Rua Sarmiento Leite 245, Centro Histórico, Porto Alegre, Brasil. Tel: (51) 3303-8700; E-mail: gustavohagen@ufcspa.edu.br

CIP - Catalogação na
Publicação

Hagen, Gustavo

Avaliação in silico da enzima haloalcano desalogenase:
Potenciais híbridos de Química Quântica e Mecânica
Molecular (QC/MM) para o estudo mecanístico da
Sphingomonas paucimobilis UT26 (LinB) / Gustavo Hagen. 11
2022.

333 f.

Orientador: José Fernando Ruggiero Bacheга

Trabalho de conclusão de curso de Graduação --
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto
Alegre, Bacharelado em Química Medicinal, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Química Computacional. 2. QC/MM. 3. Enzimologia 3. 4.
Desalogenases
4. I. Bacheга, José Fernando.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Desalogenases e o meio ambiente.....	1
Métodos híbridos de QC/MM.....	1
A biblioteca pDynamo e a interface Easyhybrid.....	2
OBJETIVOS	2
METODOLOGIA.....	2
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	3
CONCLUSÃO.....	5
REFERÊNCIAS.....	5

ABSTRACT

The organic halogen compounds, especially the solvents, are part of the life cycle of various products. Besides, this class of molecules can sink into the environment as toxic residues/waste. Due to this fact, efforts and investments are needed to build a structure capable of dealing with the waste generated from this activity. After decades of advances, there is still massive disposal of these substances in the ecosystems. The haloalkane dehalogenase enzyme is involved in the activity of degradation of a range of cyclical and aliphatic halogen compounds. Hence, microorganisms that have these enzymes in their metabolism present a biotechnological potential for applying biorremediation in contaminated environments. Computational models can predict the efficiency of the catalytic power of these enzymes when exposed to the compounds that result from the anthropogenic action. The hybrid computational methods of quantum chemistry/molecular mechanics (QC/MM) are powerful tools for the exploratory process of enzymatic reactions. This research aims to apply computational methods to study the efficiency of the haloalkane dehalogenase enzyme, The work method comprises the performance of molecular dynamics simulation, using the AMBER family force fields. The hybrid calculations were implemented through the program EasyHybrid, connected to the pDynamo software. From this configuration and according to the results, the reaction path presents a slow step of S_N2 reaction, followed by hydrolysis for the intermediary break and product formation. It was possible to prove that the size of the quantum region and the halogen atom of the substrate directly impact the energetic barrier of the reaction.

RESUMO

Os compostos orgânicos halogenados, principalmente os solventes, fazem parte do ciclo de vida de diversos produtos. Além disso, esta classe de moléculas pode penetrar no meio ambiente como resíduos tóxicos. Devido a este fato, são necessários esforços e investimentos para construir uma estrutura capaz de lidar com os resíduos gerados nesta atividade. Após décadas de avanços, ainda há descarte massivo dessas substâncias nos ecossistemas. A enzima haloalcano desalogenase está envolvida na atividade de degradação de uma variedade de compostos halogenados cíclicos e alifáticos. Assim, microrganismos que possuem essas enzimas em seu metabolismo apresentam potencial biotecnológico para aplicação de biorremediação em ambientes contaminados. Modelos computacionais podem prever a eficiência do poder catalítico destas enzimas quando expostas aos compostos resultantes da ação antrópica. Os métodos computacionais híbridos de química quântica/mecânica molecular (QC/MM) são ferramentas poderosas para o processo exploratório de reações enzimáticas. Esta pesquisa tem como objetivo aplicar métodos computacionais para estudar a eficiência da enzima haloalcano desalogenase. O método de trabalho compreende a realização de simulação de dinâmica molecular, utilizando os campos de força da família AMBER. Os cálculos híbridos foram implementados através do programa EasyHybrid, conectado ao software pDynamo. A partir desta configuração e de acordo com os resultados, o caminho reacional apresenta uma etapa lenta de reação S_N2 , seguida de hidrólise para a quebra intermediária e formação do produto. Foi possível comprovar que o tamanho da região quântica e o átomo de halogênio do substrato impactam diretamente na barreira energética da reação.



Avaliação *in silico* da enzima haloalcano desalogenase: Potenciais híbridos de Química Quântica/ Mecânica Molecular (QC/MM) para o estudo mecanístico da *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LinB).

Gustavo Hagen,^a José Fernando Ruggiero Bachega^a

^aUFCSA, Rua Sarmento Leite 245, Centro Histórico, Porto Alegre, Brasil. Tel: (51) 3303-8700; E-mail: gustavohagen@ufcsa.edu.br

A enzima haloalcano desalogenase está envolvida na atividade de degradação de uma ampla gama de compostos cíclicos e alifáticos halogenados. Deste modo, microrganismos que as possuem em seu metabolismo apresentam um potencial biotecnológico para aplicação na biorremediação de ambientes contaminados. Os métodos computacionais são ferramentas no processo exploratório de reações enzimáticas. Neste trabalho, foi avaliada a atividade da enzima haloalcano desalogenase no processamento e clivagem da ligação entre o carbono e três diferentes halogênios. Uma varredura da trajetória de reação da enzima foi realizada para calcular a barreira energética do processo. Dois métodos semi-empíricos distintos foram escolhidos para região QC. A interface *EasyHybrid* foi utilizada como interface para realização dos cálculos e visualização das etapas. Como era esperado os diferentes halogênios apresentaram diferentes variações de energia de acordo com a trajetória da reação inicial. A etapa hidrolítica e determinante para reação, requer uma importante contribuição da HID₂₇₂.

Introdução

As enzimas são, naturalmente, entidades moleculares responsáveis por acelerar os processos biológicos e sua eficiência depende de um múltiplo reconhecimento molecular¹. O químico Linus Pauling estabeleceu o conceito que o substrato é atraído para o sítio ativo da enzima por intermédio de ligações fracas, e que, um estado de transição é criado para formação do produto². Deste modo, considerando o alto nível de especificidade entre a enzima e o substrato, torna-se extremamente complexo compreender experimentalmente os seus mecanismos. Por outro lado, há um enorme interesse em estudar e compreender o caminho dessas reações e os fatores que influenciam a cinética dos mecanismos. Neste sentido, ferramentas computacionais oferecem resultados com acurácia para auxiliar na busca por informações preditivas³. Este trabalho conduz um protocolo de simulação híbrida para a avaliação *in silico* da enzima haloalcano desalogenase.

Desalogenases e o meio ambiente

Os microrganismos desempenham papéis importantes na remediação de ambientes contaminados por organohaletos por meio de enzimas desalogenases. Elas estão naturalmente disponíveis ou evoluídas paralelamente por se desenvolverem em ambientes com maior concentração de tais espécies químicas⁴. As várias desalogenases catalisam a desalogenação independente de cofatores e em condições aeróbias ou anaeróbias⁵. São capazes de processar diferentes substratos, variando em tamanho e tipo do haletos. Koudelakova e colaboradores mostraram que as desalogenases tendem a ser menos eficientes para compostos antropogênicos⁶. Este ponto é importante, pois revela que as via metabólicas são, muitas vezes, incompletas para processar estes tipos de compostos, o que resulta em intermediários tóxicos que comprometerão a integridade do organismo.

Uma importante integrante desta classe é a enzima haloalcano desalogenase, uma alfa/beta hidrolase que apresenta semelhança com outras famílias de enzimas desalogenases. Uma investigação dessas enzimas revelou um mecanismo de S_N2 envolvendo uma tríade catalítica⁷. No sítio ativo, o oxigênio carboxilato de um aspartato inicia um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do substrato ligado no halogênio, assim, produzindo um íon haletos e um intermediário alquil-enzima com uma ligação éster. O próximo par ácido-base atrai uma molécula subsequentemente de água para produzir um hidróxido nucleofílico para um ataque ao carbono da ligação éster. Isso gera um intermediário tetraédrico que imediatamente se decompõe para formar um álcool derivado do substrato, protonado pelo hidrogênio da ativação da água⁸. Estudos computacionais contribuíram para elucidar a etapa hidrolítica da reação de desalogenação em *Sphingobium paucimobilis* e propor novos rumos para aplicação industrial destes microrganismos⁸. Diante disso, há uma quantidade substancial de informações estruturais, cinéticas, mecanísticas e de modelagem molecular disponíveis sobre as HDLs^{9,10}. Atualmente, o conhecimento sobre a relação entre a estrutura e a função destas enzimas torna-se relevante para aplicações na biorremediação de poluentes ambientais e biossensores de produtos tóxicos^{11,12}.

Métodos Híbridos QC/MM

A complexidade das enzimas e o amplo espectro de reações que elas catalisam levaram a muitos debates sobre seus mecanismos e princípios catalíticos. As dificuldades técnicas experimentais de estudar tais reações tornam esses questionamentos difíceis de serem respondidos. Os métodos combinados de química quântica / mecânica molecular (QC/MM ou QM/MM) são potentes ferramentas na área de enzimologia computacional¹³. A técnica permite que mecanismos de reações enzimáticas possam ser testados, incluindo o efeitos de mutações.

A dinâmica das proteínas também pode ser simulada, identificando mudanças conformacionais que podem estar associadas à reação. Os métodos QC / MM fornecem evidências para apoiar hipóteses além das obtidas por técnicas experimentais^{14,15}, fornecendo a descrição do potencial quântico de tais sistemas porque podem determinar estrutura eletrônica dos primeiros princípios e assim permitir a exploração de processos, como quebra de ligação e formação, transferência de carga e excitação eletrônica.

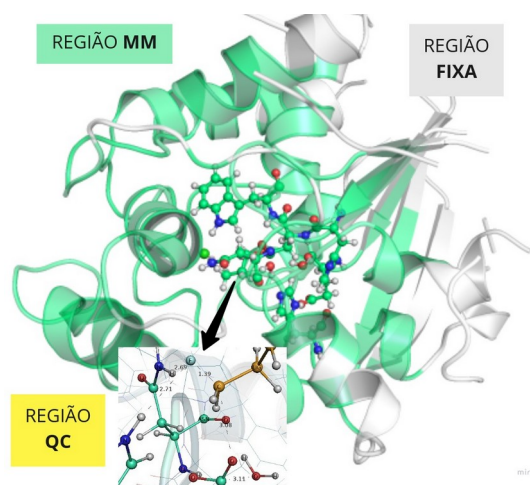


Fig.1 - Representação de um sistema utilizando potenciais híbridos.

Fonte: O Autor

A estratégia em simulações híbridas QC/MM (figura 1) baseia-se na escolha de reduzido número de átomos (sítio ativo e substrato) que serão tratados por QC, quaisquer outros átomos do sistema serão descritos por potenciais de MM¹⁶. Existe ainda um termo híbrido do sistema que descreve as interações entre as duas regiões de interesse, permitindo que as cargas pontuais clássicas da região MM exerça influência sobre densidade eletrônica na região QC (efeito de polarização)¹⁷. Essa metodologia reduz drasticamente o tempo computacional da simulação, limitado apenas pelo tamanho da região QC escolhida e pelo nível de teoria utilizado.

A biblioteca pDynamo e a ferramenta EasyHybrid

O pDynamo é uma biblioteca de simulação gratuita e de código aberto. Em sua atual versão, é possível realizar simulações MM, utilizando-se de um dos campos de força disponíveis (AMBER, CHARMM ou OPLS)¹⁸, assim como QC, por meio dos métodos semiempírico ou *ab initio*. O pacote pDynamo¹⁹ foi desenvolvido para simulações híbridas de QC/MM, juntando as duas metodologias de forma eficiente⁵. desenvolveram uma ferramenta gráfica em colaboração com o Dr. Martin Field (criador da biblioteca pDynamo) e o Dr. Troy Wymore, com objetivo de ajudar novos usuários a utilizarem essa biblioteca. A interface, EasyHybrid¹⁷ - GTKDynamo (figura 2), foi construída utilizando-se a linguagem Python e a biblioteca gráfica GTK+ (a mesma utilizada para a construção do ambiente gráfico GNOME e programa GIMP).

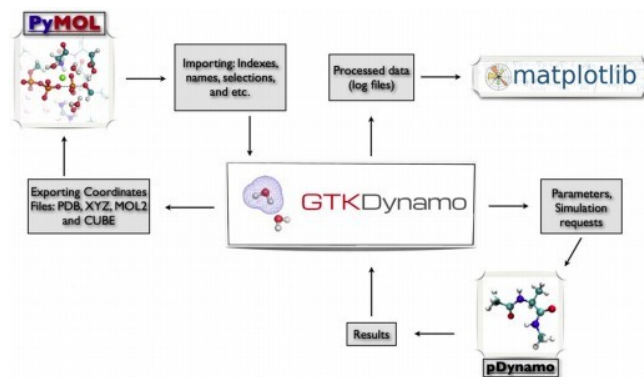


Fig. 2 - GTKDynamo é implementado como uma janela PyMOL extra que permite o acesso a uma ampla gama de recursos do pDynamo. As funcionalidades da interface são apresentadas na tabela 1.

Extraído de: BACHEGA, J. F. R. et al. 2013

Ela funciona como um módulo acoplado ao programa PyMOL²⁰ e permite aos usuários executarem rotinas básicas tais como; cálculos de energia, otimização de geometria, cálculo de modos normais e dinâmica molecular. Uma das principais aplicações de métodos híbridos QC/MM é o estudo de reações químicas. Por essa razão, várias ferramentas computacionais especialmente destinadas a modelagem de reações enzimáticas foram incorporadas ao programa EasyHybrid. Dentre as principais podemos destacar a varredura de coordenadas de reação (Scan 1D e 2D) e amostragem guarda-chuva (*umbrella sampling*).

Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é aplicar simulações híbridas do tipo química quântica/mecânica molecular para estudar o mecanismo de ação da enzima haloalcano desalogenase. Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Adquirir compreensão da base teórica e do estado da arte no que se refere às metodologias de estudo de biomoléculas;
- Estudar e compreender a eficiência catalítica da enzima haloalcano desalogenase para substratos com átomos cloro, bromo e flúor;
- Desenvolver e aplicar um protocolo de simulação híbrida;
- Analisar os resultados das simulações.

Metodologia

Foram aplicados dois níveis diferentes de protocolo de simulação. O sistema de QC/MM foi calculado por equações de dinâmicas e campos de força, no qual foi amostrado estruturas reativas representativas de potenciais para escanear possíveis caminhos de reação. A estrutura cristalográfica da enzima foi o ponto de partida do trabalho a partir do PDB:2FJ6. Um substrato de interesse foi desenhado com origem nas coordenadas espaciais do átomo de halogênio presente no sítio ativo da estrutura cristalográfica. Assim um novo substrato foi inserido na enzima gerando um arquivo de entrada para a biblioteca *complexo.pdb*, além deste, um outro arquivo somente do novo ligante *lig.mol2* foi criado pois não há modelos de cargas parciais parametrizados, como o caso dos aminoácidos da enzima.

O *input* do ligante foi tratado com cargas parciais *am1bcc* através do programa *Antechamber* e o *input* do complexo tratado com campos de força da família AMBER. Para isso foram utilizados o campo de força GAFF (*generic amber force field*), o ff99SB e o TIP3P para a água. A montagem de cada sistema enzimático solvatado foi realizada no programa *tleap*, compatível para os cálculos híbridos e a determinação dos caminhos de reações. O EasyHybrid acoplado ao programa pDynamo foi utilizado como interface para os simulação com métodos quânticos semi-empíricos AM1 e PM6. Um resumo da metodologia está apresentado pela figura 3.

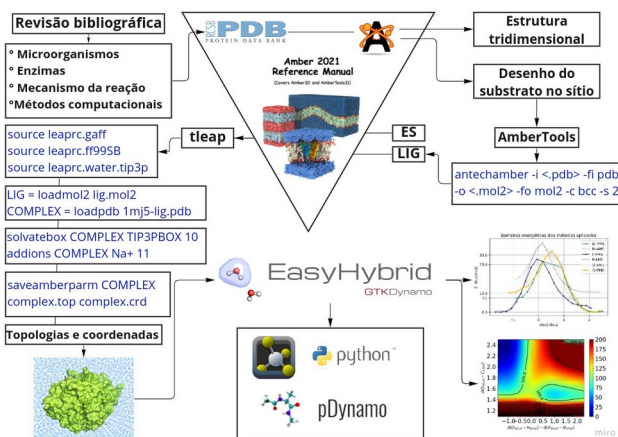


Fig. 3 - Resumo da metodologia desenvolvida para o trabalho.

Resultados e discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados da avaliação *in silico* do mecanismo da enzima haloalcano desalogenase da *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LINB). A partir do C_{2230} o sistema foi definido por um raio de 25 Å. Do centro até 20 Å os átomos foram relaxados e os 5 Å externos deste raio foram os átomos fixos. A minimização de energia foi realizada em 200 passos e o resultado está apresentado na figura 4.

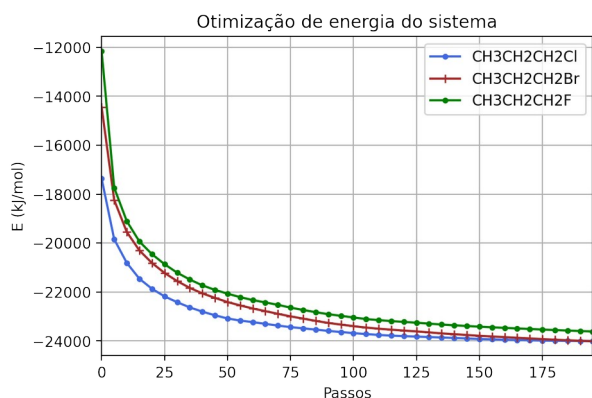


Fig 4 - Aplicação do potencial de MM e minimização de energia dos sistemas. O gráfico de otimização de energia para os casos dos substratos ligados aos halogênios cloro, bromo e flúor.

O resultado apresentado pela minimização de energia demonstra uma sutil diferença na estabilização do sistema em relação aos halogênios. De acordo com as energias dos sistema, o modelo com cloro e bromo alcançam os mesmos valores de estabilidade, enquanto o complexo com flúor apresenta resultados mais altos. Para a avaliação dos resíduos determinantes a serem incluídos na região QC foram propostos 5 modelos de simulação para o caso do complexo com o átomo de cloro como representante dos halogênio (figura 5).

O primeiro modelo QC incluiu apenas os átomos envolvidos na S_N2 e os responsáveis pela estabilização do haleto (QC = 9). A incorporação dos demais átomos do ASP₁₀₈ e do LIG₁₆₉ representam QC = 23. Para a região QC = 57 foram incluídos os resíduos completos do sítio de estabilização do haleto (TRP₁₃₈ e ASN₃₇). As demais regiões foram crescendo de tamanho pela inclusão dos resíduos de HID₂₇₂, GLU₁₃₇, PHE₁₅₀, HIE₁₀₆, GLY₃₇ e duas moléculas de H₂O.

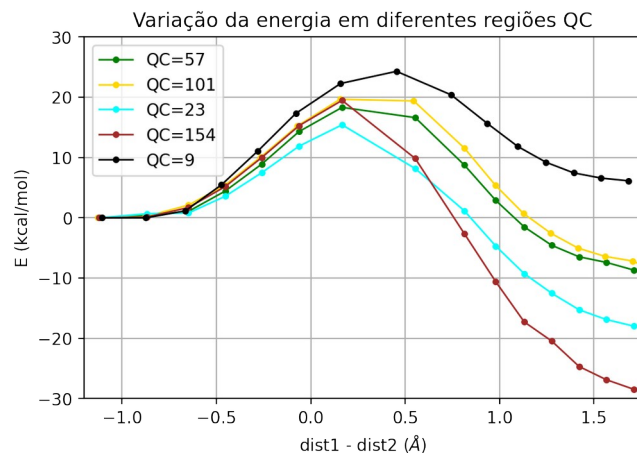


Fig. 5 - Gráfico dos resultados da simulação com diferentes tamanhos da região QC para a desalogenação do cloro.

No gráfico o eixo X representa a diferença entre as distâncias 1 e 2. A *dist1* nos diz o quanto o Cl_{2229} e C_{2230} se afastam no caminho da S_N2 , enquanto a *dist2* é a aproximação entre o O_{1305} e do C_{2230} . A medida que a *dist1* é maior do que a *dist2* a reação de desalogenação se desloca em direção da formação dos produtos. Por achados da literatura⁸, sabe-se que a barreira energética calculada por métodos *ab initio* é de 20 kcal.mol⁻¹. Dados experimentais revelaram que a barreira energética da desalogenação de organohalotos com cloro catalisada pela haloalcano desalogenase é de 15.3 kcal.mol⁻¹¹⁰. Os resultados obtidos neste trabalho para a barreira energética da etapa S_N2 estão dispostos na tabela 1. Sendo a proposta inicial deste trabalho seguir com o refinamento dos resultados com a aplicação de métodos *ab initio*, a região preferida foi a QC = 101. Por outro lado, a região que mais se aproxima do valor experimental da desalogenação é a QC = 23.

Tabela 1 - Resumo das barreiras energéticas calculadas em relação ao tamanho da região quântica.

Região QC	Carga do sistema	ΔE (kcal.mol ⁻¹)
9	-1	24,30
23	-1	15,44
57	-1	18,32
101	-2	19,67
154	-2	19,49

Quando a contribuição da região MM é desconsiderada no calculada da energia potencial os valores de barreira energética assumem valores que se afastam dos descritos pela literatura. Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 6 e pela tabela 2.

Tabela 2 - Resumo das barreiras energéticas calculadas sem considerar o termo MM.

Região QC	Carga do sistema	ΔE (kcal.mol ⁻¹)
9	-1	26,98
23	-1	27,66
57	-1	33,19
101	-2	77,67
154	-2	78,99

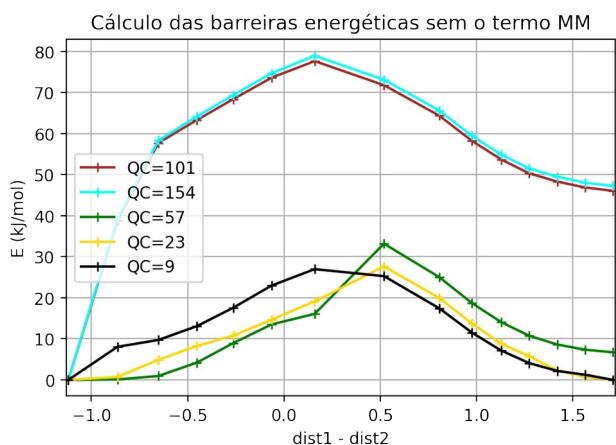


Fig. 6 - Gráfico dos resultados da simulação com diferentes tamanhos da região QC para a desalogenação do cloro. Neste caso, o termo MM é desconsiderado da função de energia.

O desvio destes valores era esperado, uma vez que, a contribuição da região MM é responsável pela estrutura conformacional do complexo e sabe-se que o mecanismo enzimático vai além do que somente o sítio ativo. Além disso, o termo híbrido de fronteira também é excluído do resultado da energia, portanto, além da incorporação mecânica aqui também o sistema perde na incorporação polarizável.

Para o tamanho de região QC preferido foram geradas simulações da etapa de S_N2 para os sistemas com os três halogênios e os resultados estão apresentados na figura 7 e dispostos na tabela 3.

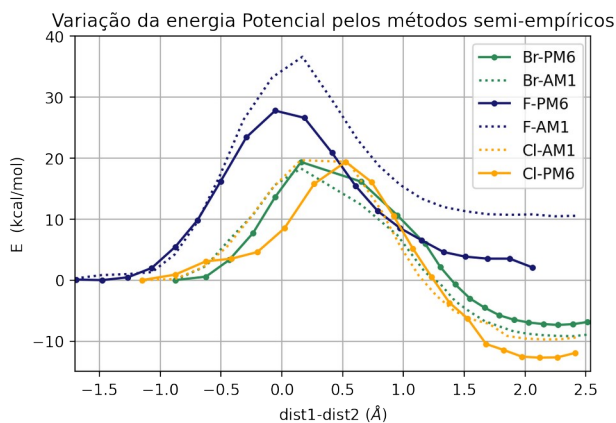


Fig. 7 - Gráfico dos valores de energia potencial obtidos nas reações de S_N2 dos halogênios. O tamanho da região QC foi definido em 101 átomos e os métodos semi-empíricos foram o AM1 e PM6.

Tabela 3 Resumo das barreiras energéticas calculadas para os halogênios e métodos AM1 e PM6.

Método semi-empírico	Halogênio	ΔE (kcal.mol ⁻¹)
AM1	F	36,35
AM1	Cl	19,67
AM1	Br	18,31
PM6	F	27,70
PM6	Cl	19,40
PM6	Br	19,38

As figuras 8 e 9 revelam a posição da água hidrolítica no início da segunda etapa da reação. Na proposta deste trabalho a trajetória foi varrida em duas dimensões, em que, a água deve ser desprotonada pela HID_{272} e a hidroxila (água ativada) agindo como nucleófilo na hidrólise do produto.

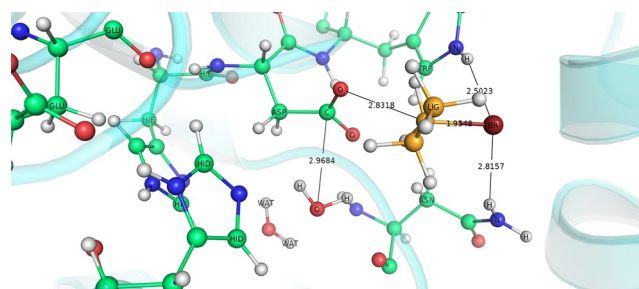


Fig. 8 - Posição inicial dos átomos localizados no sítio ativo da enzima.

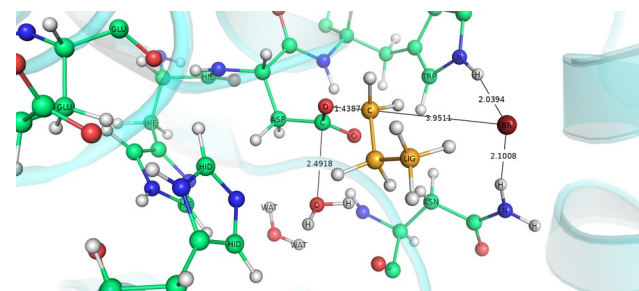


Fig. 9 - O deslocamento da molécula de água durante a primeira etapa do mecanismo e a importância dela pertencer ao conjunto de átomos QC. Quando comparamos a posição da H_2O com a da figura 8 é possível observar que a água se aproxima em 0,5 Å da carbonila que posteriormente será hidrolisada após o final da S_N2 .

As cargas atômicas dos representantes centrais da reação de S_N2 foram calculadas pelo software PRIMO_RDIa e a mudanças ao longo da reação estão apresentadas na figura 10. Após o início da reação e o estiramento da ligação entre o halogênio e o carbono, as cargas variam até o ponto, em que, o carbono está mais suscetível para um ataque eletrofílico e sofre o ataque do O_{1306} do ASP_{107} . Após reação superar a etapa lenta, o substrato e a enzima foram um intermediário do tipo esterificado, em que, o carbono termina a reação com uma carga mais positiva do que a inicial.

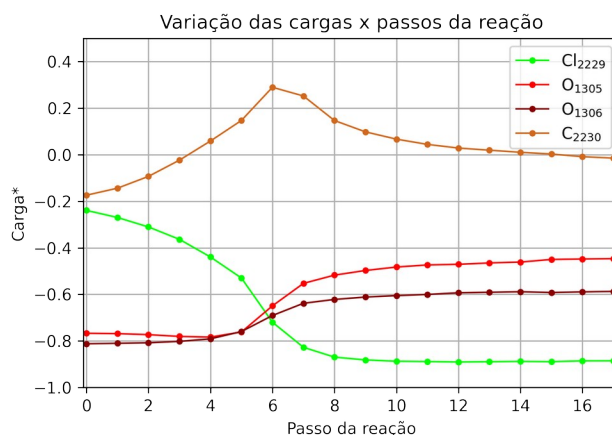


Fig. 10 - Gráficos da variação das cargas dos átomos centrais da reação de S_N2 .

Para um melhor entendimento da segunda etapa da reação, duas moléculas de água foram incluídas na região QC desde a primeira etapa, de modo que ao final da varredura suas posições fossem registrada ao longo do mecanismo. De acordo com os resultados obtidos na varredura das coordenadas da etapa hidrolítica, a barreira do potencial energético apresentado é minimamente menor que a primeira etapa.

Pelo gráfico da figura 11, é possível observar que, à medida que a distância entre o C₁₃₀₄ do resíduo ASP₁₀₇ e o O₄₀₁₉ da água diminui há duas regiões de estabilidade representadas pelos poços azuis (R e P). Quando o comprimento dessa distância é 1,5 Å há somente um poço de estabilidade, sendo possível a reação transitar até ele quando a variação das distâncias da desprotonação da água (eixo X) está entre 0,5 e 1,5 Å. Portanto, o caminho da reação depende da aproximação do H₄₀₂₀ da água e do N₃₇₉₅ da HID₂₇₂, assim como, da aproximação do C₁₃₀₄ do resíduo ASP₁₀₇ e o O₄₀₁₉ da água. Quando essas distâncias estão próximas o suficiente para formar novas ligações, o caminho da reação segue entre os dois poços de equilíbrio representados pelas áreas mais azuis do gráfico. Por fim, para que a reação possa transitar entre as zonas de equilíbrio é necessário ultrapassar uma barreira de 80 kJ. mol⁻¹ (ES). Assim, estes resultados propõem que o mecanismo da reação de desalogenação pela enzima haloalcano desalogenase é iniciado por uma etapa lenta de SN₂, formação de um intermediário, seguido de hidrólise para formação de um produto alcoólico, conforme a apresentado pela figura 11.

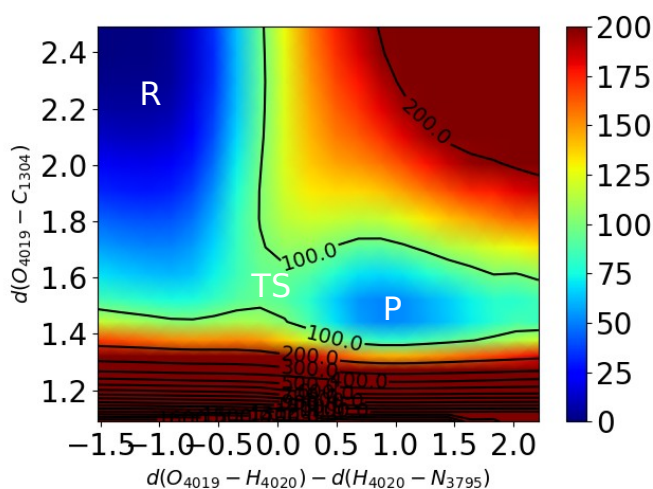


Fig 11 - Gráficos de superfície 2D do perfil energético em relação a variação das distâncias entre os átomos selecionados para a varredura da reação.

Conclusão

Neste trabalho foi investigado o mecanismo de reação da haloalcano desalogenase de *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LINB) usando uma variedade de potenciais híbridos QC/MM. Baseado na literatura e na combinação deste protocolo de simulação encontrou-se um mecanismo de duas etapas com a formação de um intermediário. Este mecanismo consiste em uma etapa lenta referente a reação de SN₂, em que, as barreiras energéticas foram calculadas a partir de 5 regiões QC. No modelo QC com 23 átomos o resultado foi o mais aproximado do valor experimental de desalogenação do cloro. A reação segue com a liberação do complexo enzima-substrato por uma hidrólise e a formação de um álcool correspondente. De acordo com os resultados obtidos, a enzima haloalcano desalogenase não é capaz de clivar a ligação entre o carbono e o flúor, visto que, essa reação excederia uma barreira energética de no mínimo 27,70 kcal.mol⁻¹.

Para o caso do halogênio ser um átomo de cloro, o método AM1 e a região quântica com 23 átomos apresentou o resultado mais aproximado dos dados experimentais disponíveis na literatura. Também foi possível comparar a relação entre o tamanho de cada região quântica com a barreira energética envolvida na reação. Por fim, a contribuição da região MM e da região de fronteira na função resposta da energia foi avaliada como fundamental para alcançar valores aproximados aos da literatura.

Dentre as limitações da execução do trabalho, destaca-se o alto custo computacional das simulações. Tal fator foi um impeditivo para a realização da aplicação de métodos *ab initio* e amostragens guarda-chuva para as trajetórias obtidas. Essas etapas são propostas de trabalhos futuros, a partir dos quais poderão ser obtidos resultados com redução de incertezas.

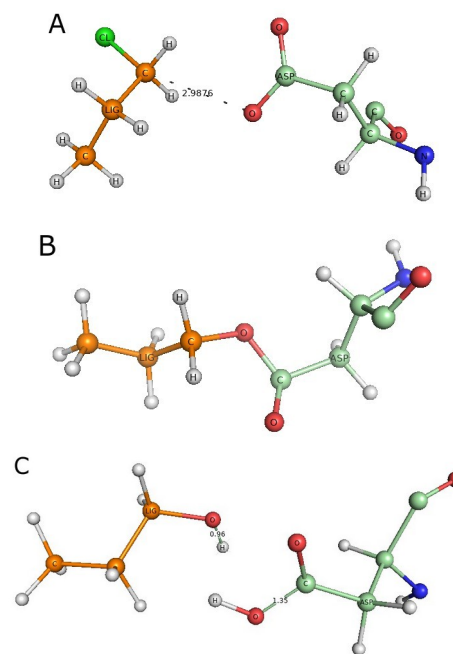


Fig. 12 - Representação simplificada das etapas da desalogenação. A) Posição do substrato após a otimização de energia. B) Intermediário da reação de S_N2. C) Produto final da hidrólise.

Referências

- 1 H. Kang and M. Zheng, *Computational and Theoretical Chemistry*, 2021, **1204**, 1–8.
- 2 W. Zhu and Y. Liu, *Int. J. Quantum Chem.*, 2014, 1–9.
- 3 C. Lennartz, A. Schäfer, F. Terstegen and W. Thiel, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**, 1758–1767.
- 4 Y. Yue, J. Chen, L. Bao, J. Wang, Y. Li and Q. Zhang, *Chemosphere*, 2020, **254**, 1–9.
- 5 S. D. Copley, *Chemistry and Biology*, 1997, **4**, 169–174.
- 6 T. Koudelakova, *Biotechnology Journal*, 2013, **8**, 32–45.
- 7 P. Banás, J. Damborský, P. Carloni and A. Magistrato, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **70**, 887–3585.
- 8 T.-F. Ang, J. Maiangwa, A. B. Salleh, Y. M. Normi and T. C. Leow, *Molecules*, 2018, **23**, year.
- 9 K. Kahn and T. C. Bruice, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**, 6876–6885.

- 10 S. Bidmanova, M. Monincov, R. Chaloupkov, Z. Prokop, Y. Ohtsubo, K. Minamisawa, M. Tsuda, J. Damborsk and Y. Nagata, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **5**, 1618–2650.
- 11 J. D. Pai, P. Mehrabi, E. C. Schulz, R. Dsouza, H. M. Müller-Werkmeister, F. Tellkamp and R. J. D. Miller, *Science*, 2017, **32**, 116–125.
- 12 T. D. Lin, H., *Theor Chem Acc*, 2007, 117–185.
- 13 G. Monard, *Int. J. Quantum Chem.*, 2003, 229–244.
W. van der Kamp and A. J. Mulholland, *Biochemistry*, 2013, **52**, 2708–2728.
- 15 N. M. F. S. A. Cerqueira, *ChemPhysChem.*, 2018, **29**, 669–689.
J. Field, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, **4**, 1151–1161.
- 17 J. F. R. Bachege, M. Monincova, R. Chaloupkova, Z. Prokop, Ohtsubo, K. Minamisawa, M. Tsuda, J. Damborsky and Y. Nagata, *J. Comput. Chem.*, 2013, **34**, 2190–2196.
- 18 J. Sloop, *Open Journal of Biophysics*, 2017, **7**, 669–689.