



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ROBSON LOURENÇO DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO *in silico* DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO 4-NONILFENOL E
DE SEUS INTERMEDIÁRIOS PELA LACASE PROVENIENTE DE *Trametes
villosa* (SW.) KREISEL E *Trametes lactinea* (BERK.) SACC.**

RECIFE
2024

ROBSON LOURENÇO DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO *in silico* DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO 4-NONILFENOL E
DE SEUS INTERMEDIÁRIOS PELA LACASE PROVENIENTE DE *Trametes
villosa* (SW.) KREISEL E *Trametes lactinea* (BERK.) SACC.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Motteran

**RECIFE
2024**

Catalogação na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Santos, Robson Lourenço da Silva.

Avaliação *in silico* do potencial de degradação do 4-nonilfenol e de seus intermediários pela lacase proveniente de *Trametes villosa* (SW.) Kreisel e *Trametes lactinea* (Berk.) Saac. / Robson Lourenço da Silva Santos. – 2024.

103 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Fabrício Motteran.

.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências.

1. Poluentes emergentes. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Docking molecular. 4. Dinâmica molecular. 5. Biorremediação. I. Motteran, Fabrício (Orient.). II. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-067

ROBSON LOURENÇO DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO *in silico* DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO 4-NONILFENOL E
DE SEUS INTERMEDIÁRIOS PELA LACASE PROVENIENTE DE *Trametes
villosa* (SW.) KREISEL E *Trametes lactinea* (BERK.) SACC.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 31/01/2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Motteran
UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Amanda Reges de Sena
IFPE

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva
UFCA

“O otimista é um tolo. O pessimista, um
chato. Bom mesmo é ser um realista
esperançoso.”
(Ariano Suassuna)

RESUMO

Poluentes emergentes como o 4-nonilfenol causam sérios danos ambientais e à saúde humana, o que tem despertado cada vez mais preocupação em relação ao seu nível de concentração em compartimentos ambientais uma vez comprovada sua atividade estrogênica. A atuação do 4-nonilfenol como desregulador endócrino pode causar efeitos adversos como infertilidade, tanto em humanos quanto em outros organismos, aquáticos ou terrestres, e alterações fisiológicas em organismos vegetais. A lacase é uma enzima de ampla aplicabilidade biotecnológica e sabe-se que tem alta capacidade de degradação de compostos fenólicos. No entanto, estudos da interação desta enzima com o 4-nonilfenol limitam-se à descrição do complexo modelado sem uma investigação dos mecanismos de degradação no que diz respeito à relação estrutura-atividade. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre a lacase de *Trametes villosa* e *Trametes lactinea* e os derivados do nonilfenol etoxilado (NF2EO, NF1EO, NF2EC, NF1EC e 4NF), de forma a compreender os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação utilizando técnicas de bioinformática. Para isso, os cálculos para os parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade foram realizados a partir dos compostos otimizados pelos métodos clássico MMFF94s e semiempírico PM7 utilizando o MOPAC 2016 e em seguida as estruturas tridimensionais para a lacase foram obtidas por modelagem por homologia e foi aplicada a técnica de *docking* molecular. Os resultados obtidos mostraram através dos descritores de reatividade que os derivados do nonilfenol etoxilado são de difícil degradação sendo considerados de alta dureza, portanto, persistentes na natureza. Os modelos para a lacase de *T. villosa* e *T. lactinea* foram avaliados por meio do gráfico de Ramachandran em que foi demonstrado que 90% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões favoráveis, somando 99,8 e 99,5% em regiões favoráveis, permitidas e aceitáveis para a LacTv e LacTI, respectivamente. Foi demonstrada ainda, uma forte correlação entre a energia de ligação dos nonilfenóis com a lacase e os descritores de reatividade de dureza, potencial de ionização e eletronegatividade. Os resultados do *docking* permitiram observar que a interação entre a lacase e os nonilfenóis é espontânea e que os resíduos de aminoácidos Ala 430, Arg 443, Gln 262, Glu 322, Gly 412, His 478, Ile 321, Leu 184, Phe 182, Phe 259, Phe 352, Pro 411, Pro 414 e Ser 447 são sugeridos como os resíduos mais importantes na formação do complexo LacTv-4NF e os resíduos Ala 101, His 132, Phe 102, Leu 133, Pro 367, Leu 478, Thr 424, Gln 461, Phe 90, His 423, His 92 e Phe 90 são centrais na interação com a LacTI, sendo estes, responsáveis pela estabilidade da conformação ativa da lacase por favorecer a complexação com os nonilfenóis. Ainda foi possível demonstrar através da dinâmica molecular que os complexos lacase-4NF são estáveis ao longo do tempo e possuem uma forte afinidade de ligação com ΔG_{bind} de -26,45 e -17,73 kcal.mol⁻¹ para LacTv-4NF e LacTI-4NF, respectivamente. Portanto, esses resultados evidenciam que a lacase proveniente das espécies *T. villosa* e *T. lactinea* possuem alto potencial para degradar o 4NF e seus intermediários.

Palavras-chave: Poluentes emergentes; desreguladores endócrinos; *docking* molecular; dinâmica molecular, biorremediação.

ABSTRACT

Emerging pollutants such as 4-nonylphenol cause serious damage to the environment and to human health, which has raised increasing concern about their concentration levels in environmental compartments once their estrogenic activity has been proven. The action of 4-nonylphenol as an endocrine disruptor can cause adverse effects such as infertility, both in humans and in other organisms, aquatic or terrestrial, and physiological alterations in plant organisms. Laccase is an enzyme with wide biotechnological applicability and is known to have a high capacity for degrading phenolic compounds. However, studies of the interaction of this enzyme with 4-nonylphenol are limited to describing the modeled complex without investigating the degradation mechanisms in terms of the structure-activity relationship. In this sense, the aim of this work was to evaluate the interaction between laccase from *Trametes villosa* and *Trametes lactinea* and the ethoxylated nonylphenol derivatives (NF2EO, NF1EO, NF2EC, NF1EC and 4NF), in order to understand the molecular mechanisms involved in this interaction using bioinformatics techniques. To this end, the calculations for the thermodynamic parameters and reactivity descriptors were carried out using the compounds optimized by the classical MMFF94s and semi-empirical PM7 methods using MOPAC 2016 and then the three-dimensional structures for laccase were obtained by homology modelling and the molecular docking technique was applied. The results obtained showed through the reactivity descriptors that the derivatives of ethoxylated nonylphenol are difficult to degrade and are considered to be highly hard and therefore persistent in nature. The models for laccase from *T. villosa* and *T. lactinea* were evaluated using the Ramachandran plot, which showed that 90% of the amino acid residues are in favorable regions, with a total of 99.8 and 99.5% residues in favorable, permitted, and acceptable regions for LacTv and LacTl, respectively. A strong correlation was also demonstrated between the binding energy of the nonylphenols with laccase and the reactivity descriptors of hardness, ionization potential and electronegativity. The docking results showed that the interaction between laccase and nonylphenols is spontaneous and that the amino acid residues Ala 430, Arg 443, Gln 262, Glu 322, Gly 412, His 478, Ile 321, Leu 184, Phe 182, Phe 259, Phe 352, Pro 411, Pro 414 and Ser 447 are suggested as the most important residues in the formation of the LacTv-4NF complex and residues Ala 101, His 132, Phe 102, Leu 133, Pro 367, Leu 478, Thr 424, Gln 461, Phe 90, His 423, His 92 and Phe 90 are central to the interaction with LacTl and are responsible for the stability of the active conformation of laccase by favoring complexation with nonylphenols. It was also possible to demonstrate through molecular dynamics that the laccase-4NF complexes are stable over time and have a strong binding affinity with ΔG_{bind} of -26.45 and -17.73 kcal.mol⁻¹ for LacTv-4NF and LacTl-4NF, respectively. Therefore, these results show that laccase from the *T. villosa* and *T. lactinea* species has a high potential for degrading 4NF and its intermediates.

Keywords: Emerging pollutants, endocrine disruptors, molecular docking, molecular dynamics, bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura química do 4 nonilfenol (C ₁₅ H ₂₄ O). Fonte: Própria, elaborada pelo autor em ChemSketch.....	25
Figura 3.2: Esquema da biodegradação de nonilfenóis de cadeia longa para 4NF em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: adaptado de DTSC (2018) e Ömeroğlu; Sanin (2014).....	27
Figura 3.3: a-) Estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i> evidenciando os domínios 1, 2 e 3 e a localização dos sítios T1, T2 e T3. Fonte: Mehra et al (2018). b-) Ciclo catalítico da lacase. Fonte: Adaptado de Baldrian (2006). c-) Representação dos diferentes aminoácidos do sítio ativo que coordenam os cobres catalíticos na lacase <i>Trametes versicolor</i> . Destacados em verde os aminoácidos da via histidina-cisteína. Fonte: Arregui et al (2019).	30
Figura 4.1: a-) Sequência fasta da lacase <i>T. villosa</i> (AAC41687.1); b-). Sequência fasta da lacase <i>T. lactinea</i> (KAH9897825.1) Fonte: GenBank (NCBI), imagem gerada pelo autor no Discovery Studio.	36
Figura 5.1: Sobreposição da estrutura do 4-nonilfenol (CID 1752) com a estrutura otimizada pelo MMFF94s. Fonte: Própria, elaborada no Avogadro e Discovery Studio.	43
Figura 5.2: Estimativa da qualidade do modelo 19 para a lacase de <i>T. villosa</i> prevista pelo cálculo do QMean (a) e resultado do Z-score para a estimativa do grau de confiança das características estruturais observadas no modelo, a fim de determinar o quanto a estrutura está próxima do seu enovelamento nativo (b). A faixa azul indica um melhor alinhamento entre a sequência do modelo com o template, a faixa vermelha sinaliza um alinhamento não favorável. Fonte: SWISS MODEL.	49
Figura 5.3: Estimativa da qualidade do modelo 28 para a lacase de <i>T. lactinea</i> prevista pelo cálculo do QMean (a) e resultado do Z-score para a estimativa do grau de confiança das características estruturais observadas no modelo, a fim de determinar o quanto a estrutura está próxima do seu enovelamento nativo (b). A faixa azul indica	

um melhor alinhamento entre a sequência do modelo com o template, a faixa vermelha sinaliza um alinhamento não favorável. Fonte: SWISS MODEL.50

Figura 5.4: a-) Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. villosa* (AAC41687.1) com a sequência molde do template utilizado para a modelagem (5a7e.1). b-) Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. lactinea* (KAH9897825.1) com a sequência molde do template utilizado para a modelagem (2hrhg.1). Em verde os resíduos conservados, em amarelo os conservativos, em azul os resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco os resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços (-) nas sequências apontam os “gaps”. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.51

Figura 5.5: Mapa de Ramachandran obtido pelo PROCHECK da LacTv modelada: As áreas em vermelho, amarelo e marrom claro indicam, respectivamente: local mais favorável, locais permitidos e locais aceitáveis de “locação” dos resíduos; as regiões brancas representam as regiões proibidas. A região em vermelho no campo superior esquerdo do mapa indica os resíduos que fazem parte de β -folhas. A região em vermelho no campo inferior esquerdo indica os resíduos que fazem parte de α -hélices.52

Figura 5.6: Mapa de Ramachandran obtido pelo PROCHECK da LacTI modelada: As áreas em vermelho, amarelo e marrom claro indicam, respectivamente: local mais favorável, locais permitidos e locais aceitáveis de “locação” dos resíduos; as regiões brancas representam as regiões proibidas. A região em vermelho no campo superior esquerdo do mapa indica os resíduos que fazem parte de β -folhas. A região em vermelho no campo inferior esquerdo indica os resíduos que fazem parte de α -hélices.53

Figura 5.7: Modelo da lacase de *T. villosa* sobreposto ao template 5A7E (PDB) da lacase de *Corioloropsis gallica*, em amarelo destaca-se o modelo obtido. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.54

Figura 5.8: Modelo da lacase de *T. lactinea* sobreposto ao template 2HRG (PDB) da lacase de *Trametes trogii*, em amarelo destaca-se o modelo obtido. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.55

Figura 5.9: Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. villosa* (AAC41687.1) com lacase de *T. lactinea* (KAH9897825.1). Em verde os resíduos conservados, em amarelo os conservativos, em azul os resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco os resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços (-) nas sequências apontam os “gaps”. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.56

Figura 5.10: a-) Sobreposição da pose de menor energia obtida pelo *redocking* à estrutura determinada experimentalmente para a interação do complexo p-metilbenzoato-lacasse de *T. troglia* (2HRG). b-) Interações observadas por meio do *docking* do complexo 4NF-2HRG. c-) Interações observadas por meio do *redocking* do complexo metilbenzoato-2HRG. d-) interações observadas para o complexo cristalino metilbenzoato-2HRG determinado experimentalmente.....58

Figura 5.11: Produtos e via de degradação pelo fungo *Thielavia sp.* proposta por Mtibaà et al. (2020) para o isômero do 4NF com a cadeia lateral linear avaliado neste trabalho, em que ocorre transformação abiótica (setas azuis) seguida de uma etapa biótica (seta laranja), estando envolvidos o Ácido 4-hidroxifenilacético (1), Ácido 2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) acético (2), Ácido 4-hidroxibenzoico (3) e ácido 3,4-Diidroxibenzóico (4). Fonte: Elaborada pelo autor em ChemSketch adaptada de Mtibaà et al. (2020).59

Figura 5.12: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com os compostos NF2EO (a) e NF1EO (b), ocorrentes quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.65

Figura 5.13: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com os compostos NF2EC (a) e NF1EC (b), ocorrentes somente quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condição aeróbia. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.66

Figura 5.14: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com o 4-NF. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.67

Figura 5.15: Representação 3D dos resíduos centrais de aminoácidos do sítio ativo da LacTV que interagem com os nonilfenóis. O pontilhado verde indica ligações de hidrogênio (A, C, D e E); o pontilhado cinza representa ligação carbono-hidrogênio (A, B e C), e também ligação π -doador (C e D); os pontilhados rosa claro representam as ligações alquil e π -alquil (A, B, C, D e E) e o pontilhado rosa mais escuro é para uma ligação π - π T-shaped com o anel aromático (B); os pontilhados lilás representam ligações π -sigma (A e B); o pontilhado vermelho destaca ligação doador-doador não favorável (A) e ligação aceptor-aceptor não favorável (B) e em marrom uma ligação π -ânion (E). Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.68

Figura 5.16: Complexo LacTV–4NF. a-) imagem total do complexo. b-) ampliação na região de ligação no sítio ativo. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.69

Figura 5.17: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com os compostos NF2EO (a) e NF1EO (b), ocorrentes quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.72

Figura 5.18: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com os compostos NF2EC (a) e NF1EC, ocorrentes somente quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condição aeróbia. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.73

Figura 5.19: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com o 4-NF. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.74

Figura 5.20: Representação 3D dos resíduos centrais de aminoácidos do sítio ativo da LacTI que interagem com os nonilfenóis. O pontilhado verde escuro indica ligações de hidrogênio (A, B, C e E) e verde claro destaca ligações de hidrogênio π -doador (A, B, C e D); em vermelho as interações desfavoráveis doador-doador (D e E) e interação desfavorável aceptor-aceptor (B); em rosa escuro as interações π - π em formato de T (A, B, C e D) e em rosa claro as interações π -alquil (A, B, C, D e E) e alquil (E). Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.75

Figura 5.21: Complexo LacTI–4NF. a-) imagem total do complexo. b-) ampliação na região de ligação no sítio ativo. Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.76

Figura 5.22: Coeficiente de correlação de Pearson (r de Pearson) entre a energia livre de complexação (ΔG_{bind}) do 4Nf e intermediários com a lacase de *T. villosa* e *T. lactinea* e o parâmetro termodinâmico de entalpia (ΔH_f^0) (a) e entre o ΔG_{bind} e os descritores teóricos de reatividade E_{HOMO} (b), E_{LUMO} (c), E_{GAP} (d), potencial de ionização (e), afinidade eletrônica (f), eletronegatividade (g), potencial químico (h), eletrofilicidade (i) e nucleofilicidade (j). Fonte: Própria.78

Figura 5.23: Gráficos da simulação para o complexo LacTv-4NF. a-) Variação da temperatura do sistema durante a simulação. b-) Variação da pressão do sistema durante a simulação. c-) Variação da densidade do sistema durante a simulação. d-) Raio de giro da LacTv em torno do próprio eixo e dos eixos X, Y e Z. Fonte: Própria.79

Figura 5.24: Gráficos da simulação para o complexo LacTI-4NF. a-) Variação da temperatura do sistema durante a simulação. b-) Variação da pressão do sistema durante a simulação. c-) Variação da densidade do sistema durante a simulação. d-) Raio de giro da LacTI em torno do próprio eixo e dos eixos X, Y e Z. Fonte: Própria.80

Figura 5.25: RMSD dos complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF (a) e Raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF) da posição atômica por resíduo de aminoácido (b). Fonte: Própria.81

Figura 5.26: Energias eletrostáticas de interação (Coul-SR) e energias de interação van der Waals/hidrofóbica (LJ-SR) entre a LacTv e 4NF (a) e a LacTI e 4NF (b); número de ligações de hidrogênio durante a simulação entre a LacTv e 4NF (c) e a LacTI e 4NF(d). Fonte: Própria.....83

Figura 5.27: Área de superfície acessível ao solvente (SASA) para a LacTv e LacTI durante o tempo de simulação da dinâmica.84

Figura 5.28: Frames da mudança conformacional do complexo LacTv-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.85

Figura 5.29: Interações do complexo LacTv-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.	86
Figura 5.30: Frames da mudança conformacional do complexo LacTI-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.	87
Figura 5.31: Interações do complexo LacTI-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no discovery studio.	88
Figura 5.32: Complexos LacTv-4NF (a) e LacTI-4NF (b) solvatados e neutralizados. Fonte: Própria, elaborada no PyMOL.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Códigos de acesso das estruturas tridimensionais do 4-nonilfenol e de seus intermediários NF1EC, NF2EC, NF1EO e NF2EO no PubChem.	35
Tabela 5.1: Valores de RMSD da sobreposição das estruturas otimizadas por métodos clássicos com a estrutura cristalográfica do nonilfenol destacando os menores RMSDs.	43
Tabela 5.2: Valores de RMSD da sobreposição das estruturas pré-otimizadas do Nonilfenol por método clássico (MMFF94s) e posteriormente por métodos semi-empíricos, destacando o menor valor de RMSD.	44
Tabela 5.3: Parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade para o nonilfenol e intermediários destacando os maiores valores em negrito e menores valores em vermelho para cada parâmetro.	46
Tabela 5.4: Modelos aprovados na modelagem da lacase de <i>T. villosa</i> , destacado em negrito o modelo aprovado e escolhido para as simulações com base no melhor valor obtido pelo Procheck.	47
Tabela 5.5: Modelos aprovados na modelagem da lacase de <i>T. lactinea</i> , destacado em vermelho o modelo aprovado e escolhido para as simulações com base no melhor valor obtido pelo procheck.	47
Tabela 5.6: Energia livre de ligação (ΔG_{bind}) entre a LacTv e LacTI com o 4NF e seus intermediários.	57
Tabela 5.7: Resíduos de aminoácidos do sítio ativo que interagem com os substratos para a formação do complexo LacTv–4NF e intermediários.	61
Tabela 5.8: Resíduos de aminoácidos do sítio ativo que interagem com os substratos para a formação do complexo LacTI–4NF e intermediários.	70
Tabela 5.9: Energias de interação do complexo LacTv-4NF.	82
Tabela 5.10: Energias de interação do complexo LacTI-4NF.	82

Tabela 5.11: Decomposição de energias e energia livre de ligação geral do estado final para os complexos LacTI-4NF e LacTv-4NF de simulações MD equilibradas e estáveis calculadas por MM/PBSA (todos os valores são relatados em kcal.mol⁻¹). SD(Prop) - SD obtido com a propagação da fórmula da incerteza; SD - desvio padrão da amostra; SEM(Prop.) - SEM obtido com a propagação da fórmula da incerteza; SEM - erro padrão amostral da média.....89

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: GAP	38
Equação 2: Afinidade eletrônica	38
Equação 3: Potencial de ionização	38
Equação 4: Potencial químico	38
Equação 5: Dureza absoluta	38
Equação 6: Maciez	38
Equação 7: Eletronegatividade	39
Equação 8: Eletrofilicidade	39
Equação 9: Nucleofilicidade	39
Equação 10: Energia livre de ligação média da trajetória da dinâmica molecular	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – Por cento

Δ **ANGLE** – Energia angular

Δ **BOND** – Ângulo de ligação

Δ **DIHED** – Ângulo diédrico

Δ **EEL** – Interações eletrostáticas

Δ **EGB** – Contribuições polares

Δ **ESURF** – Contribuições apolares

Δ **G_{bind}** – Energia livre de ligação

Δ **GGAS** – Energia de interação obtida pela soma dos componentes internos ligados (Δ BOND + Δ ANGLE + Δ DIHED) e não ligados (Δ VDWAALS + Δ EEL)

Δ **GSOLV** – Energia livre de solvatação (Δ GSOLV) é obtida pela soma das contribuições polares (Δ EGB) e apolares (Δ ESURF)

Δ **H^f°** – Calor de formação (entalpia)

Δ **VDWAALS** – Interações de van Der Waals

$\simeq$ – Aproximadamente

$\leq$ – Menor ou igual a

$\geq$ – Maior ou igual a

°C – Graus Celsius

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ – Microgramas por litro

4NF – 4-nonilfenol

A – Afinidade eletrônica

Å – Angstrom

AM1 – *Austin Model 1*

CAGR – *compound annual growth rate*

Coul-SR – Energias eletrostáticas de interação

DM – Dinâmica molecular

E_{GAP} – Energia do GAP

E_{HOMO} – Energia do HOMO

E_{LUMO} – Energia do LUMO

eV – Elétron volt

ϵ – épsilon

GAFF – *Generalized Amber Force Field*

GHEMICAL – *Ghemical Force Field*

GMMSB/LNCC – Grupo de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos /
Laboratório Nacional de Computação Científica

GMQE - *Global Model Quality Estimation*

HOMO – orbital molecular ocupado mais alto (do inglês *highest occupied molecular orbital*)

I – Potencial de ionização

K – Kelvin

kcal.mol⁻¹ – Quilocaloria por mol

kg/m³ – Quilograma por metro cúbico

kJ.mol⁻¹ – Quilojoule por mol

LacTI – Lacase *Trametes lactinea*

LacTv – Lacase de *Trametes villosa*

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

LJ-SR – Energias de interação de van der Waals/hidrofóbica

LUMO – orbital molecular não ocupado mais baixo (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*)

mg.L⁻¹ – Miligrama por litro

MMFF94 – *MMFF94 Force Field*

MMPBSA – *Molecular mechanics generalized Poisson-Boltzmann*

MNDO – *Modified Neglect of Diatomic Overlap*

MNDO-d – *Modified Neglect Of Diatomic Overlap With D At. Orbitals*

MOPAC - *Molecular Orbital PACkage*

N – Nucleofilicidade

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NF1EC – Ácido nonilfenoxiacético

NF1EO – Nonilfenol monoetoxilado

NF2EC – Ácido nonilfenoxietoxiacético

NF2EO – Nonilfenol dietoxilado

nm – Nanômetro

NPT - Número de partículas (N), pressão do sistema (V) e temperatura (T)

ns – Nanosegundo

NVT – Número de partículas (N), volume do sistema (V) e temperatura (T)

PDB – *Protein Data Bank*

PM3 – *Parametric Method 3*

PM6 – *Parametric Method Number 6*

PM7 – *Parametric Method Number 7*

POP – Poluente orgânico persistente

ps – Picosegundo

QMEAN – *Qualitative Model Energy Analysis*

r - Coeficiente de correlação de Pearson

RCSB – *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

Rg – Raio de giro (do inglês *radius of gyration*)

RMSD – Média do desvio do quadrático da raiz em angstrom (do inglês *root mean square deviation*)

RMSF – Flutuação Quadrática Média (do inglês *root mean square fluctuation*)

SASA – Área de superfície da proteína acessível ao solvente (do inglês *solvent-accessible surface area*)

SD – Desvio padrão da amostra (do inglês *standard deviation*)

SD(Prop) – SD obtido com a propagação da fórmula da incerteza

SEM – Erro padrão amostral da média (do inglês *standard error of the mean*)

SEM(Prop.) – SEM obtido com a propagação da fórmula da incerteza

SEQ. ID – Percentual de identidade das sequências primárias das proteínas

UFF – *Universal Force Field*

US \$ – Dólar

α – Alfa

β – Beta

η – Dureza absoluta

μ – Potencial químico

π – pi

π - π – empilhamento de elétrons pi

σ – Maciez

χ – Eletronegatividade

ω – Eletrofilicidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Desreguladores endócrinos	24
3.2 Nonilfenol	25
3.3 Lacases em biorremediação	27
3.4 Ferramentas e aplicações da Bioinformática	30
3.4.1 Modelagem molecular por homologia	31
3.4.2 <i>Docking</i> molecular	32
3.4.3 Dinâmica molecular	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Obtenção da estrutura tridimensional do 4-nonilfenol e seus intermediários	35
4.2 Obtenção da estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes villosa</i> e <i>Trametes lactinea</i>	35
4.3 Avaliação do grau de homologia da lacase de <i>Trametes villosa</i> e <i>Trametes lactinea</i>	36
4.4 Desenho e otimização geométrica do 4-nonilfenol e intermediários NF2EC, NF1EC, NF2EO e NF1EO	37
4.5 Obtenção dos parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade	37
4.6 Preparação dos complexos lacase-4-nonilfenóis e aplicação do <i>docking</i> molecular	39
4.7 Dinâmica molecular	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.1	Otimização do 4-nonilfenol e intermediários	43
5.1.1	Métodos clássicos	43
5.1.2	Métodos semi-empíricos	44
5.2	Parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade	45
5.3	Modelagem molecular da lacase.....	46
5.4	Grau de homologia da LacTv e LacTl.....	56
5.5	<i>Docking</i> molecular e mecanismos de interação.....	56
5.5.1	<i>Docking</i> LacTv-nonilfenóis	60
5.5.2	<i>Docking</i> LacTl-nonilfenóis	70
5.5.3	Correlação <i>docking</i> e descritores teóricos	76
5.6	Dinâmica molecular	79
6.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, a urbanização e a industrialização desenfreada têm tornado a poluição ambiental um dos maiores desafios dos últimos anos, resultando em uma preocupação global no que diz respeito, por exemplo, à qualidade da água e à segurança alimentar. A contaminação de recursos naturais por resíduos químicos de processos industriais ou de atividades domésticas tem impacto direto na biodiversidade tanto em ambientes terrestres quanto em ambientes de água doce e marinha e considerando que essa contaminação também pode representar risco à saúde humana, tem-se buscado cada vez mais, formas de remediação mais seguras e ambientalmente amigáveis (Bhandari et al., 2021; Lu et al., 2015; Xiong et al., 2019).

Entre os contaminantes ambientais, os conhecidos como desreguladores endócrinos, que em sua maioria apresentam estruturas complexas, como anéis aromáticos, halogênios ou agrupamentos azo, apresentam persistência ou recalcitrância à degradação biológica e ganharam destaque nos últimos anos devido aos seus efeitos adversos à saúde humana e à biodiversidade. Efeitos da exposição a essa classe de contaminantes estão relacionados a distúrbios hormonais, gerando consequência como desordem no sistema reprodutor, retardo no desenvolvimento neurológico, crescimento anormal em crianças, alterações nas funções do sistema imune e prevalência de cânceres sensíveis a hormônios em humanos (Alves da Silva et al., 2018). Também são responsáveis por mudanças na atividade hormonal durante o desenvolvimento embrionário de organismos aquáticos, o que acarreta alterações na anatomia, comportamento e reprodução (Chinnasamy; Poomani, 2020).

O 4-nonilfenol está entre os desreguladores endócrinos que despertam maior atenção devido à suas várias aplicações e ampla distribuição no que diz respeito à contaminação ambiental (Stenholm et al., 2020). Diante disso, tem-se buscado cada vez mais alternativas eficientes e viáveis para degradação desse contaminante.

As lacases são enzimas de importância biotecnológica que apresentam alta capacidade de degradar compostos fenólicos e apesar de alguns estudos relacionarem a remediação fúngica do 4-nonilfenol com a presença de lacases, não foram encontrados na literatura estudos que apresentem detalhes dos mecanismos de interação enzima-ligante, restringindo-se à descrição do complexo modelado sem um aprofundamento na relação estrutura-atividade (Mo et al., 2018; Mohit; Tabarzad; Faramarzi, 2019).

Trametes villosa e *Trametes lactinea* são espécies recentemente estudadas que demonstram potencial para degradação de poluentes ambientais, como corantes advindos da indústria têxtil, estando esse potencial de degradação relacionado à liberação de lacase, no entanto, não há estudos para a lacase dessas espécies frente ao 4-nonilfenol (Ferreira-Silva et al., 2022). Além disso, espécies do gênero *Trametes* como *T. versicolor*, se mostraram eficientes em degradar o nonilfenol, alcançando uma remoção de 97 mg.L⁻¹ para uma concentração inicial de 100 mg.L⁻¹ em 25 dias, sendo a presença de lacase crucial nesse processo de remoção (Soares et al., 2005; Stenholm et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a interação *in silico* de lacases produzidas pelos fungos *Trametes villosa* e *Trametes lactinea* com o desregulador endócrino 4-nonilfenol e seus intermediários.

2.2 Específicos

- Obter e validar a estrutura tridimensional da lacase das espécies *T. villosa* e *T. lactinea* por meio da técnica de modelagem por homologia;
- Aplicar as ferramentas de modelagem molecular *in silico* (*docking* molecular e avaliação dos descritores teóricos de reatividade) para a compreensão dos mecanismos de interação entre a lacase e os nonilfenóis;
- Avaliar o grau de homologia das lacases das duas espécies pela técnica de alinhamento múltiplo de sequências, a fim de identificar o percentual de conservação dos resíduos;
- Determinar parâmetros quantitativos e qualitativos (energia livre de ligação e descritores de reatividade) relacionados à afinidade entre enzima e ligante;
- Identificar os resíduos centrais de interação da lacase de ambas as espécies com os nonilfenóis.
- Correlacionar os parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade com a energia livre de ligação entre os complexos obtidos pelo *docking*.
- Verificar a estabilidade dos complexos obtidos por *docking* molecular por meio da técnica de dinâmica molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desreguladores endócrinos

Um desregulador endócrino é caracterizado como uma substância exógena que tem a capacidade de interferir no metabolismo de um organismo por causar distúrbio no funcionamento do seu sistema endócrino, o que gera diversos efeitos adversos à saúde deste ou de sua progênie (Darbre, 2020). A lista de substâncias que têm forte capacidade de interferir no funcionamento do sistema endócrino é ampla e abrange substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas, substâncias farmacêuticas etc.) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios). A maior preocupação quanto aos desreguladores endócrinos têm sido o destino final desses compostos, uma vez que, a presença destes em estações de tratamento de esgoto e fontes de água potável implica na necessidade de otimização dos processos de tratamento para remoção desses contaminantes (Alves da Silva et al., 2018; Bila; Dezotti, 2007).

Os efeitos da exposição a essa classe de compostos estão associados principalmente ao desenvolvimento e à reprodução o que, conseqüentemente, causa impacto negativo à biodiversidade e ao funcionamento do ecossistema (Alves da Silva et al., 2018; Chinnasamy; Poomani, 2020). Uma das conseqüências mais preocupantes em decorrência dos efeitos da atuação de desreguladores endócrinos é a reversão sexual e feminização de espécies causada principalmente por aqueles classificados como estrogênicos. Os peixes são os principais organismos em risco devido substâncias como, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e ftalatos serem frequentemente detectadas em ambientes aquáticos, (Darbre, 2020; Watanabe et al., 2023; You; Song, 2021).

Em humanos os danos causados pela exposição a desreguladores endócrinos são representados principalmente por efeitos na fertilidade de mulheres e no neurodesenvolvimento infantil (Panagopoulos et al., 2023; Ramírez et al., 2022). Estudos apontaram relação da exposição pré-natal a desreguladores endócrinos, como ftalatos, bisfenol A e triclosan com efeitos adversos como interferência no desenvolvimento psicomotor e mental (Kim et al., 2018) e efeitos no desenvolvimento comportamental e neurocognitivo (Braun et al., 2017; Olesen et al., 2018). Além disso, desreguladores endócrinos estão associados com aumento de casos de câncer em

órgãos reprodutores, como mama e ovário, tendo impactos negativos na fertilidade feminina (Panagopoulos et al., 2023; Rattan; Flaws, 2019)

3.2 Nonilfenol

O 4-nonilfenol ($C_{15}H_{24}O$) ou 4 – (2,4-Dimetil-heptan-3-il) fenol (Figura 3.1) é um derivado do nonilfenol etoxilado que é caracterizado como um surfactante não iônico muito utilizado na formulação de detergentes, lubrificantes, agente antiestático, agente de limpeza de alto desempenho, pesticidas, antioxidantes para produção de borracha e aditivo de óleo lubrificante, além de também ser utilizado como aditivo na produção de plástico e filtro UV em cosméticos (Beiras et al., 2019). O mercado do nonilfenol foi avaliado em US \$ 1,31 bilhão em 2022, e deverá atingir US \$ 1,96 bilhão até 2029 com um CAGR de 5,89% durante o período de previsão (Maximize Market Research, 2023).

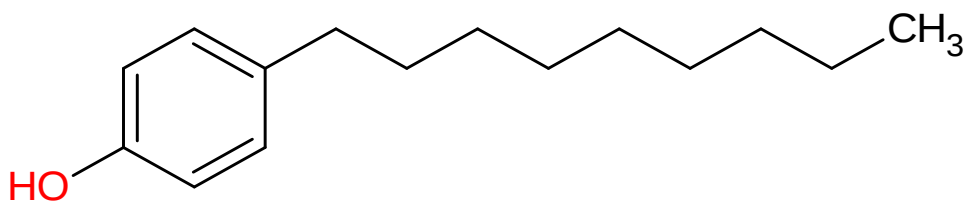


Figura 3.1: Estrutura química do 4 nonilfenol ($C_{15}H_{24}O$). Fonte: Própria, elaborada pelo autor em ChemSketch.

O produto final da degradação do nonilfenol etoxilado, 4-nonilfenol, está catalogado na lista de desreguladores endócrinos ambientais e é classificado como poluente orgânico persistente (POP). Vale ressaltar que a legislação que regulamenta a concentração permitida para desreguladores endócrinos determina uma concentração máxima permitida para o nonilfenol de $28,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em água doce e de $7,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em água salgada (EPA, 2005).

O processo de degradação do nonilfenol etoxilado se dá pela perda dos grupos etoxilados, formando como produtos o nonilfenol dietoxilado (NF2EO), nonilfenol monoetoxilado (NF1EO), ácido nonilfenoxietoxiacético (NF2EC), ácido nonilfenoxiacético (NF1EC) e 4-nonilfenol (4NF). A biotransformação do nonilfenol pode ocorrer tanto por via aeróbia quanto anaeróbia, de modo que em condições aeróbias o nonilfenol etoxilado é degradado a NF2EO e NF1EO que imediatamente se convertem em NF2EC e NF1EC, enquanto que em condição anaeróbia, a

transformação é direta para NF2EO, NF1EO e 4NF como mostra o esquema da Figura 3.2 (Ömeroğlu; Sanin, 2014; Zhang et al., 2008).

Devido a seu uso generalizado na indústria, o nonilfenol etoxilado pode ser encontrado frequentemente em diferentes compartimentos ambientais como rios, lagos, sedimentos e reservatórios, causando efeitos adversos a uma variedade de organismos aquáticos. E uma vez que essa contaminação pode ter efeitos de longo prazo à saúde ecológica de comunidades aquáticas, o acúmulo de 4-nonilfenol na cadeia alimentar, incluindo peixes de valor econômico, pode aumentar a probabilidade de riscos inaceitáveis à saúde ecológica, por exemplo, de animais piscívoros e também para saúde humana pelo o consumo de peixes contaminados ou por outro tipo de exposição, o que pode ocasionar efeitos negativos relacionados, por exemplo, à reprodução (Crane, 2021; Dong et al., 2019; Jambor et al., 2017).

Os produtos formados ao longo da degradação do nonilfenol etoxilado são de natureza hidrofóbica e mais persistentes e tóxicos do que o composto parental primário. Além disso, a atividade estrogênica e o efeito desregulador endócrino aumenta conforme a diminuição do peso molecular decorrida do processo de degradação (He et al., 2020; Scott; Jones, 2000). Em plantas, por exemplo, a exposição ao 4NF implica na diminuição do teor de clorofila e do tamanho dos estômatos devido à danos causados na membrana celular por um aumento da permeabilidade e em humanos alguns dos efeitos da exposição ao 4NF estão associados a distúrbios no sistema reprodutor causando, por exemplo, apoptose em células de espermatogônia (Gałązka; Jankiewicz, 2022; Kim; Kwak; An, 2019; Park et al., 2020).

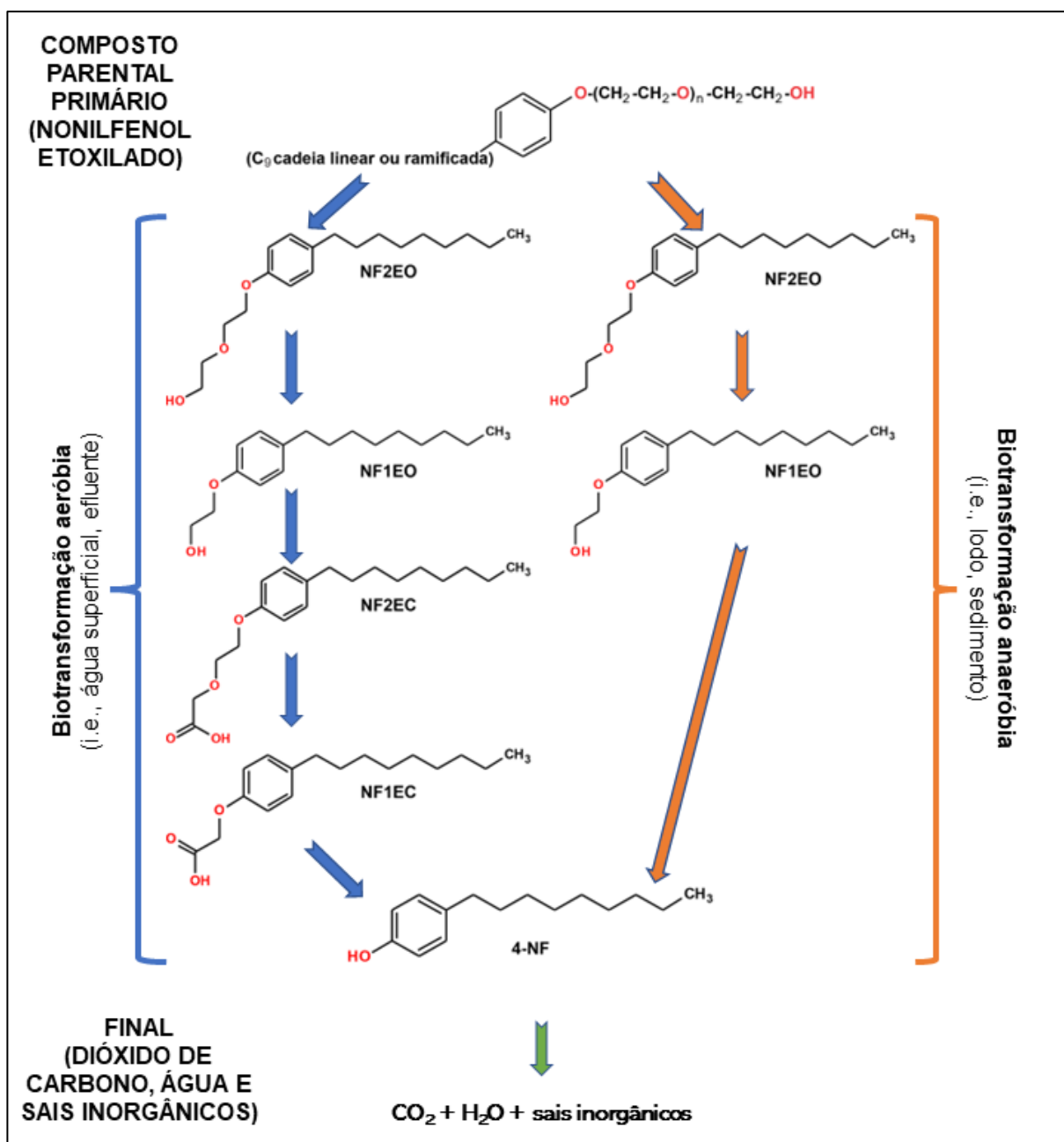


Figura 3.2: Esquema da biodegradação de nonilfenóis de cadeia longa para 4NF em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: adaptado de DTSC (2018) e Ömeroğlu; Sanin (2014).

3.3 Lacases em biorremediação

A biorremediação é uma alternativa biotecnológica que permite por meio da ação natural de agentes biológicos, a degradação ou transformação de contaminantes ambientais em produtos menos tóxicos. Geralmente os processos de biorremediação utilizam microrganismos, sejam fungos ou bactérias, que através do seu metabolismo são capazes de enzimaticamente eliminar ou reduzir a concentração de poluentes que

representam riscos à saúde humana ou à biodiversidade para níveis aceitáveis de toxicidade, diminuindo assim, seus efeitos adversos ao ecossistema contaminado (Tonini; Rezende; Grativol, 2010; Vidal, 2001).

Quando se fala em processo de remoção de contaminantes ambientais, enzimas têm ganhado cada vez mais destaque devido às limitações significativas apresentadas por métodos químicos pelo uso de produtos químicos tóxicos, purificação ineficiente, alto custo e liberação de produtos nocivos. Diante desse problema, diversas oxidases e peroxidases são estudadas visando a biodegradação de contaminantes como os desreguladores endócrinos, corantes perigosos e outros resíduos industriais (Mehandia; Sharma; Arya, 2020).

Entre as oxidorredutases produzidas por microrganismos, como fungos e bactérias, capazes de degradar polímeros naturais complexos estão as lacases produzidas por fungos de podridão branca. As lacases [EC 1.10.3.2, para-bezenodiol: dióxido de oxidorredutases] pertencem à família das enzimas multicobre oxidases e geralmente possuem quatro átomos de cobre. Foram descritas pioneiramente em plantas em 1883 (Yoshida, 1883) e somente por volta de treze anos mais tarde foram identificadas em fungos por Bertrand (1896). Esse grupo de enzimas tem vasta distribuição em Basidiomycota e, podem ser encontradas em bactérias e até mesmo em crustáceos. Por serem polifenoloxidases de forte capacidade de oxidação e alto desempenho catalítico, as lacases têm ampla aplicabilidade na degradação de vários substratos e forte afinidade por compostos fenólicos (Beck et al., 2018; Catherine; Penninckx; Frédéric, 2016; Martínez-Morales et al., 2015; Shi et al., 2017; Strong; Claus, 2011; Thurston, 1994).

A eficiência das lacases em degradar poluentes fenólicos estrogênicos como o bisfenol A e o nonilfenol tem sido investigada por pesquisadores de várias partes do mundo (Daâssi et al., 2016; Tanaka et al., 2003). Foi demonstrada para o bisfenol A na presença da lacase de *Trametes versicolor* uma taxa de eliminação estimada acima de 7% na primeira hora em função da concentração do catalisador e do substrato (Beck et al., 2018; Daâssi et al., 2016). Essa taxa pode ser aumentada com o tempo em condições de pH ótimo entre 4 e 5 e temperaturas próximas a 27°C, atingindo valores acima de 80% passadas 12 horas de exposição (Baldrian, 2006; Hongyan et al., 2019).

Quimicamente, as lacases são classificadas em dois grupos, as lacases azuis e as lacases amarelas. Esses grupos apresentam uma diferença de coloração que se

dá devido ao espectro de absorção de luz em T1 (átomo de cobre 1 do sítio ativo), onde nas lacases azuis a absorção acontece no espectro de 600 nm, enquanto nas lacases amarelas a absorbância máxima é em 330 nm. As lacases azuis recebem mais atenção e são mais estudadas do que as lacases amarelas por apresentarem maior afinidade por compostos fenólicos, enquanto as lacases amarelas são mais especializadas em oxidar compostos não fenólicos sem exigência da presença de um mediador (Brown; Zhao; Grant Mauk, 2002; Chaurasia; Yadav; Yadava, 2013; Moshkov et al., 2014; Radveikienė et al., 2021).

Estruturalmente, essas enzimas geralmente possuem três domínios (Figura 3.3 a). No entanto, algumas lacases conhecidas como *small* lacases (SLACs) são assim chamadas por poderem apresentar apenas dois domínios (Moshkov et al., 2014). Pertencentes ao grupo das oxidoredutases, as lacases mantêm a arquitetura do sítio catalítico conservada, em que o átomo de cobre T1 que é responsável pelo bolso oxidativo do sítio é coordenado por duas histidinas conservadas e uma cisteína e os átomos de cobre T2 e T3 que atuam na atividade catalítica como bolso redutor do sítio são coordenados por várias histidinas conservadas (Figura 3.3 b e c) (Arregui et al., 2019; Nakamura; Go, 2005).

Para a lacase de *Trametes sp.*, os átomos de cobre (T1, T2, T3 α e T3 β) (Figura 3.3 b e c) são conhecidos por localizarem a região do sítio de ligação ao substrato, onde a atividade catalítica acontece pela oxidação de um elétron do substrato em T1, que atua como aceitador de elétrons do substrato. Essa reação é seguida da redução de 4 elétrons de O₂ a duas moléculas de água (Figura 3.3 b) no bolso formado por T2 e T3 que juntos formam um cluster trinuclear de cobre (Enguita et al., 2003; Lloret et al., 2010; Solomon et al., 2014).

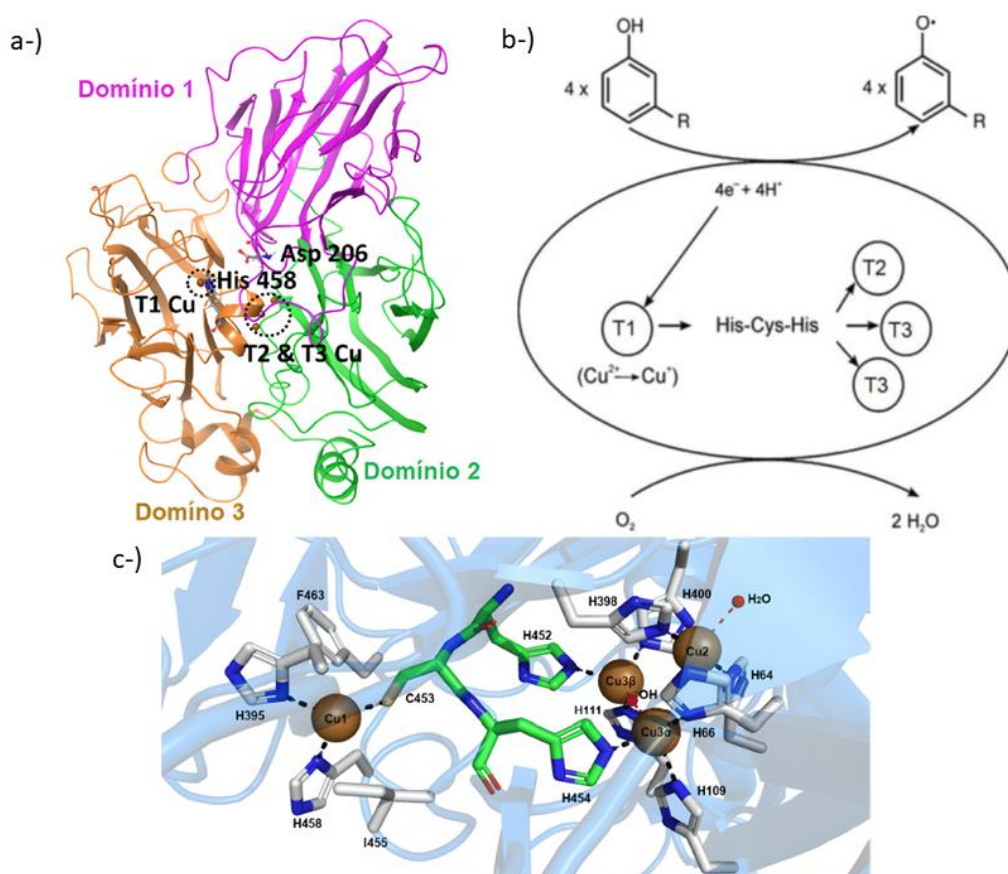


Figura 3.3: a-) Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor* evidenciando os domínios 1, 2 e 3 e a localização dos sítios T1, T2 e T3. Fonte: Mehra et al. (2018). b-) Ciclo catalítico da lacase. Fonte: Adaptado de Baldrian (2006). c-) Representação dos diferentes aminoácidos do sítio ativo que coordenam os cobres catalíticos na lacase *Trametes versicolor*. Destacados em verde os aminoácidos da via histidina-cisteína. Fonte: Arregui et al (2019).

3.4 Ferramentas e aplicações da Bioinformática

Visto que enzimas são alvos para a ação de diversos medicamentos, e a complexidade de proteínas dificulta a aplicação de métodos experimentais de determinação da estrutura molecular de macromoléculas por difração de raios X e ressonância magnética nuclear, a aplicação mais comum das ferramentas de bioinformática é a utilização da modelagem e do *docking* molecular na construção e investigação de fármacos na química medicinal (Verli, 2014). Todavia, mais recentemente essas ferramentas têm sido utilizadas com frequência em estudos de biorremediação para entender os mecanismos de remoção de contaminantes

ambientais pela ação de enzimas nos processos de degradação biológica (Kumar et al., 2016).

3.4.1 Modelagem molecular por homologia

A utilização da técnica de modelagem por homologia ou modelagem comparativa é um dos meios mais comuns para se obter estruturas tridimensionais de moléculas biológicas. O princípio desta técnica assume que a similaridade da sequência implica em semelhança funcional e estrutural, assim, um estudo de modelagem molecular se utiliza de coleções de compostos virtuais e pode envolver ou não a combinação de vários softwares com métodos experimentais, de modo que quando adotada, essa combinação assume papel fundamental na identificação e desenvolvimento de moléculas bioativas (Andricopulo; Salum; Abraham, 2009; Wolf; Grishin; Koonin, 2000).

Existem outras técnicas que diferentemente da modelagem por homologia não exigem a utilização de um molde preexistente, como técnicas *ab initio* (Verli, 2014). Na modelagem comparativa, no entanto, se faz necessária a utilização de uma estrutura cristalográfica determinada experimentalmente que apresente no mínimo 30% de semelhança com a sequência de aminoácidos de interesse, a fim de servir como molde para se obter as coordenadas cartesianas que servirão de base para a construção do modelo (Eisenmenger; Argos; Abagyan, 1993; Santos Filho; Alencastro, 2003).

O desenvolvimento destas moléculas exige um trabalho multidisciplinar que envolve conceitos de física, química, biologia, informática e estatística, e se utiliza de softwares e bancos de dados como MODELLER, SWISS-MODEL e *Protein Data Bank* (PDB), que sistematicamente compreendem um conjunto de métodos computacionais que têm por principal função facilitar e otimizar o processo de obtenção de novos compostos. Assim, essas ferramentas tornam possível o estudo de interações intermoleculares de moléculas biológicas ainda não resolvidas experimentalmente. O que atribui aos métodos de modelagem no estudo de biomoléculas, várias vantagens em relação à métodos e técnicas experimentais que exigem processos que demandam tempo e a aplicação de métodos de alto custo como a clonagem molecular, a purificação de proteínas e a cristalização proteica (Nakano et al., 2012; Sant'Anna, 2009).

3.4.2 *Docking* molecular

A análise de estruturas tridimensionais dos compostos de interesse no que diz respeito à parâmetros de qualidade da estrutura, é exigida no estudo de *docking* tanto ao ligante (substrato) quanto ao receptor (enzima) para a obtenção de resultados precisos que representem as condições reais. As estruturas cristalográficas destes compostos determinadas experimentalmente podem ser encontradas em bancos de dados como *PubChem* mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Protein Data Bank* (PDB) mantido pelo *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB).

Quando as estruturas dos compostos de interesse não estão disponíveis em bancos de dados como esses, os métodos de modelagem molecular por homologia associados a técnicas de *docking* assumem um importante papel para compreensão de propriedades e do comportamento de biomoléculas ainda pouco estudadas (Sant'Anna, 2009; Santos Filho; Alencastro, 2003).

Desta forma, essas técnicas são indispensáveis nos processos de descoberta, por exemplo, de novas drogas e de inibidores enzimáticos ou de otimização de protótipos existentes de candidatos a medicamentos por tornarem possível a compreensão de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar a interação com o receptor (Guido; Andricopulo; Oliva, 2010; Santos et al., 2014).

O *docking* molecular fornece detalhes do reconhecimento e modo de ligação entre proteína-proteína e receptor-ligante e tem como principal finalidade predizer com precisão a melhor e mais provável geometria de encaixe de um composto alvo ao sítio de ligação de uma enzima específica (Renuga Parameswari; Rajalakshmi; Kumaradhas, 2015). Com isso, é possível estimar a força de ligação mais provável de acontecer em uma situação real, permitindo, portanto, a obtenção de informações físico-químicas fundamentais para o esclarecimento das interações intermoleculares ocorrentes entre proteínas ou enzimas com os ligantes (Manogar et al., 2019).

As características físico-químicas e as propriedades estruturais das moléculas envolvidas na simulação de *docking* determinam o grau de afinidade e especificidade de um ligante ao sítio ativo da macromolécula e define os tipos de interações intermoleculares na formação de um complexo enzima-substrato (Verli, 2014). Essas interações geralmente incluem ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas por meio de ligações de Van der Waals, interações do tipo cátion- π , interações iônicas,

interações envolvendo anéis aromáticos do tipo π - π e coordenação com íons metálicos (Bissantz; Kuhn; Stahl, 2010; Brooijmans; Kuntz, 2003; Dunn, 2010; Salonen; Ellermann; Diederich, 2011; Verli, 2014).

Para a realização do *docking* quando a região do sítio ativo é conhecida, uma caixa é gerada a fim de limitar a busca pelo reconhecimento molecular com a enzima a essa região. E quando não se tem essa informação a busca pelo encaixe é realizada considerando toda a área da proteína como potencial região de ligação, esse caso geralmente é denominado *docking* cego (Hetényi; Van Der Spoel, 2006). Os procedimentos típicos que permitem a aplicação do *docking* seguem alguns passos básicos, a começar pela seleção e preparação do receptor e do ligante conforme o método de *docking* a ser utilizado, o segundo passo é caracterizado pela definição dos parâmetros para os métodos de busca e aplicação do *docking*, e finalmente a análise dos resultados (Morris; Lim-Wilby, 2008).

Para a realização de cada um desses passos existem vários softwares públicos ou comerciais que podem ser utilizados, como o *AutoDock*, conhecido por ser um dos programas mais utilizados e recomendados para a aplicação da técnica de *docking* (Yuriev; Ramsland, 2013), ou ainda por meio de servidores na internet como o *DockThor*, desenvolvido pelo GMMSB/LNCC (Grupo de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos / Laboratório Nacional de Computação Científica) (BARREIRO et al., 2015).

Esses programas utilizam algoritmos de busca responsáveis por investigar o cenário de energia potencial a fim de encontrar o mínimo de energia global e funções de pontuação, do inglês *scoring functions*, que baseando-se em campos de força e métodos empíricos calculam a afinidade de ligação e preveem características que determinam a complexação proteína-ligante, identificando as possibilidades de interações químicas, como van der Waals, ligações eletrostáticas e de hidrogênio (Brooijmans; Kuntz, 2003; Shen et al., 2020). O *Autodock 4.2*, por exemplo, possui duas opções de métodos de busca global disponíveis, são estas: (I) Método de Monte Carlo e (II) Algoritmo Genético, e oferta um método híbrido global-local, o Lamarckiano, que se mostra mais eficiente em encontrar baixas energias (Morris et al., 1998; Morris; Lim-Wilby, 2008).

3.4.3 Dinâmica molecular

Na mecânica clássica, a dinâmica molecular (DM) compreende um conjunto de ferramentas que permite o estudo do comportamento de um sistema de muitas partículas ao longo de um tempo predeterminado e possibilita a compreensão da base física da estrutura e função de macromoléculas biológicas (Karplus; McCammon, 2002). As técnicas de DM fornecem informações do comportamento dinâmico microscópico de cada átomo de um sistema a fim de obter propriedades observáveis como temperatura, pressão, energia interna, volume, energia de interação, entropia, energia livre, etc (Namba; Da Silva; Da Silva, 2008).

Para estudos de dinâmica molecular em sistema biológicos que envolve proteínas e enzimas, geralmente se recorre à estrutura experimental da proteína disponível no PDB, quando a estrutura de interesse não está disponível, deve-se recorrer às técnicas de modelagem por homologia para predição e obtenção das estruturas tridimensionais (Berman et al., 2000; Kuhlman; Bradley, 2019).

As simulações de DM são fundamentadas em equações de mecânica molecular, de modo que as moléculas são consideradas como um conjunto de átomos que podem ser descritos por forças newtonianas, o que significa que os átomos são tratados como partículas que são conectadas por forças elásticas ou harmônicas (Sant'Anna, 2009). O objetivo é obter dados estatísticos confiáveis e possíveis de acontecer em uma situação real para propriedades estruturais, dinâmicas de comportamento e termodinâmicas de um sistema molecular em função do tempo (Salo-Ahen et al., 2020).

Assim, as equações são resolvidas durante a evolução do tempo da dinâmica e expressam estatisticamente as mudanças do comportamento do sistema em uma trajetória que consiste em conjunto de posições e velocidades de cada átomo no decorrer da simulação. Além de guardarem uma grande quantidade de dados que podem ser transformados em formas mais interpretáveis a fim de obter informações úteis de *insights* biológicos estruturais e funcionais do sistema estudado (Yekeen et al., 2023)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da estrutura tridimensional do 4-nonilfenol e seus intermediários

A estrutura tridimensional do 4-nonilfenol e de seus intermediários foram obtidas no banco de dados *PubChem* (Kim et al., 2021) e foram otimizadas conforme metodologia descrita no item 4.3, seus respectivos códigos se encontram na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Códigos de acesso das estruturas tridimensionais do 4-nonilfenol e de seus intermediários NF1EC, NF2EC, NF1EO e NF2EO no PubChem.

COMPOSTO	PubChem CID
4NF	1752
NF1EC	18380
NF2EC	86267
NF1EO	154827466
NF2EO	24773

Fonte: Própria.

4.2 Obtenção da estrutura tridimensional da lacase de *Trametes villosa* e *Trametes lactinea*

Não há estruturas cristalográficas para a enzima lacase de *Trametes villosa* e *Trametes lactinea* disponível no banco de dados do PDB. Portanto a obtenção das estruturas tridimensionais para a lacase de *T. villosa* e *T. lactinea* se deu por meio da técnica de modelagem molecular por homologia a partir das sequências primárias (FASTA) de código AAC41687.1 e KAH9897825.1 (Figura 4.1 a e b) disponibilizadas no banco de dados *GenBank* do NCBI.

A modelagem foi realizada utilizando o software online *SwissModel* (<https://swissmodel.expasy.org>), os *templates* sugeridos como moldes foram então selecionados para gerar os modelos que em seguida foram avaliados seguindo parâmetros como percentual de identidade, GMQE (*Global Model Quality Estimation*), QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) e a resolução em Angstrom que determinam a qualidade global da estrutura tridimensional. Para validação dos modelos gerados foram considerados, além dos parâmetros citados acima, os resultados obtidos dos programas PROCHECK, VERIFY 3D e ERRAT que fornecem

parâmetros estereoquímicos, a fim de demonstrar a boa qualidade da estrutura (Arnold et al., 2006).

Os modelos gerados pelo *SwissModel* passaram por uma triagem para seleção dos modelos mais adequados seguindo a seguinte ordem de critérios: percentual de identidade acima de 70%, resolução abaixo de 2 Å, GMQE acima de 0,90 e por fim foram selecionados os modelos com QMEAN abaixo de 1,75. Em seguida os modelos restantes passaram por validação usando o ERRAT, VERIFY 3D e PROCHECK disponível em <https://saves.mbi.ucla.edu/>.

a-)

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MGLQRF	SFFVTLALVARSLAAIGPVASLVVANAPVSPDGLRDAIVVNGVVPSP	LITGKKGDRFQ	LNVDLT	NHSM	LKSTSI	HWHGFF	QAG	
100	110	120	130	140	150	160	170	180
TNWAEG	PAFVNQCPIASGHSFLYDFHVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGP	FVVYDPKDP	HASRYD	VNDNE	STVITL	DWYHTA	ARLGPKFPL	
190	200	210	220	230	240	250	260	270
GADATL	INGLGRSASTPTAALAVINVQHGKRYRFR	LVSLCDPN	YTFSID	GHNLTV	IEVDG	INSQPL	LVDSIQ	IFAAQ
280	290	300	310	320	330	340	350	360
YWVRAN	PNFGTVGFAGINSAILRYQGAPVAEPTTT	QTQTSV	IPLIET	NLHPL	ARM	PVPGS	PTPGG	VDKAL
370	380	390	400	410	420	430	440	450
VPVLLQ	ILSGAQTAQDLLPAGSVVYPLPAHSTIE	ITLPAT	ALAPG	APHPF	HLHG	HAF	AVVRS	AGSTT
470	480	490	500	510	520	530	540	550
FQTDNP	GPWFLHCHIDFHLDAGFAIVFAEDV	ADVKAAN	PVPK	AWSD	LCPI	YDGL	SEANQ	

b-)

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MSKFH	SLLSFVLVLSVAYAGIGPVTDLTISNAE	VSPDGYAREAV	VVNGVTPA	PLITG	QKGDH	FQLNV	INQLTN	HMTLKT
100	110	120	130	140	150	160	170	180
GTNWAD	GVAFVNQCPIASGNSFLYDFQVPDQAGTF	WYHSHLSTQ	YCDGLRGP	FVVYDP	NDPHAS	LYD	VNDND	TVITL
190	200	210	220	230	240	250	260	270
LGADTT	LINGLGRFPGLDSDLAVINVQGGKRYRFR	LVSLCDP	SFTFSID	EHTMTI	ETDAV	NTQPLE	VDSIQ	IFAGQ
280	290	300	310	320	330	340	350	360
YWIRAA	PAFGQNTGFADGLNSAILRYDGASPVDP	TTTQ	SASTKPL	NEVDL	HLPT	MPVPG	DPVAG	VDKPI
370	380	390	400	410	420	430	440	450
SVPVLL	QILSGAQAAQDLLPDG	SVVYLP	NNASIEL	TLPAT	VNAPGS	PHFHL	HGHT	FAVVR
470	480	490	500	510	520	530	540	550
QTNNP	GPWFLHCHIDFHLEAGFAV	VMAEDT	PDVAS	VDAPP	QAWSD	LCPI	YNALD	PGDL

Figura 4.1: a-) Sequência fasta da lacase *T. villosa* (AAC41687.1); b-). Sequência fasta da lacase *T. lactinea* (KAH9897825.1) Fonte: GenBank (NCBI), imagem gerada pelo autor no *Discovery Studio*.

4.3 Avaliação do grau de homologia da lacase de *Trametes villosa* e *Trametes lactinea*

O grau de homologia da lacase de *Trametes villosa* e *Trametes lactinea* foi determinado por meio da técnica de alinhamento múltiplo de sequências utilizando o software online *Clustal Omega* e para os cálculos de percentual das regiões conservadas, conservativas e não conservadas entre as enzimas foram utilizados os softwares *Jal view* e *Discovery Studio*.

4.4 Desenho e otimização geométrica do 4-nonilfenol e intermediários NF2EC, NF1EC, NF2EO e NF1EO

Para a pré-otimização dos nonilfenóis foi utilizado o *software* Avogadro versão 1.2.0, foram testados os métodos clássicos de GAFF, GHEMICAL, MMFF94, MMFF94s e UFF. Em seguida as estruturas cristalográficas otimizadas foram sobrepostas às estruturas obtidas no banco de dados *PubChem*, a fim de demonstrar que as estruturas utilizadas para as simulações estavam em seu mínimo de energia, para isso foi utilizado o *software* *Discovery Studio Visualizer* v17.2.0.163449. Para identificar o melhor método quântico, foi utilizado o cristal do 4-nonilfenol pré-otimizado pelo método clássico que apresentou RMSD (média do desvio do quadrático da raiz em angstrom (Å)) aceitável e mais indicado pela literatura para otimização de moléculas biológicas e orgânicas. A estrutura foi novamente otimizada pelos métodos quânticos AM1, MNDO, MNDO-d, PM3, PM6, PM7 e RM1 a partir do MOPAC 2016 (Stewart, 1990). Após esta etapa, as sete estruturas obtidas foram sobrepostas à estrutura tridimensional obtida no *Pubchem* para demonstração de que as estruturas estavam em seu mínimo de energia, sendo indicado pelo menor RMSD aceitável (menor valor abaixo de 3Å) (Novič et al., 2016).

4.5 Obtenção dos parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade

Para os cálculos dos parâmetros termodinâmicos foi adotado o método quântico que se mostrou mais adequado e utilizando o Avogadro e o MOPAC 2016 foram gerados os arquivos .mop para o 4-nonilfenol otimizado. O passo seguinte para a operação dos cálculos para obtenção dos parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade foram aplicados no MOPAC 2016 os comandos EPS=80 e SUPER para simular a constante dielétrica da água a 25°C. Foram calculadas as energias do calor de formação (ΔH_f^0) e energia dos orbitais de fronteira HOMO (orbital molecular ocupado mais alto, do inglês *highest occupied molecular orbital*) e LUMO (orbital molecular não ocupado mais baixo, do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*). Em seguida, a fim de correlacionar a reatividade/estabilidade dessas moléculas com a afinidade de ligação com a lacase foram obtidas as energias do GAP (Equação 1), que consiste na diferença entre as energias do LUMO e do HOMO (Feizi-Dehnyayebi; Dehghanian; Mansouri-Torshizi, 2021; Kamel; Mohammadifard, 2021). As energias do

HOMO e do LUMO também foram utilizadas para obter dados de outras propriedades que são importantes indicadores de reatividade. São estas: afinidade eletrônica (A), potencial de ionização (I), dureza absoluta (η), maciez (σ), eletronegatividade (χ), eletrofilicidade (ω), potencial químico (μ) e nucleofilicidade (N), as respectivas equações para o cálculo de cada parâmetro se encontram logo abaixo (Miar et al., 2021; Pilli; Banerjee; Mohanty, 2015).

Equação 1: GAP

$$E_g = (\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}})$$

Equação 2: Afinidade eletrônica

$$A = -[\epsilon_{\text{LUMO}}]$$

Equação 3: Potencial de ionização

$$I = -[\epsilon_{\text{HOMO}}]$$

Equação 4: Potencial químico

$$\mu = \frac{\epsilon_{\text{LUMO}} + \epsilon_{\text{HOMO}}}{2}$$

Equação 5: Dureza absoluta

$$\eta = \frac{(\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}})}{2}$$

ou

$$\eta = \frac{(I - A)}{2}$$

Equação 6: Maciez

$$\sigma = \frac{1}{\eta}$$

Equação 7: Eletronegatividade

$$\chi = -\frac{(\epsilon_{\text{LUMO}} + \epsilon_{\text{HOMO}})}{2}$$

ou

$$x = \frac{(I + A)}{2}$$

ou

$$x = -\mu$$

Equação 8: Eletrofilicidade

$$\omega = \frac{\chi^2}{2\eta}$$

Equação 9: Nucleofilicidade

$$N = \frac{1}{\omega}$$

4.6 Preparação dos complexos lacase-4-nonilfenóis e aplicação do *docking* molecular

O primeiro passo desta etapa do estudo foi a preparação dos receptores (lacase de *T. villosa* (LacTv) e lacase de *T. lactinea* (LacTl)) para o *docking* e consistiu na remoção de todas as moléculas de água e adição dos hidrogênios polares e cargas de Kollman, para isso, foram utilizados os softwares *Biovia Discovery Studio* v.20.1.0.19295 e *Autodock Tools* v.1.e5.6, respectivamente (Kamaraj; Vuppu, 2023).

Em seguida foi realizada a aplicação dos parâmetros para o *docking*, sendo concedida flexibilidade total aos ligantes, de modo que todas as ligações ficassem livres para realizar rotações. O receptor foi considerado rígido com a *grid box* de 1 Å centralizada no íon cobre T1 com coordenadas e dimensões que permitissem que T2, T3α e T3β também ficassem dentro da área da *grid box* gerada.

A simulação de *docking* molecular foi configurada usando o algoritmo genético de busca Lamarckiano, logo em seguida foram gerados os arquivos .pdbqt e

submetidos ao *docking* usando o *AutoDock Vina* v.1.1.2. adotando um valor máximo de exaustividade igual a 64, pois, quanto maior a exaustividade mais completa é a busca espacial da estrutura da proteína (Che; Liu; Zhang, 2023). Das nove conformações geradas pelo *AutoDock Vina* a de menor RMSD e menor energia livre foi admitida para visualização das interações moleculares do complexo receptor-ligante, para isso foi utilizado o software *Discovery Studio Visualizer* v.20.1.0.19295.

O protocolo utilizado para a realização do *docking* da LacTv e LacTI com os nonilfenóis foi validado por *redocking* da estrutura cristalizada da lacase azul de *Trametes trogii* complexada com p-metilbenzoato, o mesmo cristal (2HRG) utilizado para a modelagem da LacTI. Foi realizado ainda, o *docking* do cristal 2HRG com o 4NF para confirmar se os resultados obtidos para energia livre de ligação através do protocolo utilizado para o *docking* com estruturas obtidas por modelagem molecular tem semelhança com o resultado obtido utilizando uma estrutura de uma lacase conhecida determinada experimentalmente.

As correlações dos descritores teóricos com dados de energia de ligação obtidos pelo *docking* foram determinadas a partir do coeficiente de Pearson considerando um nível de confiança com valor de P de 0,05, para isso foi usado o software *GraphPad Prism* (Versão 6). As correlações positivas e negativas foram interpretadas considerando-se a seguinte classificação para os valores de r: perfeita quando $r = 1,0$ e $-1,0$; muito forte quando $|0,8| < r < |1|$ e $|-0,8| > r > |-1|$; forte quando $|0,6| < r \leq |0,8|$ e $|-0,6| > r \geq |-0,8|$; moderada quando $|0,3| < r \leq |0,6|$ e $|-0,3| > r \geq |-0,6|$; desprezível quando $|0,1| < r \leq |0,3|$ e $|-0,1| > r \geq |-0,3|$; e nula quando $0 < r \leq |0,1|$ e $0 > r \geq |-0,1|$ (Akoglu, 2018).

4.7 Dinâmica molecular

A simulação da dinâmica molecular para os complexos lacase-4NF gerados pelo *docking* foi realizada utilizando o pacote GROMACS 2023.3 (Abraham et al., 2015; Pronk et al., 2013). A topologia para a lacase de ambas as espécies foi obtida utilizando o campo de força charmm36 de julho de 2022 do MacKerell Lab (Huang; Mackerell, 2013), e para gerar o arquivo .str da topologia do 4NF foi utilizado o CHARMM-CGenFF utilizando o arquivo do ligante extraído do complexo obtido do *docking* no formato .mol2, o CGenFF foi utilizado para a parametrização dos ligantes por ser compatível com o campo de força charmm36. Os complexos foram

centralizados em uma caixa dodecaédrica com limites de 9,024 nm e em seguida as caixas foram solvatadas aplicando o modelo de água TIP3P e adicionadas de íons Cl^- e Na^+ para neutralizar o sistema. A minimização das energias do sistema foi realizada por meio do algoritmo *steepest descent* a fim de reduzir a ocorrência de interações desfavoráveis. As simulações para o equilíbrio foram realizadas para o tempo de 1 ns em condições NVT e NPT, utilizando um termostato V-rescale com temperatura alvo de 300 K e o barostato Berendsen com a pressão alvo de 1 bar. Para a produção da dinâmica molecular nos sistemas em equilíbrio foi adotado para as análises o tempo de 1 ns (Sharma; Panwar; Sharma, 2020), o script foi configurado para salvar as energias e as coordenadas das trajetórias a cada 1 ps sendo utilizado o método *Particle Mesh Ewald* (PME) para tratamento das interações eletrostáticas de longa distância e o método de Verlet para interações de curta distância.

Para a análise da estabilidade do complexo lacase-4NF durante o tempo de simulação da dinâmica foram plotados os gráficos da variação da temperatura por meio da simulação NVT, da densidade e da pressão durante a equilibração do sistema na simulação NPT e do raio de giro, RMSD da proteína complexada ao ligante e da Flutuação Quadrática Média (RMSF) da proteína e a área de superfície da proteína acessível ao solvente (SASA) durante a simulação da dinâmica molecular no sistema equilibrado.

Para a análise da interação lacase-4NF foram plotados os gráficos das energias de interação e do número de ligações de hidrogênios formadas entre a lacase e o 4NF durante a dinâmica. A energia livre de ligação (ΔG_{bind}) média da proteína-ligante para os complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF durante a dinâmica foi calculada utilizando o método MMPBSA (*molecular mechanics generalized Poisson-Boltzmann*) (Valdés-Tresanco et al., 2021), utilizado para calcular a energia livre de ligação e estimar a estabilidade dos complexos a partir dos arquivos de trajetória da dinâmica molecular gerados pelo gromacs (Kumari; Kumar; Lynn, 2014). Para isso, foram considerados *frames* de toda a trajetória de 1 ns da simulação de dinâmica molecular dos dois complexos.

Para utilizar o pacote gmx_MMPBSA para a análise das energias foram instalados os pacotes Miniconda e Python3. No diretório de trabalho para os cálculos MMPBSA foram adicionados script python MMPBSA, os arquivos de trajetória e os arquivos de topologias gerados pelo gromacs para executar o comando final (mpirun

-np 8 gmx_MMPBSA MPI -O -i mmpbsa.in -cs md_0_10.tpr -ci index_mmpbsa.ndx -cg 1 14 -ct md_0_10_center.xtc -cp topol.top).

As contribuições energéticas para o complexo receptor-ligante são divididas em ΔG_{GAS} e ΔG_{SOLV} , em que ΔG_{GAS} é a energia de interação obtida pela soma dos componentes internos ligados ($\Delta BOND + \Delta ANGLE + \Delta DIHED$) e não ligados ($\Delta VDWAAALS + \Delta EEL$) e a energia livre de solvatação (ΔG_{SOLV}) é obtida pela soma das contribuições polares (ΔEGB) e apolares ($\Delta ESURF$) (Cooper; Bardhan; Santa María, 2020; Joshi et al., 2023). A energia livre de ligação da reação no sistema solvatado para a trajetória da dinâmica molecular foi calculada conforme a Equação 10 (Abdjan et al., 2023; Chen, 2022).

Toda a simulação foi realizada em um computador provido de uma CPU Intel 11th Gen Intel(R) Core(TM) i5-1135G7 @ 2.40GHz utilizando a capacidade máxima de 8 threads e uma GPU Intel(R) Graphics [0x9a49], architecture 12.0.0, vendor: Intel(R) Corporation, device version: OpenCL 3.0 NEO , driver version 23.35.27191.9 para rodar as simulações.

Equação 10: Energia livre de ligação média da trajetória da dinâmica molecular

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{GAS} + \Delta G_{SOLV}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do 4-nonilfenol e intermediários

5.1.1 Métodos clássicos

Para os métodos clássicos testados, os campos de forças GAFF e MMFF94s foram os que apresentaram menor RMSD como mostra a Tabela 5.1. Como todos os métodos apresentaram RMSD aceitável (Novič et al., 2016) sendo demonstrado que as estruturas estavam em seu mínimo de energia, optou-se por utilizar o MMFF94s para a pré-otimização dos cristais por ser este o método mais indicado para esse tipo de estudo e por ter sido demonstrado fornecer uma boa precisão na minimização de energia em uma variedade de moléculas orgânicas e de compostos bioativos (Halgren, 1999; Wahl et al., 2019). A sobreposição do 4NF otimizado à estrutura tridimensional inicial pode ser vista na Figura 5.1.

Tabela 5.1: Valores de RMSD da sobreposição das estruturas otimizadas por métodos clássicos com a estrutura cristalográfica do nonilfenol destacando os menores RMSDs.

4-NONILFENOL	ENERGIA (kJ.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
GAFF	21,3104	0,0896
GHEMICAL	-5,86821	0,1062
MMFF94	24,4876	0,0984
MMFF94s	24,4876	0,0984
UFF	79,3372	0,3309

Fonte: Própria.

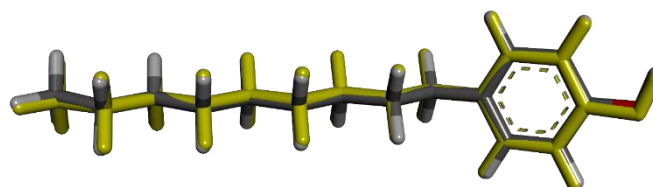


Figura 5.1: Sobreposição da estrutura do 4-nonilfenol (CID 1752) com a estrutura otimizada pelo MMFF94s. Fonte: Própria, elaborada no Avogadro e *Discovery Studio*.

5.1.2 Métodos semi-empíricos

Ao contrário dos métodos clássicos, os métodos semiempíricos permitem ao usuário obter outras conformações dos compostos ao exercer uma série de energias admitidas para cada átomo da molécula simulando um conjunto de dados experimentais como geometrias de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e energias de ionização (Sant'Anna, 2009). Os menores valores de RMSD foram apresentados pelos métodos PM6 e PM7, respectivamente (Tabela 5.2), indicando que esses dois métodos se aproximaram mais dos resultados depositados no *PubChem*. A escolha do método foi baseada na literatura, sendo admitido o método PM7 para otimização final dos nonilfenóis por este ser adequado para modelar reações catalisadas por enzimas. Além disso, o método supracitado tem demonstrado oferecer resultados com maior acurácia quando comparado ao restante dos métodos semiempíricos no que diz respeito ao calor de formação, mostrando ser bastante eficiente na previsão da interação de ligantes em ambientes proteicos (Stewart, 2017).

Tabela 5.2: Valores de RMSD da sobreposição das estruturas pré-otimizadas do Nonilfenol por método clássico (MMFF94s) e posteriormente por métodos semi-empíricos, destacando o menor valor de RMSD.

4-NONILFENOL	ENERGIA (kJ.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
AM1	46,2839	0,1188
MNDO	49,8126	0,1236
MNDO-d	49,6374	0,1229
PM3	33,2168	0,1118
PM6	32,9367	0,1004
PM7	32,4858	0,1079
RM1	36,5879	0,1185

Fonte: Própria.

Outro ponto positivo de se utilizar o PM7 como método de otimização é que este possui os algoritmos de busca para obtenção dos dados de energia de átomos mais recentes que o MOPAC disponibiliza, o que permite a utilização de um único método para a simulação. Isso faz com que muitos dos problemas encontrados quando se usa dois ou mais métodos sejam reduzidos, evitando assim, a necessidade de utilização de métodos próprios para o tratamento de estruturas químicas individuais, como pontes de sal e ligações de hidrogênio, e diminuindo a possibilidade

de ocorrência de erros nas propriedades estruturais e de energia dos compostos modelados (Ryan et al., 2016).

5.2 Parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade

Os orbitais de fronteira HOMO e LUMO são frequentemente considerados como os orbitais de fronteira mais importantes por serem capazes de determinar como uma molécula se comporta ao interagir com outras espécies, uma vez que a afinidade eletrônica (A) de uma molécula é dada pela energia negativa do LUMO e o potencial de ionização (I) é dado pela energia negativa do HOMO (Pilli; Banerjee; Mohanty, 2015).

O cálculo de GAP evidencia essas energias de modo que quanto mais estreito o GAP entre as energias dos orbitais mais reativa e mais polarizável é a molécula, enquanto valores de GAP mais altos indicam maior estabilidade. Essa relação está associada com os conceitos de dureza e maciez, de modo que quanto maior o GAP entre as energias desses orbitais maior a dureza e quanto menor maior a maciez (Karunakaran; Balachandran, 2012; Zhang; Musgrave, 2007).

Os valores obtidos pelo cálculo do GAP mostraram um aumento à medida que o nonilfenol etoxilado é degradado, apresentando valores de GAP de 8.969, 8.998, 9.002, 9.065 e 9.067 para NF2EO, NF1EO, NF2EC, NF1EC e 4NF, respectivamente (Tabela 5.3). O valor alto de GAP reflete uma alta estabilidade desses compostos e o aumento desses valores com a diminuição de grupos etoxilados confirma uma maior recalcitrância e dificuldade de degradação do composto final 4NF na natureza em relação aos seus precursores (Bergé et al., 2012) e reforça a necessidade de diminuir os riscos que poluentes emergentes como o nonilfenol representam ao meio ambiente e à biodiversidade, uma vez que os resultados mostram também altos valores de eletrofilicidade (Tabela 5.3), o que presume toxicidade considerável dos compostos (Chinnasamy; Poomani, 2020). A tendência à difícil degradação também é indicada pelo fato de os compostos possuírem alto potencial químico negativo e alta dureza (Mushtaque et al., 2019). Além disso, a maior dureza (4.5337 eV) e menor maciez (0,2206 eV) observadas para o 4NF revela que este é o menos reativo e cineticamente mais estável em relação aos seus intermediários (Khalid et al., 2023).

Tabela 5.3: Parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade para o nonilfenol e intermediários destacando os maiores valores em negrito e menores valores em vermelho para cada parâmetro.

Parâmetros	NF2EO	NF1EO	NF2EC	NF1EC	4NF
Calor final de formação (ΔH_f°) (kJ.mol ⁻¹)	-692,510250	-514,140950	-866,857130	-681,847580	-332,301010
HOMO (eV)	-8,984162	-9,057904	-9,084812	-9,216153	-9,179220
LUMO (eV)	-0,015585	-0,059826	-0,083191	-0,151116	-0,111911
LUMO - HOMO gap (eV)	8,968577	8,998078	9,001621	9,065037	9,067309
Potencial de ionização (I) (eV)	8,984162	9,057904	9,084812	9,216153	9,179220
Afinidade eletrônica (A) (eV)	0,015585	0,059826	0,083191	0,151116	0,111911
Eletronegatividade (χ) (eV)	4,499874	4,558865	4,584002	4,683635	4,645565
Potencial químico (μ) (eV)	-4,499874	-4,558865	-4,584002	-4,683635	-4,645565
Dureza (η)	4,484289	4,499039	4,500811	4,532519	4,533655
Maciez (σ)	0,223001	0,222270	0,222182	0,220628	0,220573
Eletrofilicidade (ω)	2,257757	2,309743	2,334366	2,419895	2,380119
Nucleofilicidade (N)	0,442917	0,432949	0,428382	0,413241	0,420147

Fonte: Própria.

5.3 Modelagem molecular da lacase

Foram gerados pelo *SwissModel* 50 modelos, e após a exclusão pela triagem virtual estabelecida pela fórmula [=SE(E(E(E(E(E(E([@[SEQ. ID (%)]]>=70;[@[Resolução do cristal por difração de raio-X (Å)]<=2;[@GMQE]>=0.9;[@QMEAN4]<=1.75;[@[Errat (%)]]>=90;[@[Verify (%)]]>=80;[@[Procheck (%)]]>=88)))))];"PASSED"; "NO PASSED")]] no Excel, restaram sete modelos adequados para *Trametes villosa* e sete modelos adequados para *Trametes lactinea* (Tabela 5.4 e Tabela 5.5). O primeiro passo da triagem permitiu a seleção de modelos com percentual de identidade do alinhamento com a sequência primária da lacase de *T. villosa* e *T. lactinea* acima de 70%, o que é muito bom, pois está acima do mínimo aceitável de 30% de semelhança para geração de um bom modelo quando o número de resíduos é superior a 80 (Santos Filho; Alencastro, 2003; Verli, 2014). Além disso os modelos restantes apresentaram ótimos valores de GMQE indicando alto índice de confiabilidade com valores muito próximos a 1 e valores de QMEAN satisfatórios, abaixo de 2 demonstrando Z-score com boa normalização do QMEAN (Figura 5.2 a e Figura 5.3 a) e alto grau de natalidade e

consistência das distâncias interatômicas do modelo quando comparadas a informações de proteínas homólogas determinadas experimentalmente (Figura 5.2 b e Figura 5.3 b) (Waterhouse et al., 2018).

Tabela 5.4: Modelos aprovados na modelagem da lacase de *T. villosa*, destacado em negrito o modelo aprovado e escolhido para as simulações com base no melhor valor obtido pelo Procheck.

Modelos ordenados por procheck	SEQ. ID (%)	Resolução do cristal por difração de raio-X (Å)	GMQE	QMEAN4	Errat	Verify (%)	Procheck (%)
model 19	76,41	1,50	0,92	1,61	92,84	93,59	89,90
model 22	75,91	1,50	0,91	1,27	93,36	93,76	89,40
model 29	76,11	1,90	0,91	1,23	90,72	91,95	88,40
model 15	77,42	1,75	0,92	1,04	94,74	93,17	88,20
model 12	79,07	1,80	0,92	1,49	92,53	93,76	88,20
model 24	76,61	1,90	0,91	1,52	90,41	91,38	88,20
model 08	78,96	1,80	0,93	1,56	92,12	93,79	88,20

Fonte: Própria.

Tabela 5.5: Modelos aprovados na modelagem da lacase de *T. lactinea*, destacado em vermelho o modelo aprovado e escolhido para as simulações com base no melhor valor obtido pelo procheck.

Modelos ordenados por procheck	SEQ. ID (%)	Resolução do cristal por difração de raio-X (Å)	GMQE	QMEAN4	Errat	Verify (%)	Procheck (%)
model 28	73,48	1,58	0,90	1,09	90,98	87,30	89,90
model 06	83,47	1,75	0,92	1,55	94,55	85,51	89,70
model 05	83,00	1,75	0,92	1,74	92,13	87,88	89,20
model 10	79,55	1,80	0,91	1,40	91,74	88,08	88,70
model 23	74,09	1,50	0,90	1,13	90,40	87,50	88,20
model 18	77,53	1,76	0,91	1,30	91,25	88,08	88,00
model 09	80,20	1,20	0,92	1,24	91,48	85,89	88,00

Fonte: Própria.

Os resultados obtidos pelo *Errat* e *Verify* (Tabela 5.4 e Tabela 5.5) validaram os modelos que foram aprovados na triagem indicando um fator de qualidade geral médio para os modelos entre 90,40 e 94,74%, resultado considerado satisfatório, já

que o *Errat* esperado para um modelo confiável é de no mínimo 80%. A validação utilizando o *Verify* resultou em valores acima de 85.51% o que sugere que os resíduos estão em posições estáveis (Román et al., 2020).

Uma vez que todos os modelos finais apresentaram *Errat* e *Verify* favoráveis à validação, para a realização do *docking* optou-se pelo modelo que apresentou melhor percentual de resíduos em regiões favoráveis no gráfico de Ramachandran através do Procheck. Assim, para a o *docking* com a lacase de *T. villosa* foi escolhido o modelo 19 que apresenta 76,41% de identidade e 83% de similaridade (Figura 5.4 a) com o *template* utilizado (5a7e.1) e que mostrou 89,9 $\approx$ 90% dos resíduos em regiões favoráveis, 9,4% em regiões permitidas, 0,5% em regiões aceitáveis e 0,2% em regiões não permitidas, sendo esta última ocupada apenas por um resíduo de aminoácido (Leu 78). O modelo somou 99,8% de resíduos em regiões favoráveis, permitidas e aceitáveis (Figura 5.5).

Para a modelagem da lacase de *T. lactinea* o modelo 28 foi o mais adequado e então escolhido para as análises, este apresentou 73,48% de identidade e 81,5% de similaridade (Figura 5.4 b) com o *template* utilizado (2hrq.1) e mostrou 89,9 $\approx$ 90% dos resíduos em regiões favoráveis, 9,4% em regiões permitidas, 0,2% em regiões aceitáveis e 0,5% em regiões não permitidas, sendo os resíduos LEU 79 e PHE 198 responsáveis por este último. O modelo somou no total 99,5% de resíduos em regiões favoráveis, permitidas e aceitáveis (Figura 5.6).

Com esses resultados, valida-se os modelos obtidos para a lacase de ambas as espécies, uma vez que, baseado na análise de 118 estruturas com resolução de até 2 Å é esperado que um bom modelo apresente 90% ou mais de resíduos em regiões favoráveis (Carrascoza; Zaric; Silaghi-Dumitrescu, 2014; Chandrasekaran et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2007; Laskowski et al., 1996). A sobreposição dos modelos mais adequados ao *template* utilizado para a modelagem pode ser vista na Figura 5.7 e na Figura 5.8.

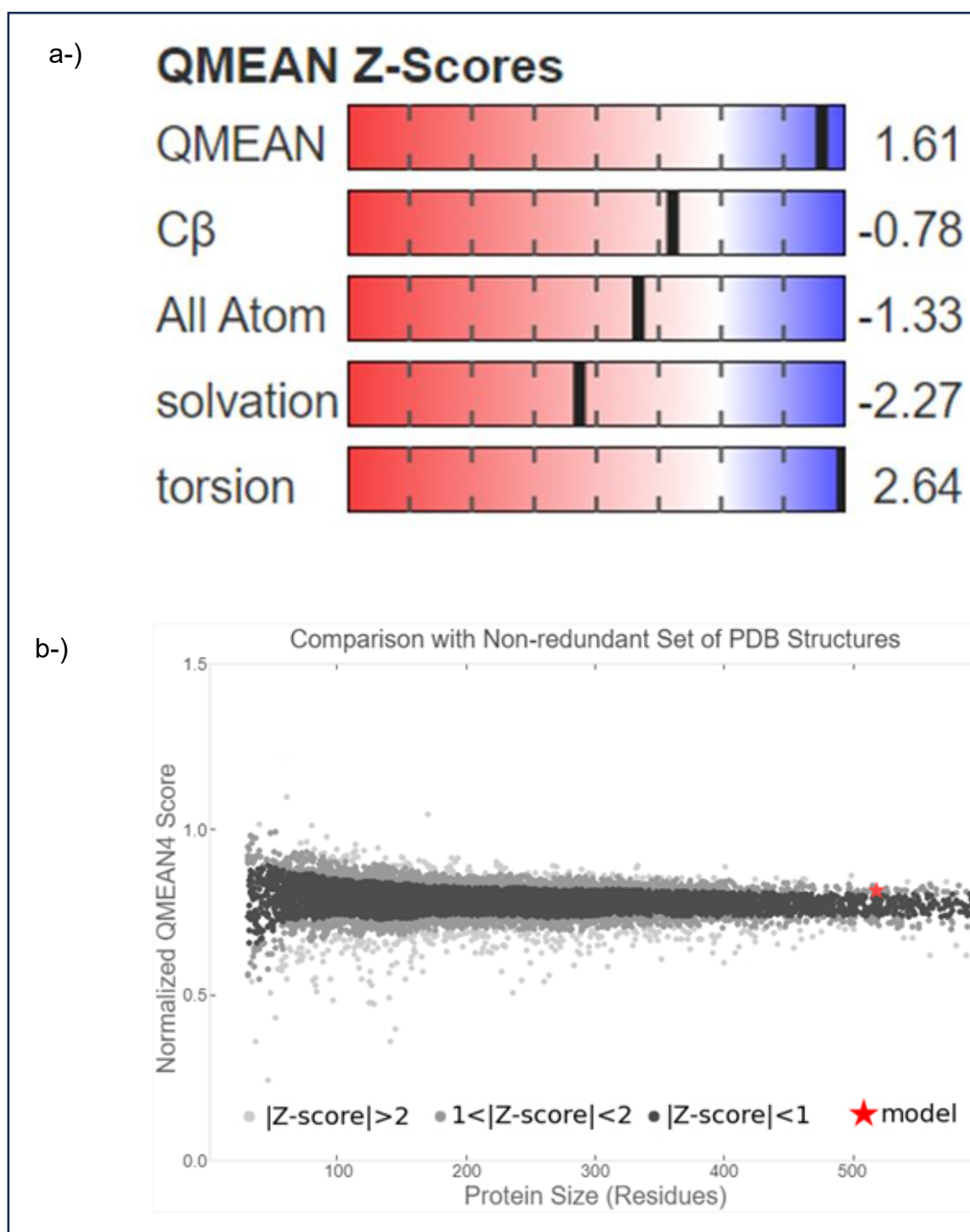


Figura 5.2: Estimativa da qualidade do modelo 19 para a lacase de *T. villosa* prevista pelo cálculo do QMean (a) e resultado do Z-score para a estimativa do grau de confiança das características estruturais observadas no modelo, a fim de determinar o quanto a estrutura está próxima do seu enovelamento nativo (b). A faixa azul indica um melhor alinhamento entre a sequência do modelo com o *template*, a faixa vermelha sinaliza um alinhamento não favorável. Fonte: SWISS MODEL.

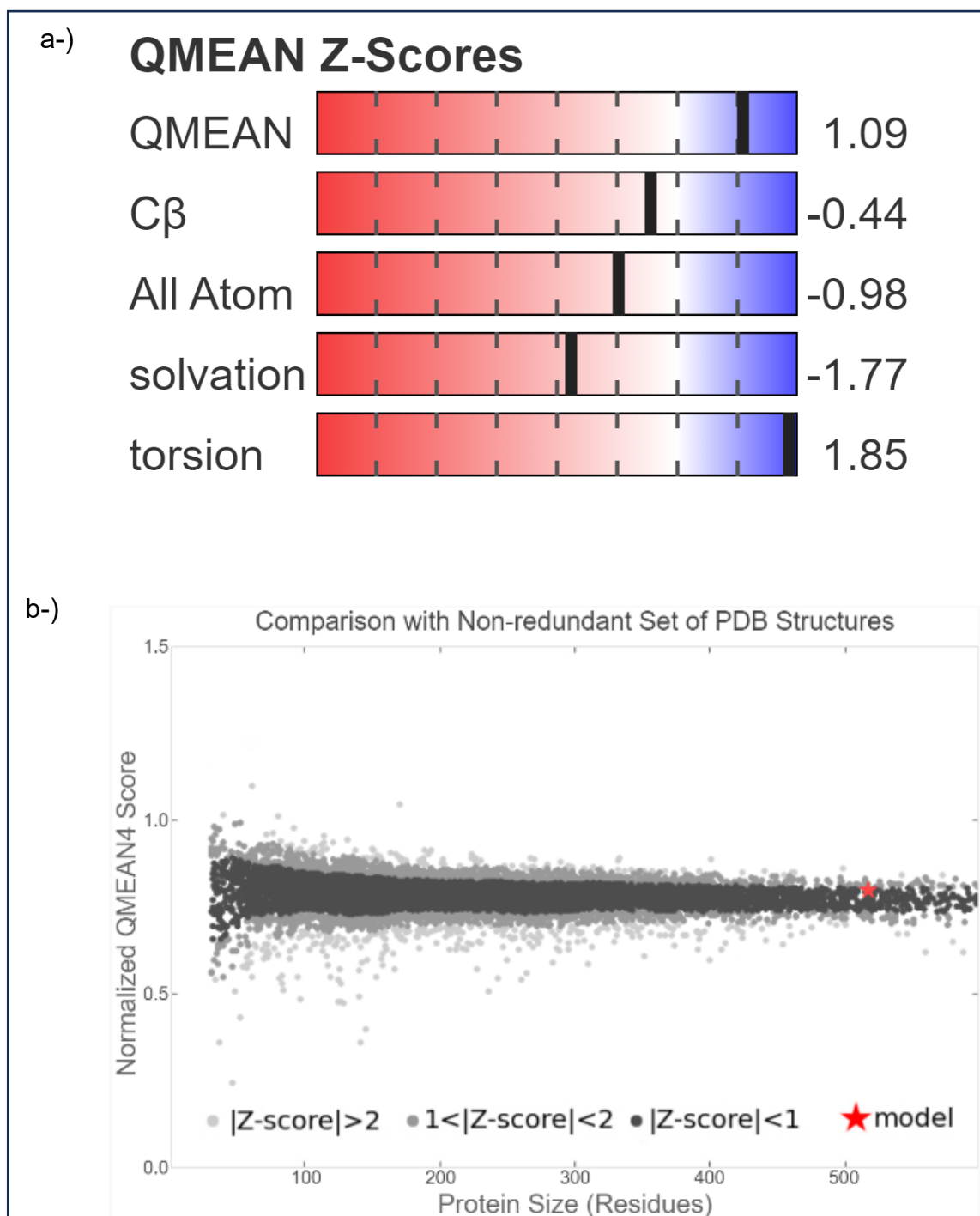


Figura 5.3: Estimativa da qualidade do modelo 28 para a lacase de *T. lactinea* prevista pelo cálculo do QMean (a) e resultado do Z-score para a estimativa do grau de confiança das características estruturais observadas no modelo, a fim de determinar o quanto a estrutura está próxima do seu enovelamento nativo (b). A faixa azul indica um melhor alinhamento entre a sequência do modelo com o *template*, a faixa vermelha sinaliza um alinhamento não favorável. Fonte: SWISS MODEL.



Figura 5.4: a-) Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. villosa* (AAC41687.1) com a sequência molde da *template* utilizado para a modelagem (5A7e.1). b-) Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. lactinea* (KAH9897825.1) com a sequência molde do *template* utilizado para a modelagem (2hrG.1). Em verde os resíduos conservados, em amarelo os conservativos, em azul os resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco os resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços (-) nas sequências apontam os “gaps”. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

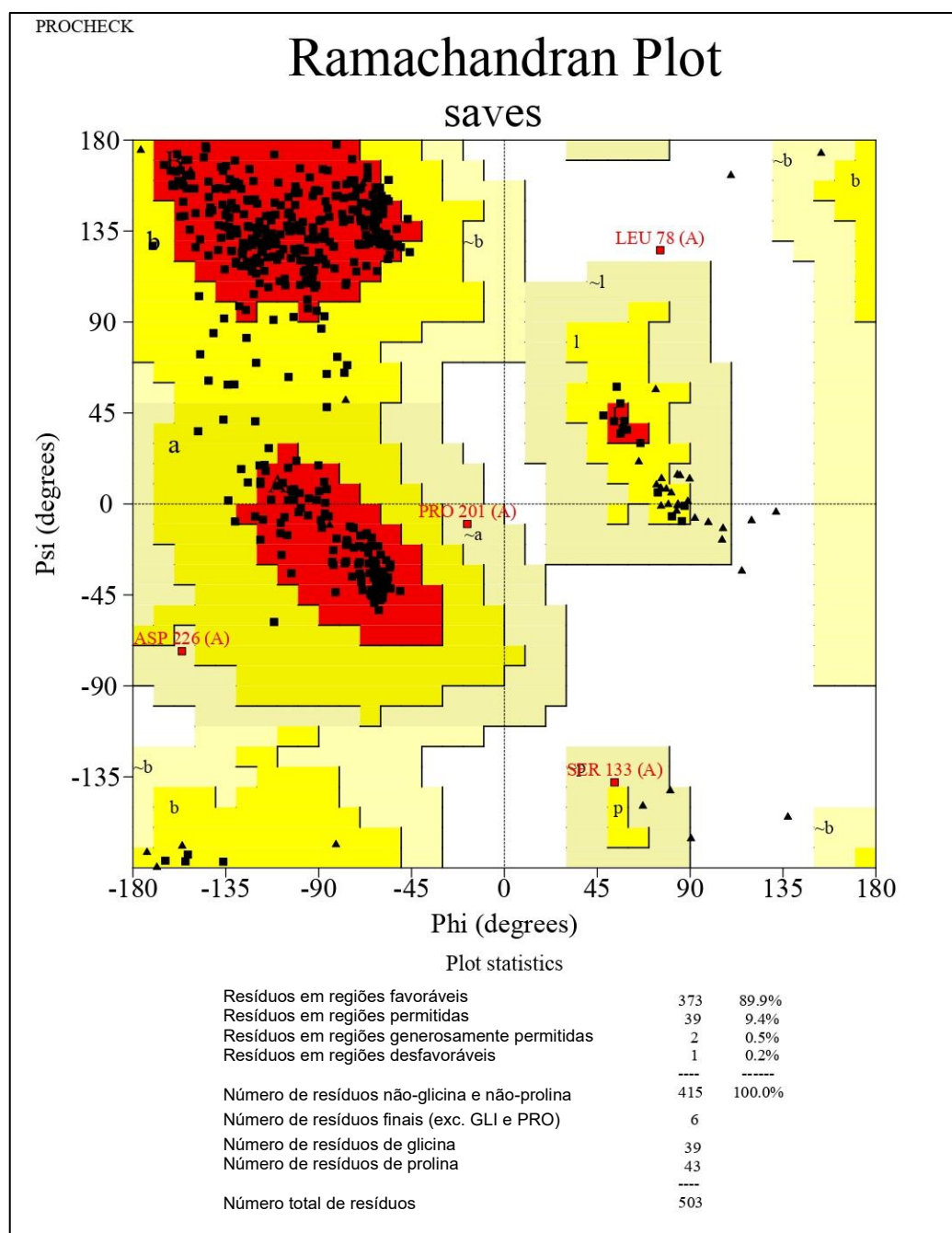


Figura 5.5: Mapa de Ramachandran obtido pelo PROCHECK da LacTv modelada: As áreas em vermelho, amarelo e marrom claro indicam, respectivamente: local mais favorável, locais permitidos e locais aceitáveis de “locação” dos resíduos; as regiões brancas representam as regiões proibidas. A região em vermelho no campo superior esquerdo do mapa indica os resíduos que fazem parte de β -folhas. A região em vermelho no campo inferior esquerdo indica os resíduos que fazem parte de α -hélices.

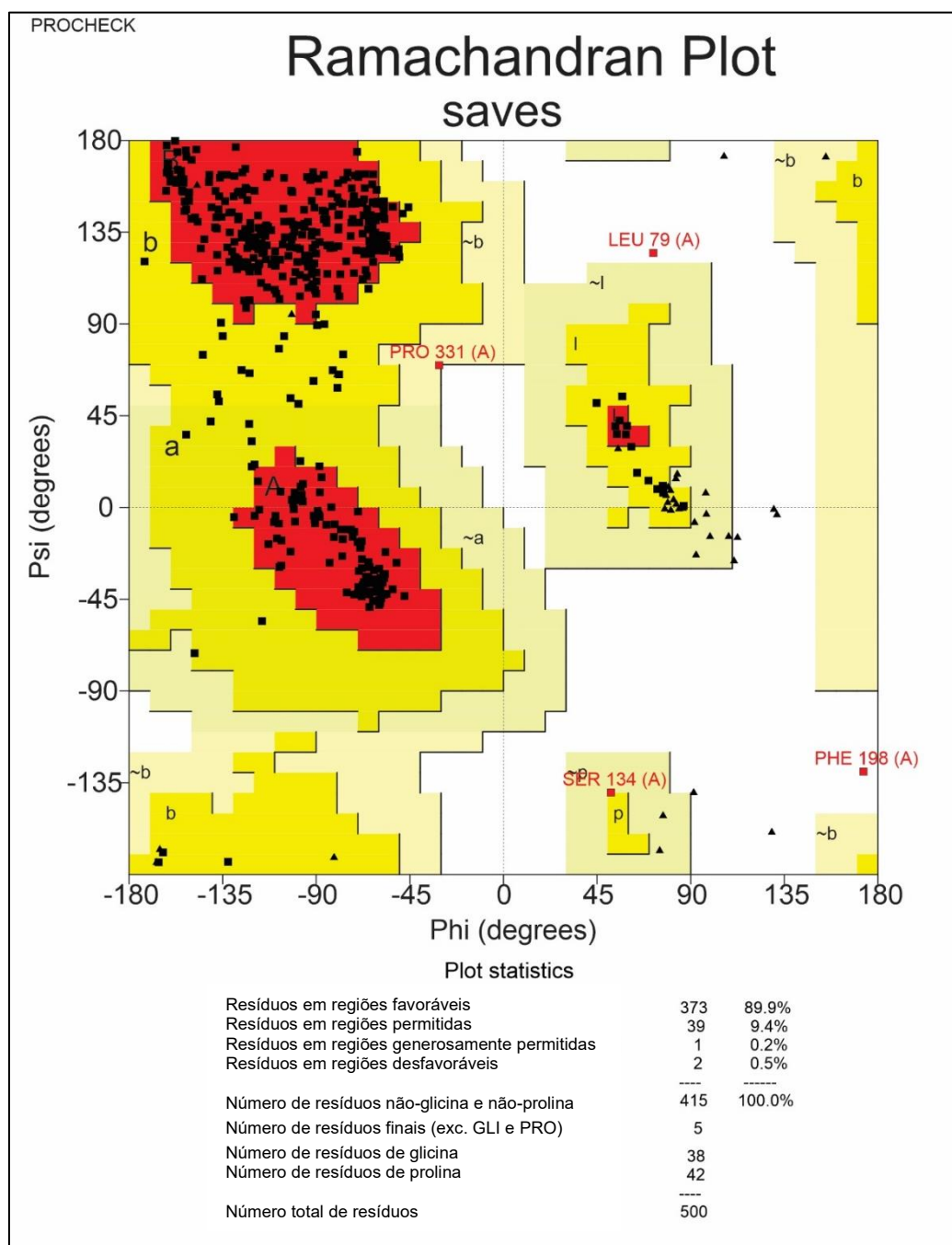


Figura 5.6: Mapa de Ramachandran obtido pelo PROCHECK da LacTI modelada: As áreas em vermelho, amarelo e marrom claro indicam, respectivamente: local mais favorável, locais permitidos e locais aceitáveis de “locação” dos resíduos; as regiões brancas representam as regiões proibidas. A região em vermelho no campo superior esquerdo do mapa indica os resíduos que fazem parte de β -folhas. A região em vermelho no campo inferior esquerdo indica os resíduos que fazem parte de α -hélices.

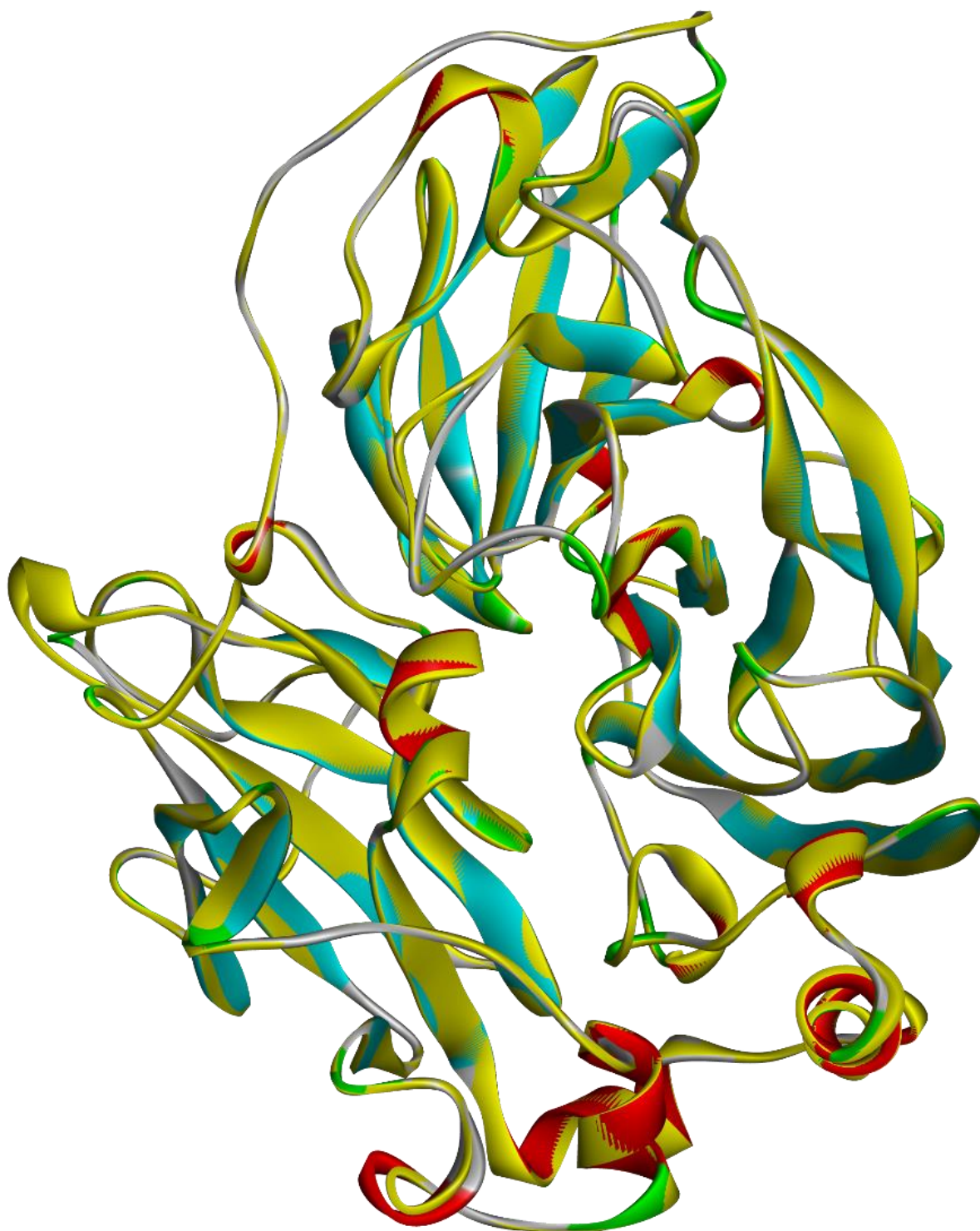


Figura 5.7: Modelo da lacase de *T. villosa* sobreposto ao *template* 5A7E (PDB) da lacase de *Coriopsis gallica*, em amarelo destaca-se o modelo obtido. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

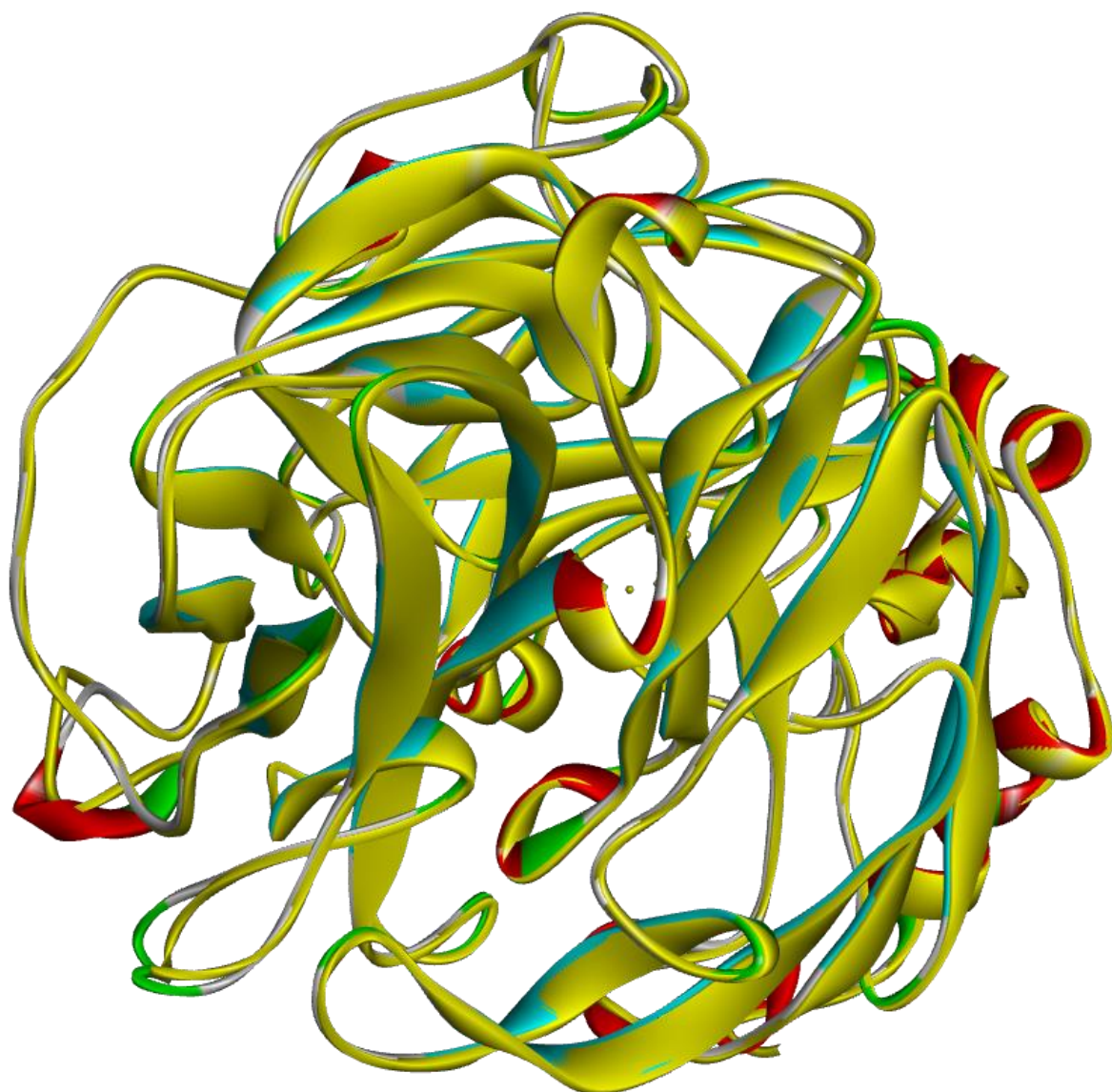


Figura 5.8: Modelo da lacase de *T. lactinea* sobreposto ao *template* 2HRG (PDB) da lacase de *Trametes trogii*, em amarelo destaca-se o modelo obtido. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

5.4 Grau de homologia da LacTv e LacTI

O percentual de identidade entre a LacTv e a LacTI foi de 71,9% e o grau de similaridade, que inclui as regiões conservadas e conservativas, foi de 85,6% (Figura 5.9). Esse alto grau de conservação é refletido no resultado observado através do *docking* em que foi verificado resíduos coincidentes para a interação da lacase das duas espécies com o 4NF.

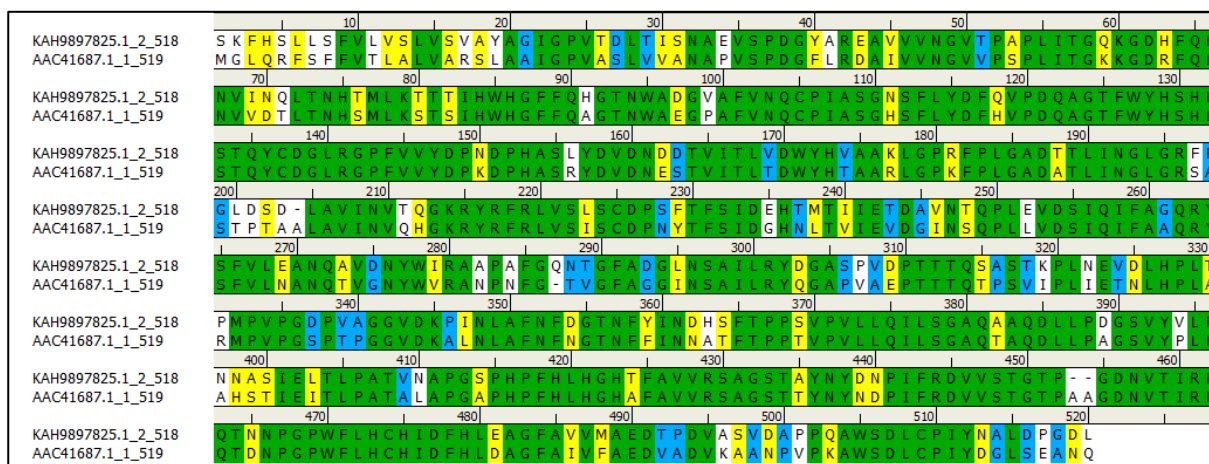


Figura 5.9: Alinhamento da sequência fasta da lacase de *T. villosa* (AAC41687.1) com lacase de *T. lactinea* (KAH9897825.1). Em verde os resíduos conservados, em amarelo os conservativos, em azul os resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco os resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços (-) nas sequências apontam os “gaps”. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

5.5 Docking molecular e mecanismos de interação

A energia livre de ligação entre os ligantes 4NF, NF1EC, NF1EO, NF2EC e NF2EO e a lacase predita na simulação de *docking* molecular, mostra valores de afinidade de ligação com a LacTv menores que $-5,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ com um ΔG_{bind} de $-5,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a interação com o 4NF e valores menores que $-5,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a LacTI com um ΔG_{bind} de $-6,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a interação com o 4NF (Tabela 5.6). Valores de ΔG_{bind} negativos são considerados favoráveis à degradação, assim, os resultados obtidos pelo *docking* sugerem que a degradação do 4NF e de seus intermediários pela LacTv e pela LacTI é espontânea. Além disso, é observado que a afinidade entre a lacase de ambas as espécies e o 4NF é a mais forte entre os ligantes

estudados, apresentando o ΔG_{bind} mais negativo de aproximadamente $-6,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-6,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ com a LacTv e LacTI, respectivamente (Tabela 5.6), o que indica que o 4NF pode ser degradado com mais facilidade pela LacTv e pela LacTI em relação aos seus intermediários, uma vez que quanto menor a energia de ligação entre a enzima e o substrato mais estável é a interação e mais fácil a complexação e degradação do contaminante (Hongyan et al., 2019).

Tabela 5.6: Energia livre de ligação (ΔG_{bind}) entre a LacTv e LacTI com o 4NF e seus intermediários.

Ligantes	ΔG_{bind} TEÓRICA (kcal.mol^{-1})	
	<i>Trametes villosa</i>	<i>Trametes lactinea</i>
4NF	-5,9	-6,2
NF1EC	-5,5	-5,7
NF1EO	-5,1	-5,5
NF2EC	-5,0	-5,8
NF2EO	-5,4	-5,5

Fonte: Própria.

O *redocking* do ligante p-metilbenzoato com a lacase de *T. trogii* para o complexo cristalino 2HRG obtido do PDB, apresentou um RMSD de $1,2176 \text{ \AA}$ (Figura 5.10 a), o que mostra que o protocolo utilizado é capaz de reproduzir a pose do ligante no sítio ativo de ligação e prever os mesmos resíduos de aminoácidos da proteína que interagem com o ligante observados experimentalmente (Figura 5.10 c e d). A energia livre de ligação da interação 4NF-2HRG (Figura 5.10 b) foi de $-5,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, resultado muito semelhante ao obtido para o *docking* dos nonilfenóis com a LacTv e LacTI.

Portanto, com esse resultado, valida-se o protocolo de *docking* utilizado neste trabalho. Uma vez que, para validação por *redocking* é exigido valores de RMSD menores do que $2.0 \text{ \AA}$ e foi demonstrado que os resultados obtidos para o *docking* com a lacase obtida por modelagem por homologia é semelhante ao resultado obtido para o *docking* com uma lacase conhecida determinada experimentalmente (Hevener et al., 2009; Karunakaran; Muniyan, 2023).

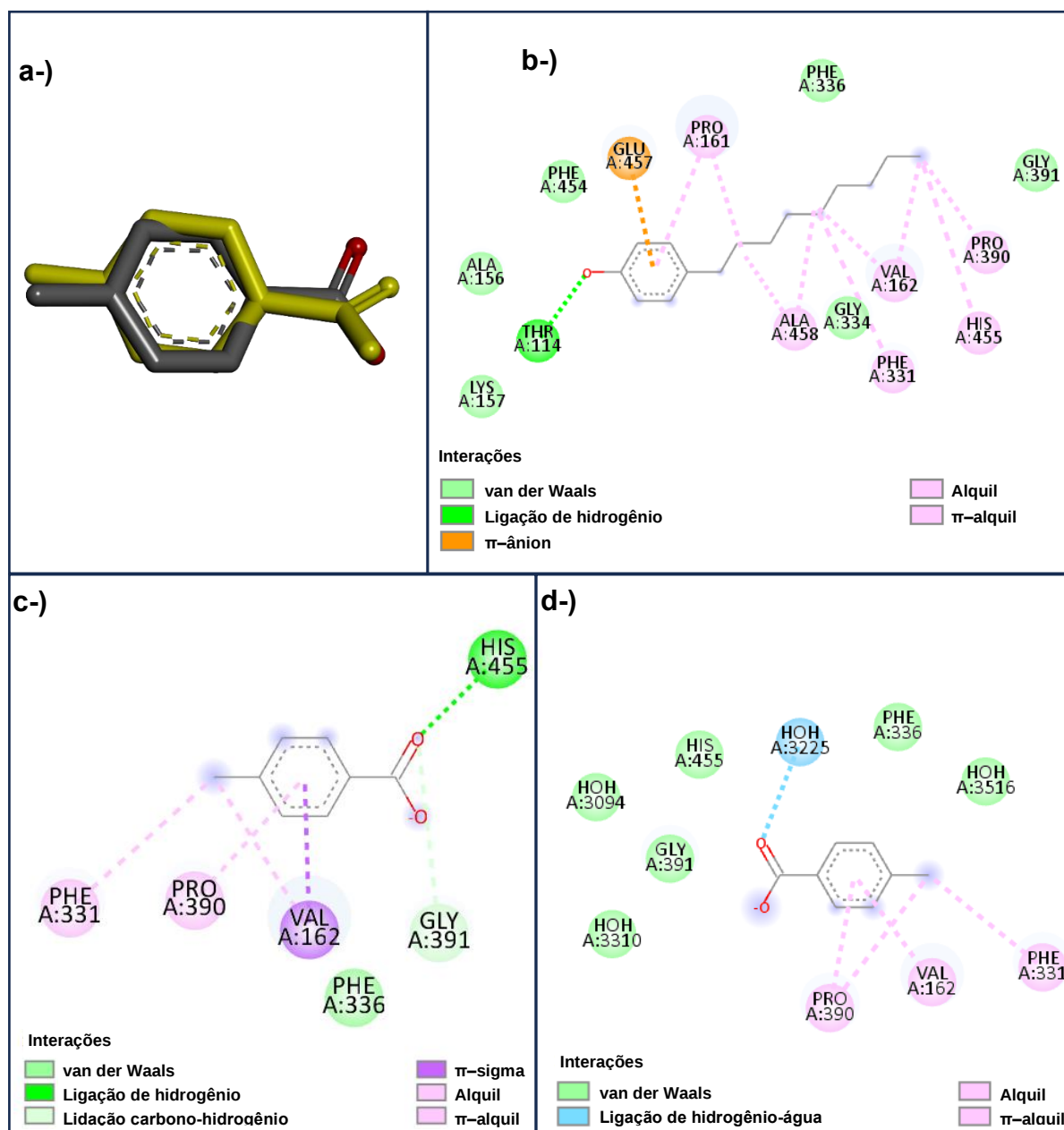


Figura 5.10: a-) Sobreposição da pose de menor energia obtida pelo *redocking* à estrutura determinada experimentalmente para a interação do complexo p-metilbenzoato-lacasse de *T. troglia* (2HRG). b-) Interações observadas por meio do *docking* do complexo 4NF-2HRG. c-) Interações observadas por meio do *redocking* do complexo metilbenzoato-2HRG. d-) interações observadas para o complexo cristalino metilbenzoato-2HRG determinado experimentalmente.

Alguns trabalhos relatam o envolvimento de lacases fúngicas na degradação do 4NF, no entanto, não há registro de informações detalhadas sobre a via metabólica e produtos de degradação formados especificamente pela atuação desta enzima (Catapane et al., 2013; Catherine; Penninckx; Frédéric, 2016; Gałazka; Jankiewicz,

2022; Garcia-Morales et al., 2015; Junghanns et al., 2005; Mallerman et al., 2019; Soares et al., 2005; Spina et al., 2015; Stenholm et al., 2020). Além disso, a maioria dos trabalhos encontrados não avaliaram a atuação da lacase isoladamente, mas sim a remediação fúngica. O que envolve outras enzimas oxirredutoras, como peroxidases, e isso dificulta o estabelecimento de um caminho de degradação do 4NF pela lacase, visto que a formação dos produtos tem participação de outras enzimas.

Já os trabalhos que estudaram a atividade da lacase com o 4NF, se limitaram em avaliar a redução da atividade estrogênica do composto ou a taxa de eliminação (Catapane et al., 2013; Mallerman et al., 2019; Spina et al., 2015) e quando foi detectada a formação de produtos, estes não foram identificados (Garcia-Morales et al., 2015; Junghanns et al., 2005). Um estudo da degradação do 4NF por fungos produtores de lacase identificou por meio de análises de LC-MS, produtos de degradação do 4NF. No entanto, constatou-se que sete deles estão relacionados à uma transformação abiótica, sendo o ácido 3,4-Diidroxibenzóico o único dentre os compostos identificados associado à presença da lacase, o que sugere, para este caso, a participação desta enzima na fase final da degradação (Figura 5.11) (Mtibaà et al., 2020).

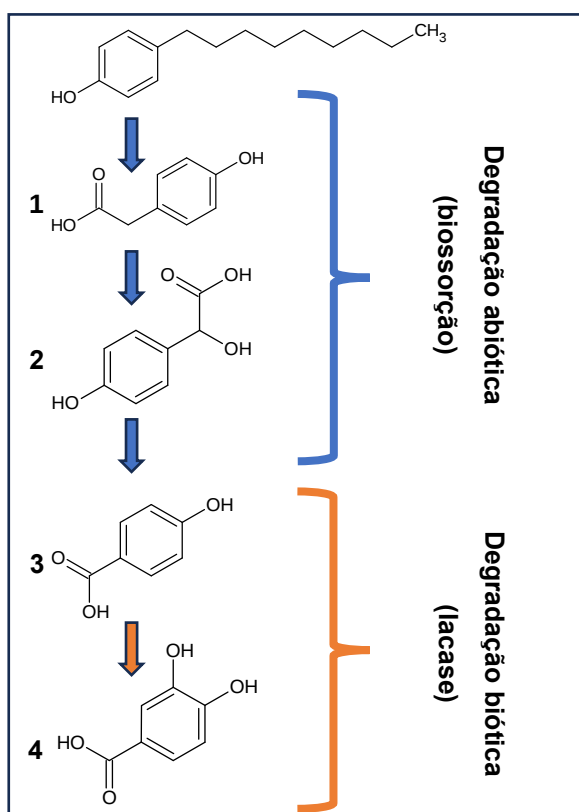


Figura 5.11: Produtos e via de degradação pelo fungo *Thielavia* sp. proposta por Mtibaà et al. (2020) para o isômero do 4NF com a cadeia lateral linear avaliado

neste trabalho, em que ocorre transformação abiótica (setas azuis) seguida de uma etapa biótica (seta laranja), estando envolvidos o Ácido 4-hidroxifenilacético (1), Ácido 2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) acético (2), Ácido 4-hidroxibenzoico (3) e ácido 3,4-Diidroxibenzóico (4). Fonte: Elaborada pelo autor em ChemSketch adaptada de Mtibaa et al. (2020).

Embora a atuação da lacase na degradação do 4NF ainda não tenha sido resolvida, é evidente que a degradação fúngica desse composto se dá por encurtamento da cadeia alquílica com a conseguinte formação do ácido 3,4-Diidroxibenzóico, sendo este, o último produto formado antes da clivagem do anel aromático (Mtibaa et al., 2020; Rózalska et al., 2015). A degradação do 4NF pode acontecer, por exemplo, por hidroxilação, principalmente na cadeia alquílica, no entanto, também pode ocorrer ataque oxidativo com hidroxilação do anel aromático em isômeros de nonilfenol com cadeias alquílicas altamente ramificadas (Junghanns et al., 2005). As interações dos aminoácidos do sítio ativo da LacTv e LaTl com o 4NF e seus intermediários e os possíveis locais de interação na cadeia alquílica e no anel aromático são apresentadas e discutidas a seguir, nos itens 5.5.1 e 5.5.2.

5.5.1 *Docking* LacTv-nonilfenóis

Os resultados do *docking* molecular mostram que a LacTv interage com 4NF e seus intermediários por meio de ligações de hidrogênio, ligação carbono-hidrogênio, doador-doador desfavorável, acceptor-acceptor desfavorável, π -ânion, π -sigma, π - π em formato de T, π -alquil, alquil, ligação de carbono e ligações de van Der Waals (Tabela 5.7). Os aminoácidos Ala 430, Arg 443, Gln 262, Glu 322, Gly 412, His 478, Ile 321, Leu 184, Phe 182, Phe 259, Phe 352, Pro 411, Pro 414 e Ser 447 são sugeridos pela análise do *docking* como sendo os resíduos centrais de interação da LacTv com o 4NF, NF1EC, NF1EO, NF2EC e NF2EO (Figura 5.15). O complexo LacTv-4NF pode ser visto na Figura 5.16.

Tabela 5.7: Resíduos de aminoácidos do sítio ativo que interagem com os substratos para a formação do complexo LacTv–4NF e intermediários.

Compostos Tipos de ligações	NF2EO	NF1EO	NF2EC	NF1EC	4NF
Ligações de Hidrogênio	-	Arg 443; Glu 322;	Arg 443	Glu 322; Gln 262; Arg 443	Glu 322; Ser 447
Ligação de Hidrogênio π-doador		Glu 322		Glu 322	
Ligação carbono- hidrogênio	Pro 414	-	Ser 447	-	-
Doador-doador desfavorável		-	Gln 262	-	-
Aceptor-aceptor desfavorável	Gly 412	-	-	-	-
π-ânion		-		-	Glu 322
π-sigma	Leu 184	-	Ala 430	-	-
π - π em formato de T	Phe 285	-	-	-	-
π-alquil	His 478; Phe 182; Phe 352	Phe 259	-	Phe 259	Phe 259
Alquil	Pro 411	Pro 414; Ala 430; Ile 321	Ala 430; Pro 414	Pro 414; Ala 430; Ile 321	Pro 414; Ala 430
Ligação de carbono	-	-	-	Ser 447	-
van der Waals	Phe 357; Asn 284; Pro 227; Pro 416; Phe 259; Ala 260; Asn 228; Ile 475; Asp 226	Gly 431; Leu 320; Val 446; Gln 262; Tyr 264; Ser 447; Gln 257; Gly 449	Asp 455; Gly 449; Ile 321; Tyr 264; Phe 259; Val 445; Val 446; Glu 322; Leu 320; Gly 431; Ala 453; Gln 257; Thr 450	Gly 431; Leu 320; Val 446; Tyr 264; Gly 449; Gln 257	Gln 257; Leu 320; Tyr 264; Arg 443; Gln 262; Val 446; Val 445; Ile 321; Gly 431; Gly 449

Fonte: Própria.

O Glu 322 assume papel importante na estabilidade dos complexos formados entre a LacTv-4NF e LacTv-intermediários por meio de ligações de hidrogênio entre o oxigênio da sua cadeia lateral e a hidroxila do 4NF, NF1EC e NF1EO; ligação π -ânion do segundo oxigênio da cadeia lateral com o anel aromático do 4NF (Figura 5.14); ligação de hidrogênio π -doador entre um dos hidrogênios do grupo amino e o anel aromático do NF1EC e NF1EO; e ainda interações de van der Waals com o NF2EC (Figura 5.12 e Figura 5.13).

As interações da Arg 443 no mecanismo de complexação previsto pelo *docking* da LacTv com o 4NF e seus intermediários se dão pela formação de pontes de hidrogênio com a carbonila do NF1EC e NF2EC, com a hidroxila do NF1EO e interações de Van Der Waals com o 4NF (Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14).

A presença de aminoácidos polares carregados negativo ou positivamente como Arg 443 e Glu 322 contribuem para formação de ligações de hidrogênio por possuírem nitrogênio e oxigênio com pares de elétrons disponíveis. Além disso, a arginina é considerada frequentemente como o aminoácido mais hidrofílico devido à presença de um grupo guanidino em sua cadeia lateral, configurando uma capacidade para a formação de até seis pontes de hidrogênio (Hristova; Wimley, 2011; Kadam et al., 2018; Mehra et al., 2018).

A His 478 participa na formação do complexo lacase–NF2EO por uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil (Figura 5.12 a). Também por esse mesmo tipo de ligação participam os aminoácidos aromáticos Phe 182, Phe 259 e Phe 352 formando ligações entre Phe 182 e NF2EO, Phe 352 e NF2EO, e Phe 259 com 4NF, NF1EC e NF1EO (Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14). O aminoácido Phe 259 ainda faz interação de Van Der Waals com NF2EC e NF2EO e Phe 285 forma uma ligação do tipo π - π em formato de T entre a cadeia lateral aromática e o anel aromático do NF2EO (Figura 5.12 a e Figura 5.13 a).

As interações com aminoácidos polares não carregados como Gln 262 e Ser 447 ocorreram pela formação de pontes de hidrogênio entre Gln 262 e NF1EC, ligação desfavorável doador-doador entre Gln 262 e NF2EC (Figura 5.13 a), e interações de van Der Waals de Gln262 com 4NF e NF1EO (Figura 5.12 e Figura 5.14). Enquanto o aminoácido Ser 447 faz ligação de hidrogênio entre um hidrogênio do grupo amina e o oxigênio do 4NF (Figura 5.14), ligação de carbono da cadeia lateral com a hidroxila

do NF1EC e interação carbono-hidrogênio com NF2EC (Figura 5.13), bem como interação de Van Der Waals com NF1EO (Figura 5.12).

As interações dos ligantes com aminoácidos apolares da LacTv ocorreu entre os resíduos Ala 430, Gly 414, Ile 321, Leu 184, Pro 414 e Pro 411. Ligações do tipo π -sigma ocorreram entre Ala 430–NF2EC e Leu 184–NF2EO (Figura 5.12 a e Figura 5.13 a) e se dão pela interação do anel aromático de ambos os ligantes e a cadeia lateral dos aminoácidos.

Ligações do tipo alquil na região da calda apolar dos ligantes com a cadeia lateral dos aminoácidos foram formadas entre Ala 430 e os ligantes 4NF, NF1EO, NF2EC e NF1EC; Ile 221 e os ligantes NF1EO e NF1EC; Pro 414 e os ligantes 4NF, NF1EC, NF1EO e NF2EC e entre Pro 411 e NF2EO (Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14). Ile 321 forma ainda uma ligação fraca com o 4NF e NF2EC por meio de interação de Van Der Waals e Pro 414 forma uma ligação carbono-hidrogênio com o carbono 3 do NF2EO (Figura 5.12 a, Figura 5.13 a e Figura 5.14).

As ligações alquil e π -alquil, formadas entre Phe 259, Ala 430 e Pro 414 e o 4NF podem ter contribuição fundamental para o encurtamento da cadeia alquílica para a formação do ácido 3,4-Diidroxibenzóico, identificado por Mtibaà et al. (2020) como produto da degradação do 4NF por fungo produtor de lacase.

A formação de pontes de hidrogênios com os aminoácidos Glu 322, Ser 447, Gln 262 e Arg 443 principalmente com as hidroxilas dos grupos fenólicos sugere que esses resíduos são cruciais no mecanismo de degradação dos intermediários NF1EC, NF1EO e NF2EC e do 4NF (Figura 5.12 a, Figura 5.13 a e b e Figura 5.14). As ligações de hidrogênio são responsáveis pelas interações intermoleculares de maior força dentre as ligações não-covalentes, sendo assim, responsáveis pelas conformações bioativas da macromolécula e pela manutenção da estabilidade do complexo formado entre enzima e ligante (Xue et al., 2023). Além disso, as ligações de hidrogênio, juntamente com outras ligações não-covalentes, entre a proteína e o ligante, são essenciais para manter a molécula alvo dentro do sítio ativo (Dunn, 2010; Oliveira, 2015).

Resíduos de aminoácidos com cadeia lateral aromática como Phe 182, Phe 259, Phe 352 e Phe 285 e de cadeia lateral hidrofóbica como Pro 414 contribuem para a interação com os compostos fenólicos e estão envolvidos em ligações de empilhamento π - π , π -alquil, alquil, ligação carbono-hidrogênio e van der Wals (Tabela 5.7). Algumas dessas interações do tipo dipolo-dipolo assim como as ligações de

hidrogênio, possuem capacidade de modular as propriedades físicas dos resíduos no sítio ativo da LacTv e por isso assumem papel importante na conformação ativa e estabilidade na formação do complexo proteína-ligante (Mehra et al., 2018; Meyer; Castellano; Diederich, 2003; Salonen; Ellermann; Diederich, 2011).

Dos aminoácidos centrais na interação LacTv-nonilfenóis, ocorreram interações hidrofóbicas através de forças de Van Der Waals entre Glu 322-NF2EC, Gln 262-4NF, Gln 262-NF1EO, Arg 443-4NF, Ile 321-4NF, Ile 321-NF2EC, Phe 259-NF2EC e Phe 259-NF2EO (Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14). A contribuição desse tipo de interação é fundamental para a complexação do ligante à enzima, uma vez que atividade biológica está relacionada com a afinidade receptor-ligante e a composição de sítios ativos de enzimas é em sua maioria formada de grupos hidrofóbicos, a ocorrência dessas interações assume, portanto, um papel relevante para a atividade da lacase na catálise da oxidação do substrato e redução do oxigênio molecular por maximizar os contatos com resíduos específicos do receptor enzimático e influenciar determinados modos conformacionais da enzima para que ocorra o encaixe da molécula alvo no sítio ativo (Dunn, 2010; Guimarães, 2012).

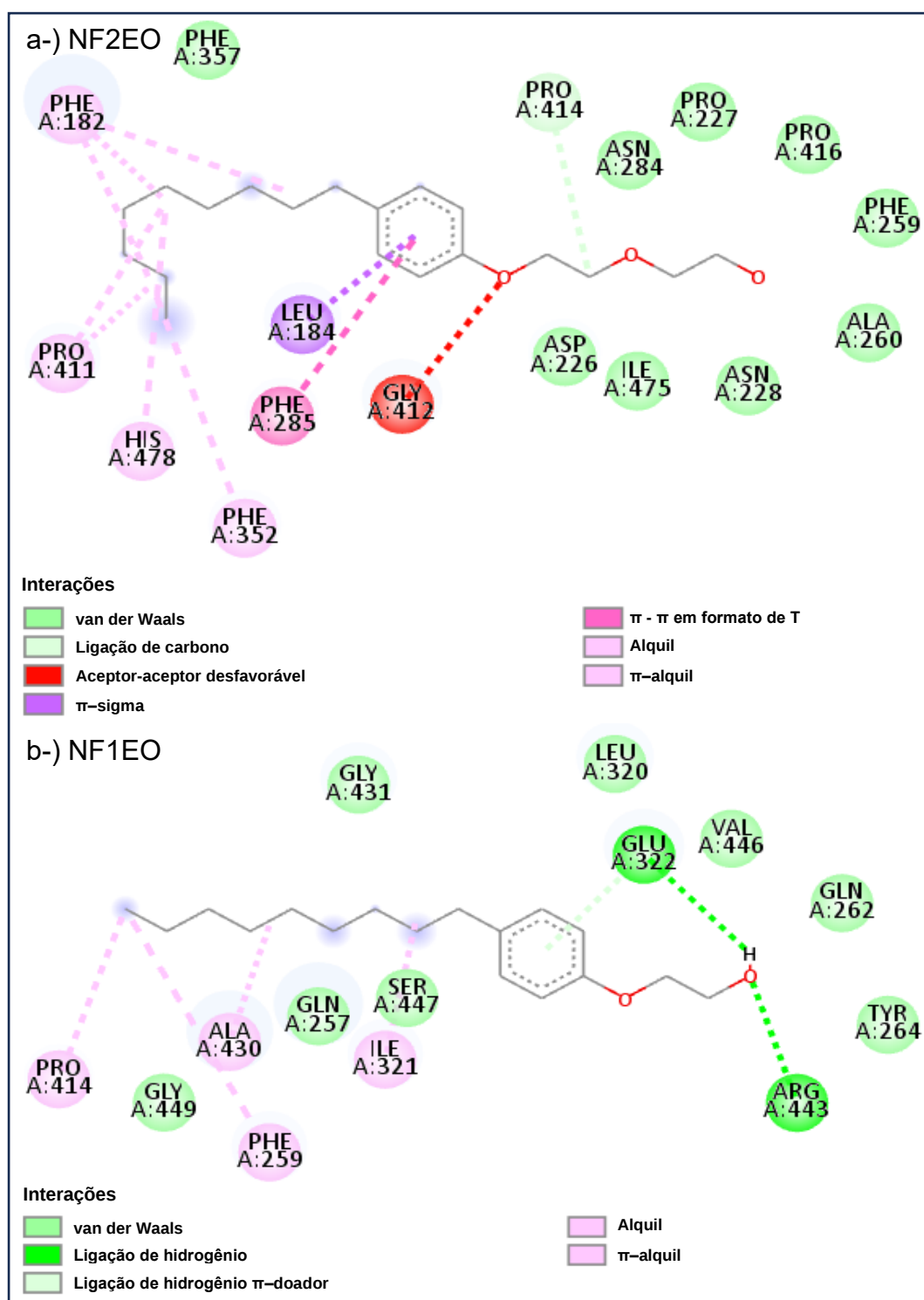


Figura 5.12: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com os compostos NF2EO (a) e NF1EO (b), ocorrentes quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

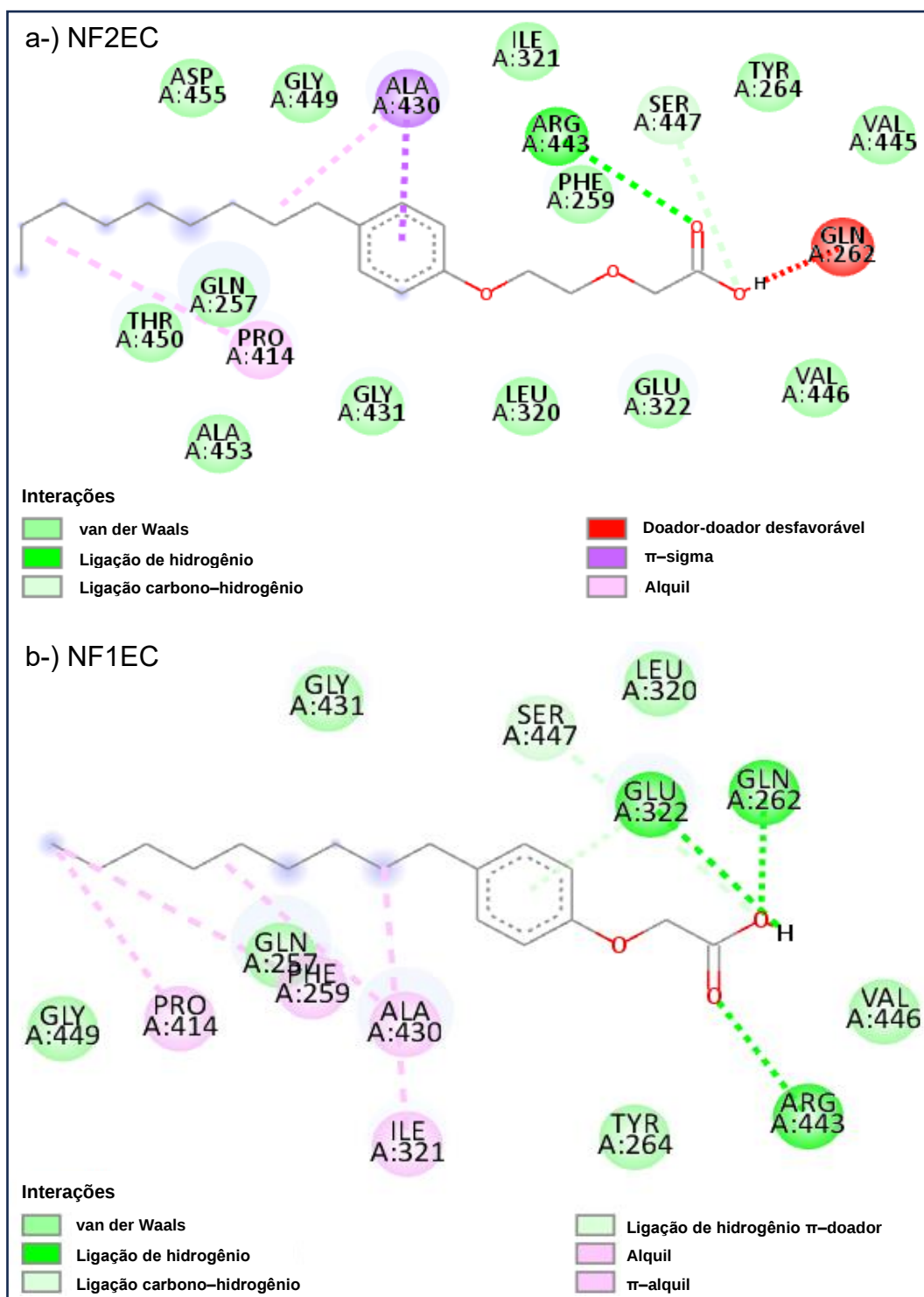


Figura 5.13: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com os compostos NF2EC (a) e NF1EC (b), ocorrentes somente quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condição aeróbia. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

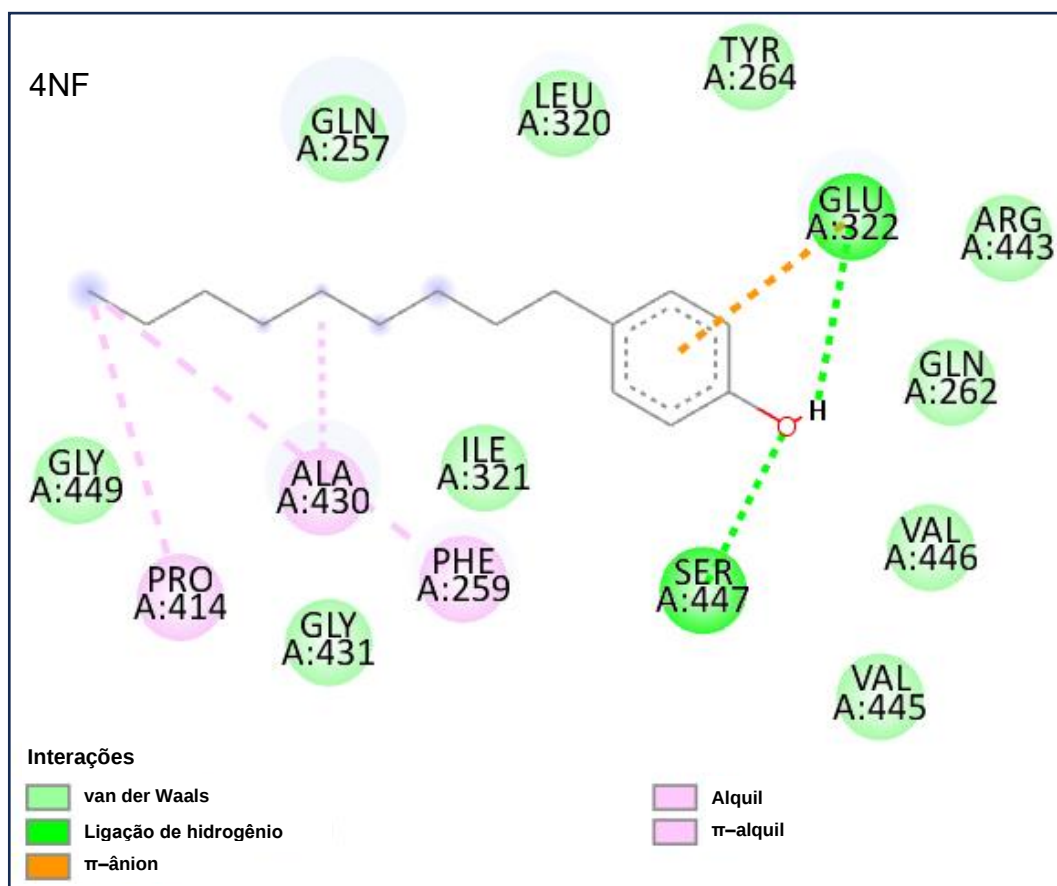


Figura 5.14: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTv com o 4-NF. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

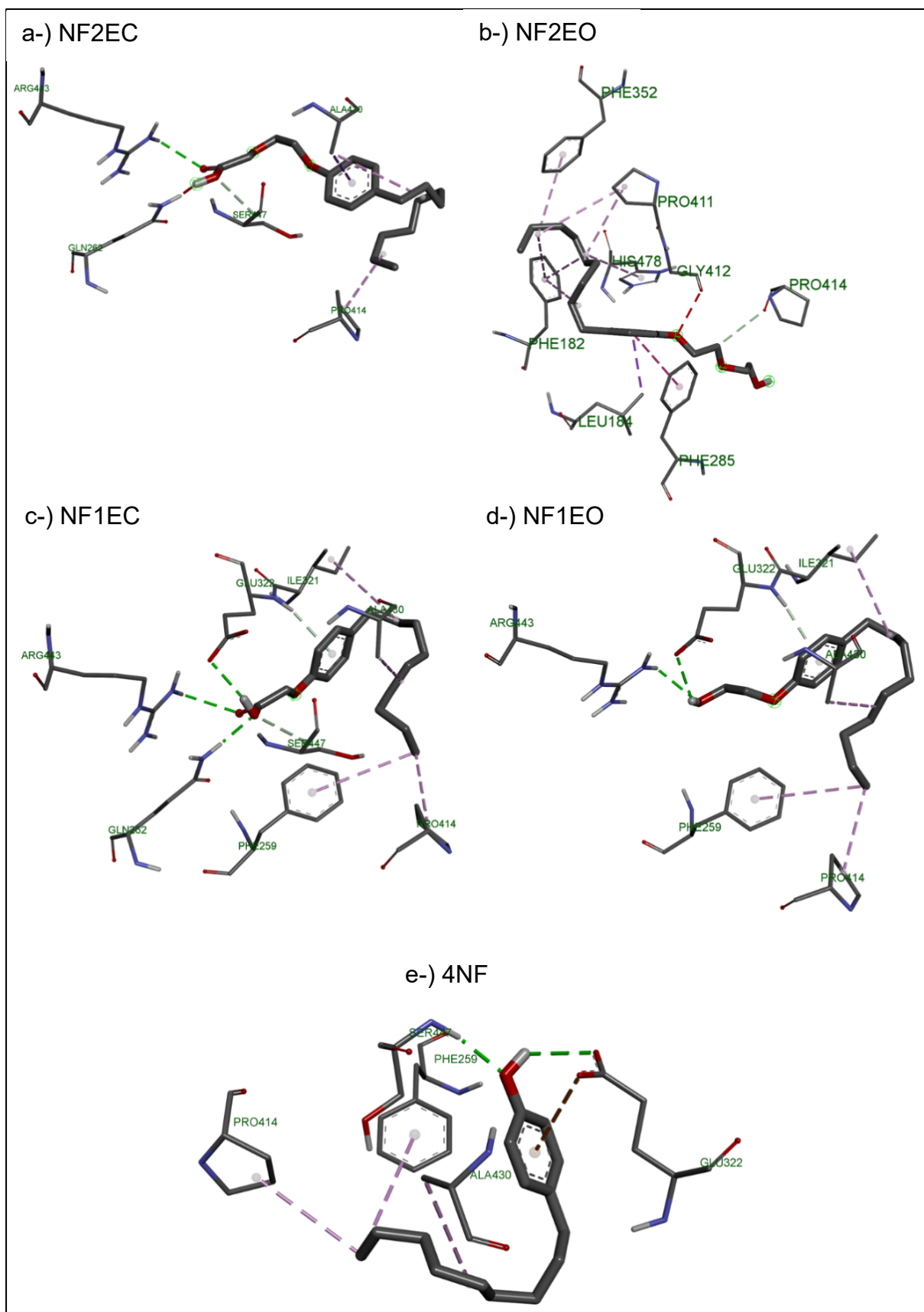


Figura 5.15: Representação 3D dos resíduos centrais de aminoácidos do sítio ativo da LacTv que interagem com os nonilfenóis. O pontilhado verde indica ligações

de hidrogênio (A, C, D e E); o pontilhado cinza representa ligação carbono-hidrogênio (A, B e C), e também ligação π -doador (C e D); os pontilhados rosa claro representam as ligações alquil e π -alquil (A, B, C, D e E) e o pontilhado rosa mais escuro é para uma ligação π - π T-shaped com o anel aromático (B); os pontilhados lilás representam ligações π -sigma (A e B); o pontilhado vermelho destaca ligação doador-doador não favorável (A) e ligação aceitor-aceptor não favorável (B) e em marrom uma ligação π -ânion (E). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

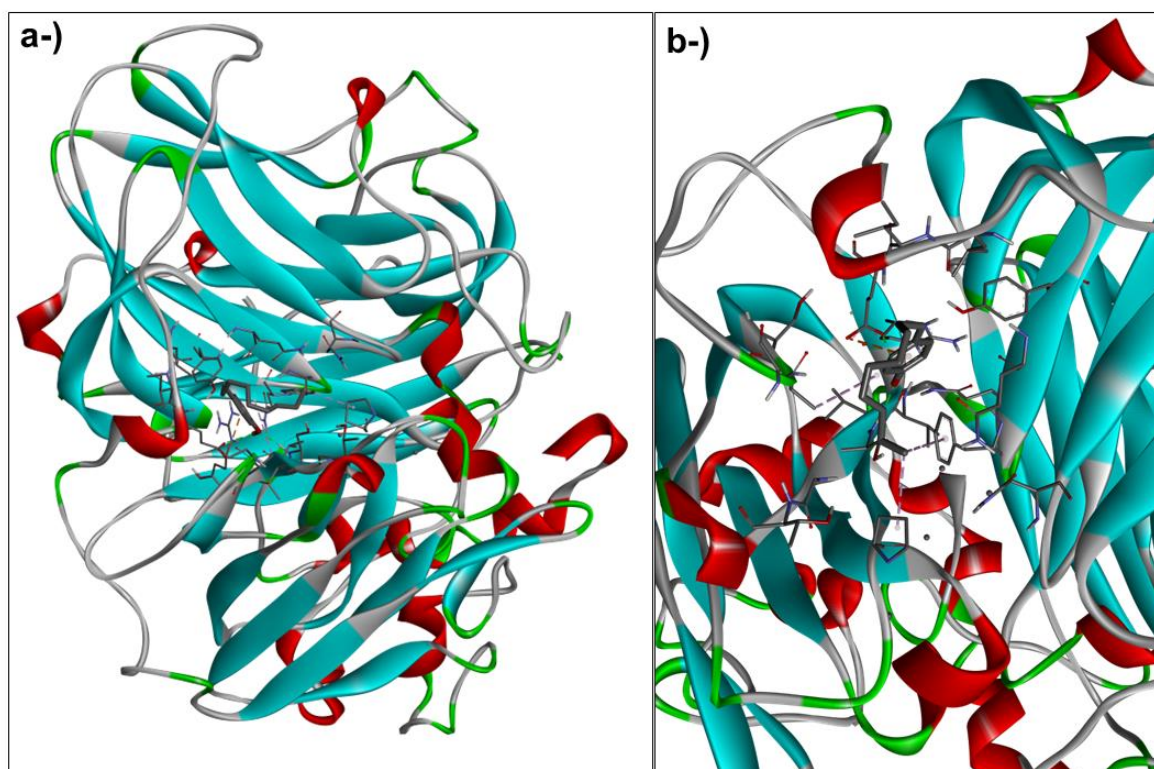


Figura 5.16: Complexo LacTV-4NF. a-) imagem total do complexo. b-) ampliação na região de ligação no sítio ativo. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

5.5.2 Docking LacTI-nonilfenóis

A interação da LacTI com os nonilfenóis se deu por meio de ligações de hidrogênio, ligações de hidrogênio π -doador, ligação doador-doador desfavorável, aceptor-aceptor desfavorável, π - π em formato de T, π -alquil, alquil e interações de van Der Waals (Tabela 5.8). Sendo os resíduos Ala 101, His 132, Phe 102, Leu 133, Pro 367, Leu 478, Thr 424, Gln 461, Phe 90, His 423, His 92 e Phe 90 os aminoácidos centrais na formação dos complexos (Figura 5.20). O complexo LacTI-4NF pode ser visto na Figura 5.21.

Tabela 5.8: Resíduos de aminoácidos do sítio ativo que interagem com os substratos para a formação do complexo LacTI-4NF e intermediários.

Compostos Tipos de ligações	NF2EO	NF1EO	NF2EC	NF1EC	4NF
Ligações de Hidrogênio	Thr 424	-	Thr 424	Thr 424; Gln 461	His 132
Ligações de hidrogênio π-doador	His 423	His 423	His 423	His 423	
Doador-doador desfavorável	-	Thr 424			Ala 101
Aceptor-aceptor desfavorável	Thr 424				
π-π em formato de T	Phe 90	Phe 90	Phe 90; His 423	Phe 90	-
π-alquil	His 92; His 423; Phe 90	His 92	Phe 90; His 92; His 423	His 92	Leu 478; Pro 367; Phe 102
Alquil	-	-	-	-	Pro 367; Ala 101; Leu 133
van der Waals	Asp 122; Gly 422; Met 332; Phe 443; Val 246; Gln 461; Asn 464; Asn 463	Phe 460; Gln 461; Phe 443; Phe 425; Asn 463; Gly 422; Asn 464; Asp 122	Asp 122; Gly 422; Asn 463; Met 332; Phe 443; Val 246; Gln 461; Asn 464	Asp 122; Asn 464; Gly 422; Asn 463; Phe 443; Phe 425; Ala 426; Phe 460	Glu 479; Val 100; Phe 469; Phe 365; Ser 134

Fonte: Própria.

Semelhante à interação observada para o complexo LacTv-4NF discutida anteriormente, os aminoácidos Ala, Glu, Leu, Phe, Pro, Ser e Val se apresentaram coincidentes na formação do complexo lacase-4NF para as duas espécies, contribuindo para a estabilidade do complexo LacTI-4NF por meio de interações doador-doador desfavorável, ligações π -alquil, alquil e interações de van der Waals e evidenciando que o sítio ativo é conservado nas duas lacases (Figura 5.12 e Figura 5.19).

Assim como visto anteriormente na interação do 4NF com a LacTv, aminoácidos do sítio ativo da LacTI também interagem com a cadeia alquílica do 4NF por meio de interações hidrofóbicas do tipo alquil e π -alquil. Os resultados mostram que há interações alquil entre os aminoácidos Phe 102, Leu 133 e Pro 367 com a cadeia alquílica e interações π -alquil entre o anel aromático e os resíduos Pro 367 e Leu 478, o que sugere participação desses três primeiros na oxidação da cadeia alquílica do 4NF e dos resíduos Pro 367 e Leu 478 para degradação do composto final ácido 3,4-Diidroxibenzóico por ataque oxidativo ao anel aromático (Junghanns et al., 2005; Mtibaa et al., 2020).

A presença de aminoácidos de natureza hidrofílica não carregados, carregados e neutros como Gln, His e Thr, respectivamente, no sítio ativo da LacTI assim como a presença de aminoácidos de mesma natureza no sítio ativo da LacTv, contribui para a formação de pontes de hidrogênio e ocorrência de ligação de hidrogênio π -doador. Tendo estes, portanto, importante participação na interação da lacase com os intermediários do 4NF, em que os resíduos Thr 424 e His 423 formam ligação de hidrogênio convencional e ligação de hidrogênio π -doador com o NF2EO e com o NF1EO (Figura 5.17), sendo também observada na interação com a LacTI a presença de ligação de hidrogênio entre os resíduos His 132, Thr 424 e Gln 461 e os ligantes NF2EC, NF1EC e 4NF (Figura 5.18 e Figura 5.19) e ligação de hidrogênio π -doador entre His 423 e os intermediários NF2EC e NF1EC (Figura 5.18). Além disso, a presença de resíduos de His também contribui para a estabilidade dos complexos por meio de interações π - π em formato de T com o NF2EC e π -alquil com NF2EO, NF2EC, NF1EO e NF1EC (Figura 5.17 e Figura 5.18).

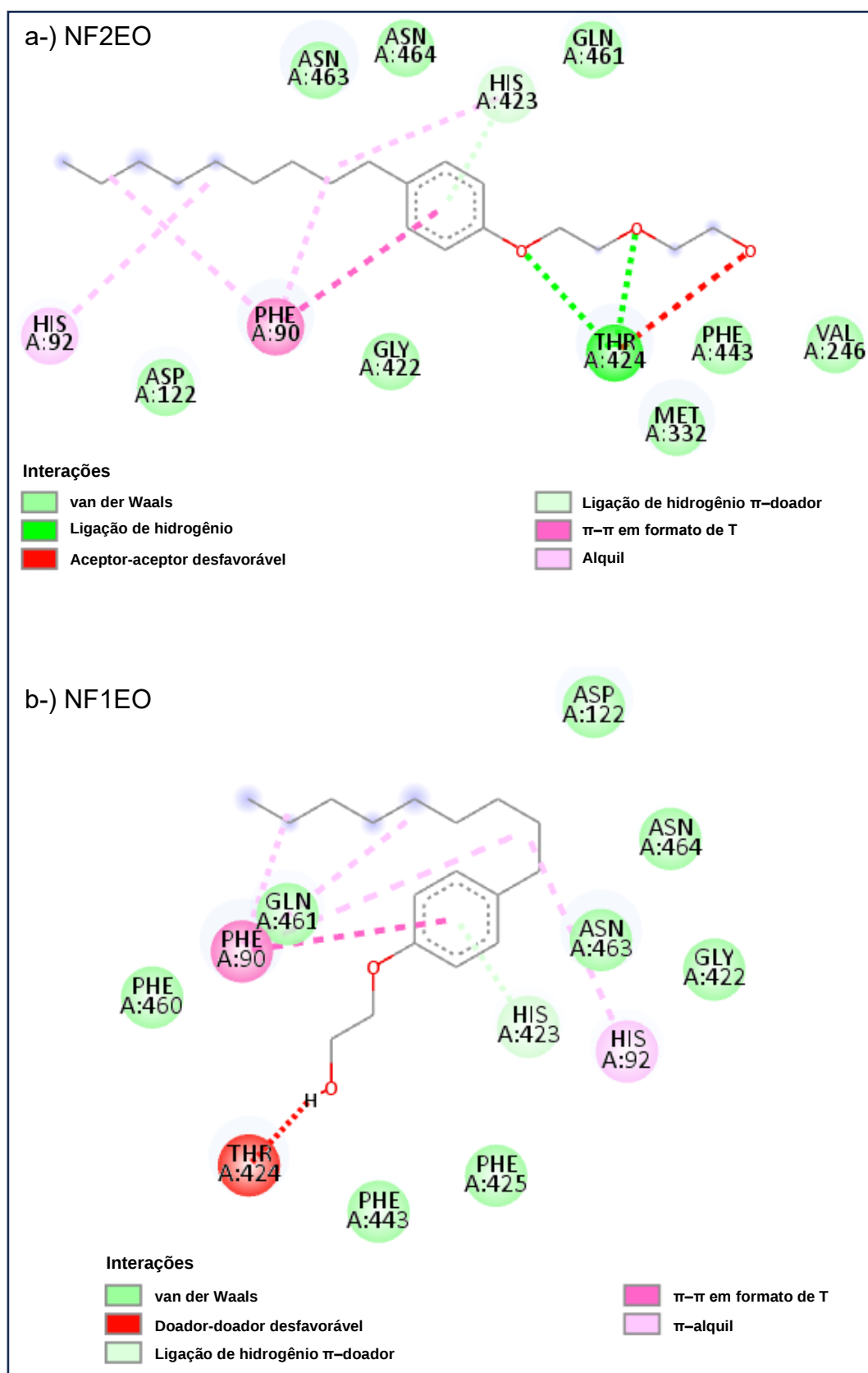


Figura 5.17: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com os compostos NF2EO (a) e NF1EO (b), ocorrentes

quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condições aeróbia e anaeróbia. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

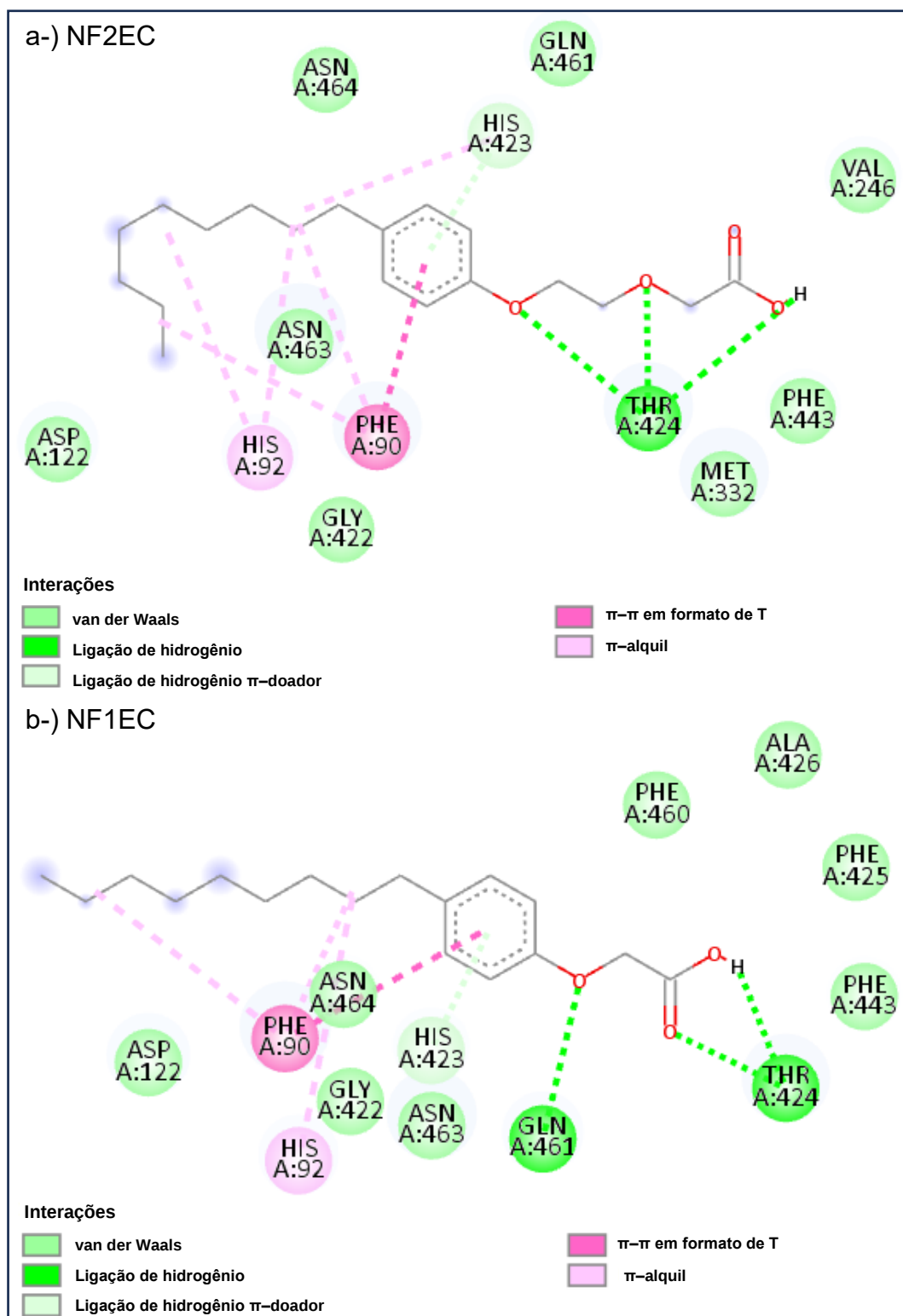


Figura 5.18: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com os compostos NF2EC (a) e NF1EC, ocorrentes

somente quando a degradação do nonilfenol etoxilado acontece em condição aeróbia.

Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

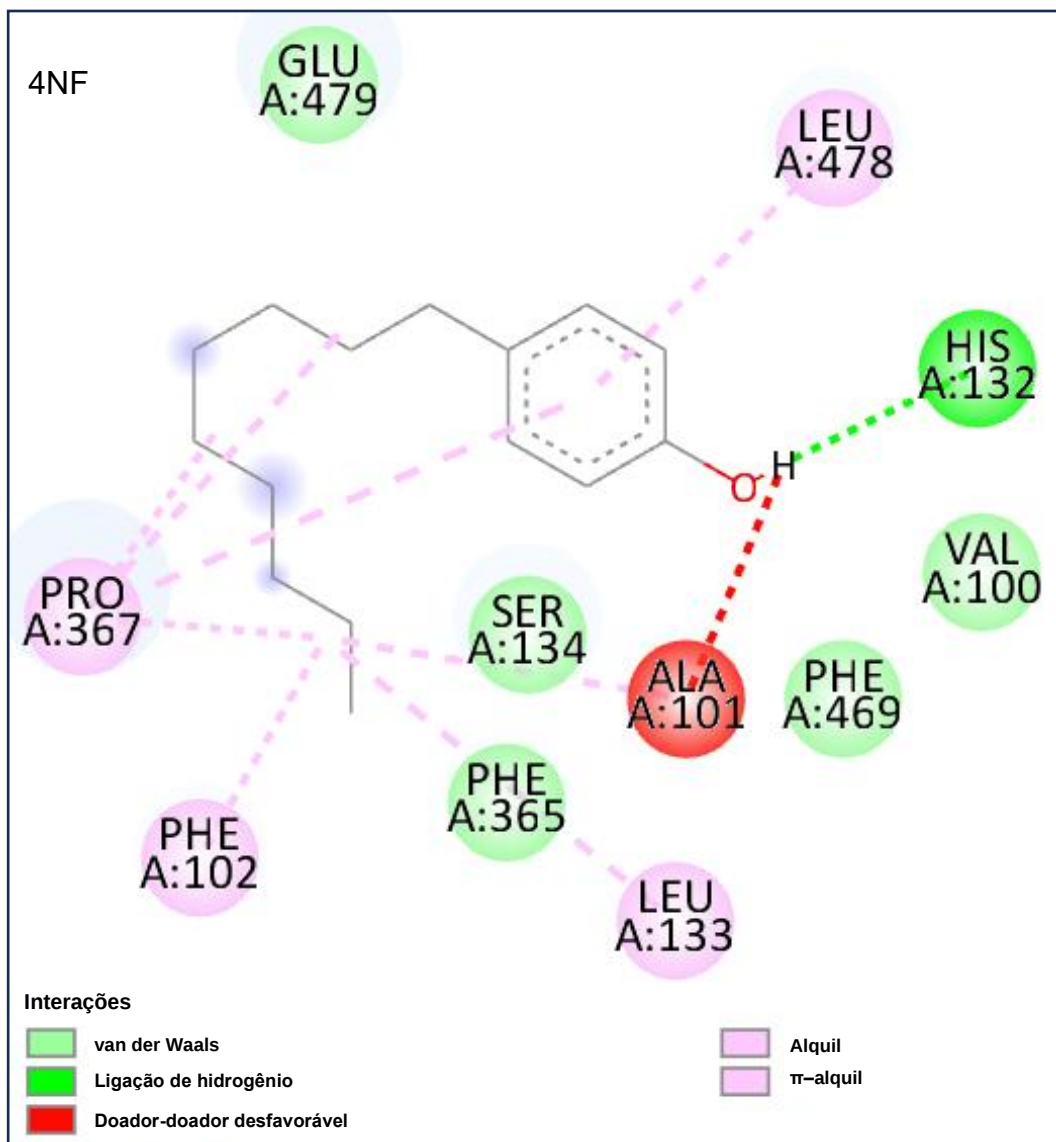


Figura 5.19: Representação 2D das interações dos resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LacTI com o 4-NF. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

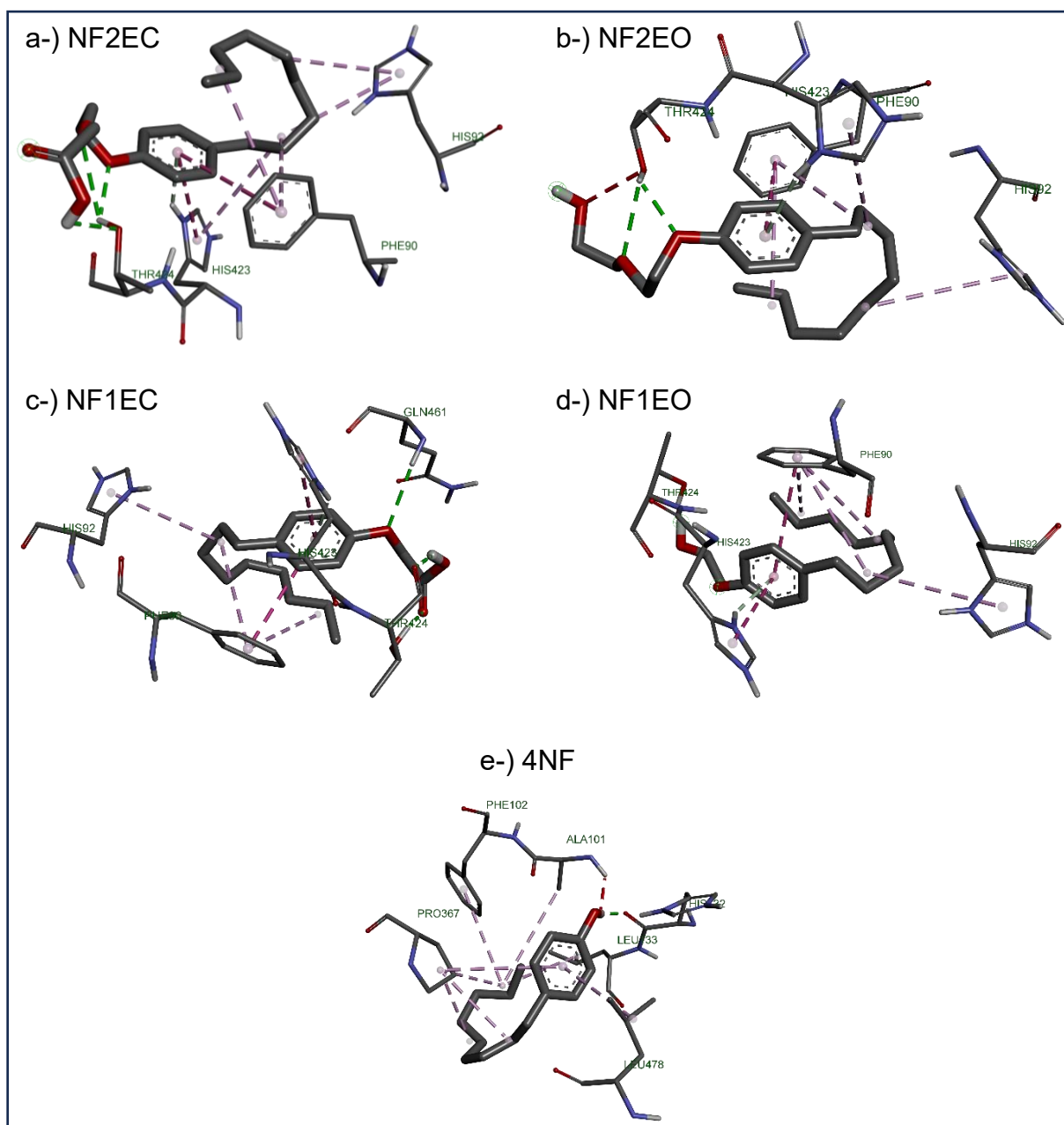


Figura 5.20: Representação 3D dos resíduos centrais de aminoácidos do sítio ativo da LacTI que interagem com os nonilfenóis. O pontilhado verde escuro indica ligações de hidrogênio (A, B, C e E) e verde claro destaca ligações de hidrogênio π -doador (A, B, C e D); em vermelho as interações desfavoráveis doador-doador (D e E) e interação desfavorável aceptor-aceptor (B); em rosa escuro as interações π - π em formato de T (A, B, C e D) e em rosa claro as interações π -alquil (A, B, C, D e E) e alquil (E). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

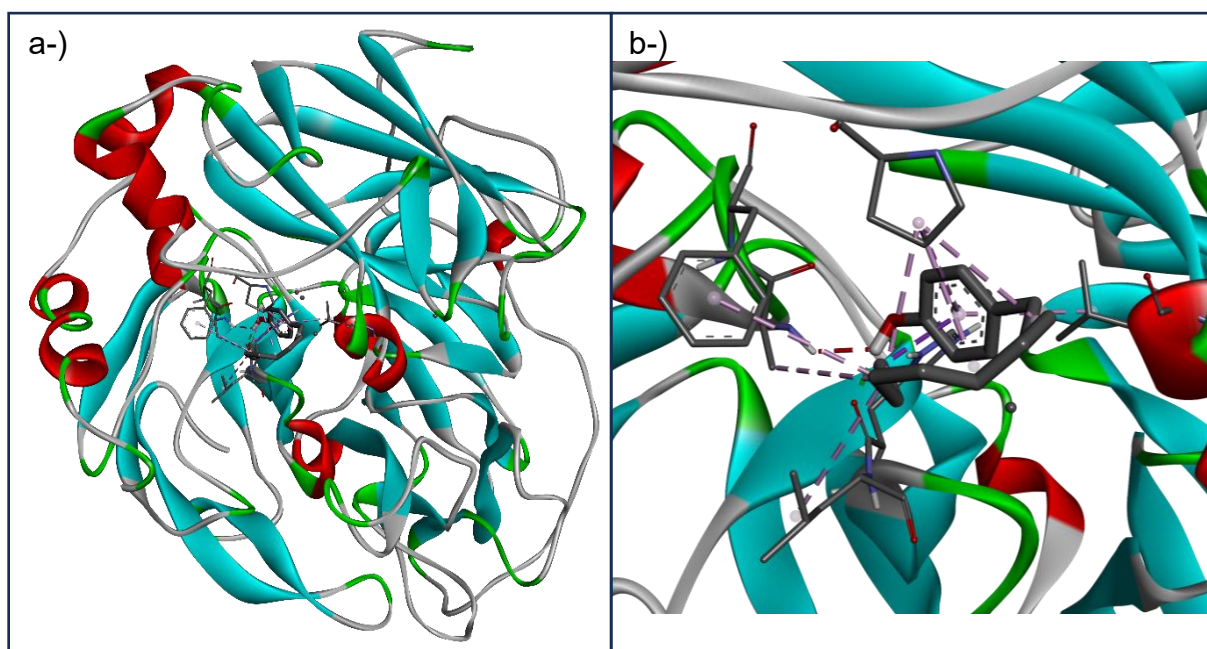


Figura 5.21: Complexo LacTI-4NF. a-) imagem total do complexo. b-) ampliação na região de ligação no sítio ativo. Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

5.5.3 Correlação *docking* e descritores teóricos

A análise dos dados do parâmetro termodinâmico de entalpia (ΔH_f^0) e dos descritores de reatividade calculados a partir das energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO (Figura 5.22) sugere que há uma correlação negativa forte entre o ΔG_{bind} do complexo LacTv e os parâmetros ΔH_f^0 ($r = -0,7099$) e GAP ($r = -0,6719$); correlação moderada negativa para $\Delta G_{\text{bind}} - I$ ($r = -0,5271$), $\Delta G_{\text{bind}} - \chi$ ($r = -0,4788$), $\Delta G_{\text{bind}} - \omega$ ($r = -0,4413$) e $\Delta G_{\text{bind}} - A$ ($r = -0,3863$); e moderada positiva para $\Delta G_{\text{bind}} - E_{\text{HOMO}}$ ($r = 0,5271$), $\Delta G_{\text{bind}} - \mu$ ($r = 0,4788$), $\Delta G_{\text{bind}} - N$ ($r = 0,4337$) e $\Delta G_{\text{bind}} - E_{\text{LUMO}}$ ($r = 0,3863$).

Para as correlações do ΔG_{bind} do complexo LacTI com os parâmetros analisados, houve forte correlação negativa com o GAP ($r = -0,7198$), entre $\Delta G_{\text{bind}} - I$ ($r = -0,6373$) e $\Delta G_{\text{bind}} - \chi$ ($r = -0,6071$); forte correlação positiva entre $\Delta G_{\text{bind}} - E_{\text{LUMO}}$ ($r = 0,6373$) e $\Delta G_{\text{bind}} - \mu$ ($r = 0,6071$); correlação moderada negativa entre $\Delta G_{\text{bind}} - \omega$ ($r = -0,5806$), $\Delta G_{\text{bind}} - A$ ($r = -0,5463$) e $\Delta G_{\text{bind}} - \Delta H_f^0$ ($r = -0,4800$); e correlação moderada positiva entre $\Delta G_{\text{bind}} - N$ ($r = 0,5880$) e $\Delta G_{\text{bind}} - E_{\text{LUMO}}$ ($r = 0,5463$).

Esse resultado sugere que a energia do GAP influencia fortemente a afinidade do 4NF pela lacase das duas espécies indicando que quanto maior o GAP menor será a energia de ligação, ou seja, maior a estabilidade do complexo, isso acontece por

que a quantidade de energia disponível para realização de trabalho cinético também será menor (Hongyan et al., 2019; Wang; Lai; Wang, 2002). Essa correlação pode se dar principalmente porque as energias desses orbitais estão relacionadas com a força de atração do par de elétrons que pode ser doado (alta energia do HOMO) e com a capacidade de receber elétrons (baixa energia de LUMO) (Marinho; Castro; Marinho, 2016; Oliveira, 2015).

As diferentes interações dos nonilfenóis com a LacTv e LacTl discutidas anteriormente indicam que a complexação lacase-nonilfenóis é espontânea, os resultados das correlações indicam que essa afinidade pode ser explicada principalmente pelos descritores teórico de dureza refletido pelo alto valor de GAP, bem como pelo potencial de ionização e pela eletronegatividade que experimentalmente podem ser modificados por alterações do pH do meio a fim de diminuir mais ainda o ΔG_{bind} para aumentar a estabilidade do complexo, uma vez que, demonstram forte correlação negativa com o ΔG_{bind} LacTl e são também as duas maiores correlações dentre os parâmetros que apresentaram correlação moderada negativa com o ΔG_{bind} da LacTv, demonstrando que quanto maior a eletronegatividade e o potencial químico, menor será a energia livre de ligação.

Os resultados mostrados pelo *docking*, são indícios para que experimentalmente a interação da lacase com os nonilfenóis apresente valores de Km, Vmax e da taxa de depleção de oxigênio favoráveis à catálise da degradação desses compostos como demonstrados experimentalmente para outros desreguladores endócrinos fenólicos (Daâssi et al., 2016; Hongyan et al., 2019; Kimura et al., 2016; Nicolucci et al., 2011).

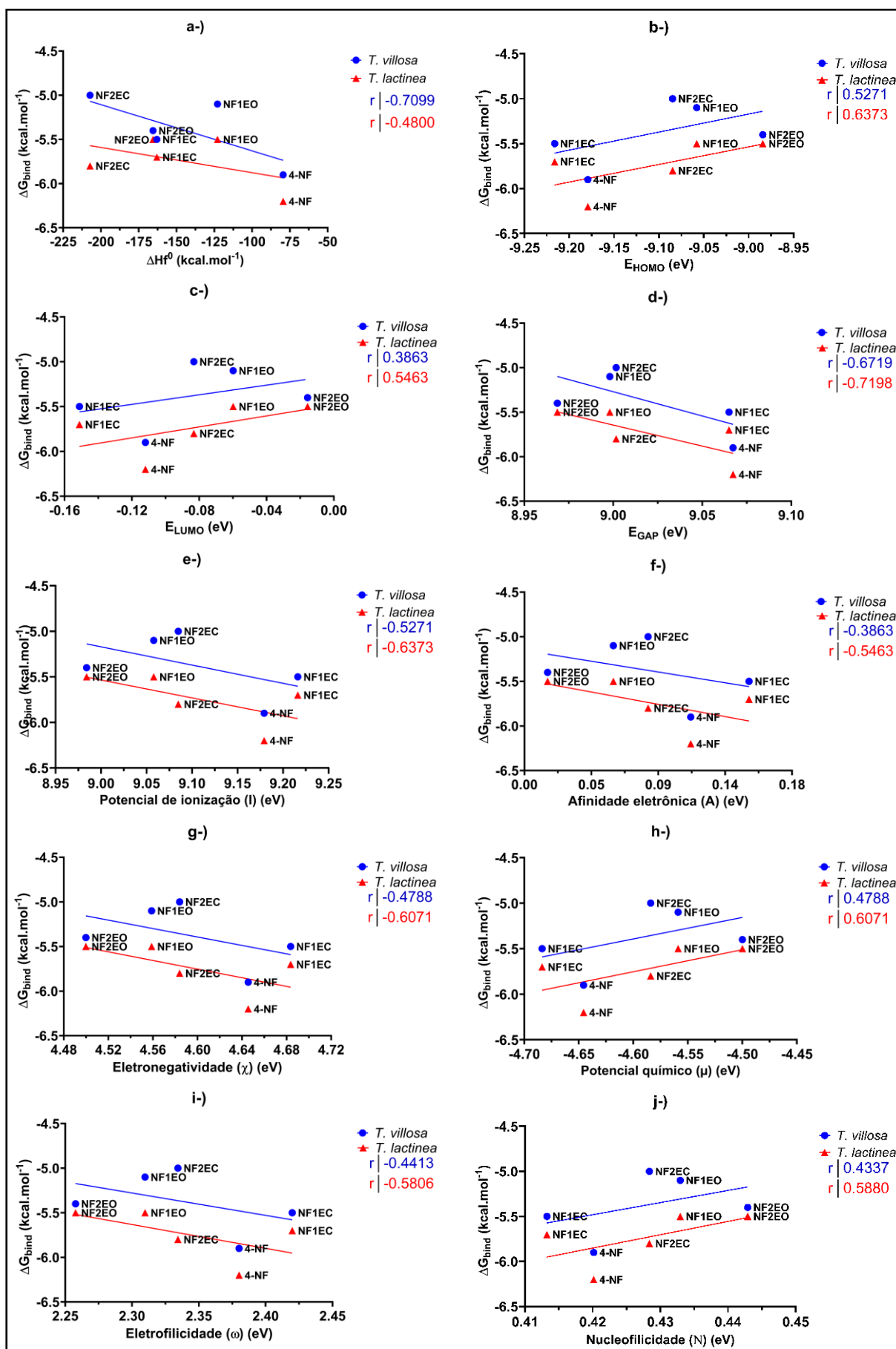


Figura 5.22: Coeficiente de correlação de Pearson (r de Pearson) entre a

energia livre de complexação (ΔG_{bind}) do 4Nf e intermediários com a lacase de *T. villosa* e *T. lactinea* e o parâmetro termodinâmico de entalpia (ΔH^0) (a) e entre o ΔG_{bind} e os descritores teóricos de reatividade E_{HOMO} (b), E_{LUMO} (c), E_{GAP} (d), potencial de ionização (e), afinidade eletrônica (f), eletronegatividade (g), potencial químico (h), eletrofilicidade (i) e nucleofilicidade (j). Fonte: Própria.

5.6 Dinâmica molecular

A temperatura média do sistema no equilíbrio foi de 299,952 e 299,954 K (aproximadamente 26.8 °C para ambos os sistemas) durante a simulação da interação do complexo LacTv-4NF e LacTI-4NF, respectivamente (Figura 5.23 a e Figura 5.24 a). A pressão média do sistema no equilíbrio se manteve próxima a 1,2 bar nos dois sistemas (Figura 5.23 b e Figura 5.24 b). A densidade média foi de 1052,250 e 1052,090 (kg/m³) para os sistemas LacTv-4NF e LacTI-4NF, respectivamente (Figura 5.23 c e Figura 5.24 c).

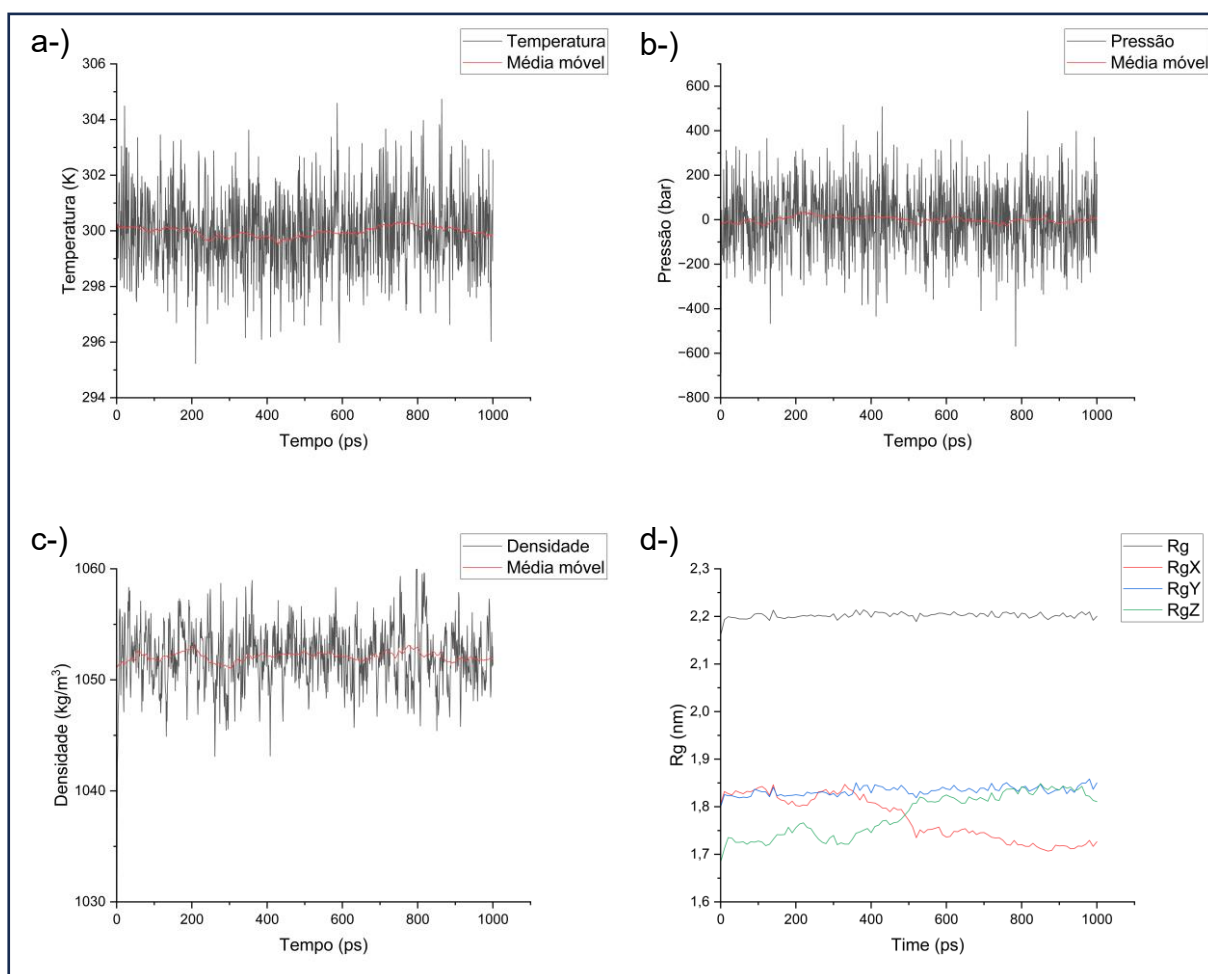


Figura 5.23: Gráficos da simulação para o complexo LacTv-4NF. a-) Variação da temperatura do sistema durante a simulação. b-) Variação da pressão do sistema

durante a simulação. c-) Variação da densidade do sistema durante a simulação. d-) Raio de giro da LacTv em torno do próprio eixo e dos eixos X, Y e Z. Fonte: Própria.

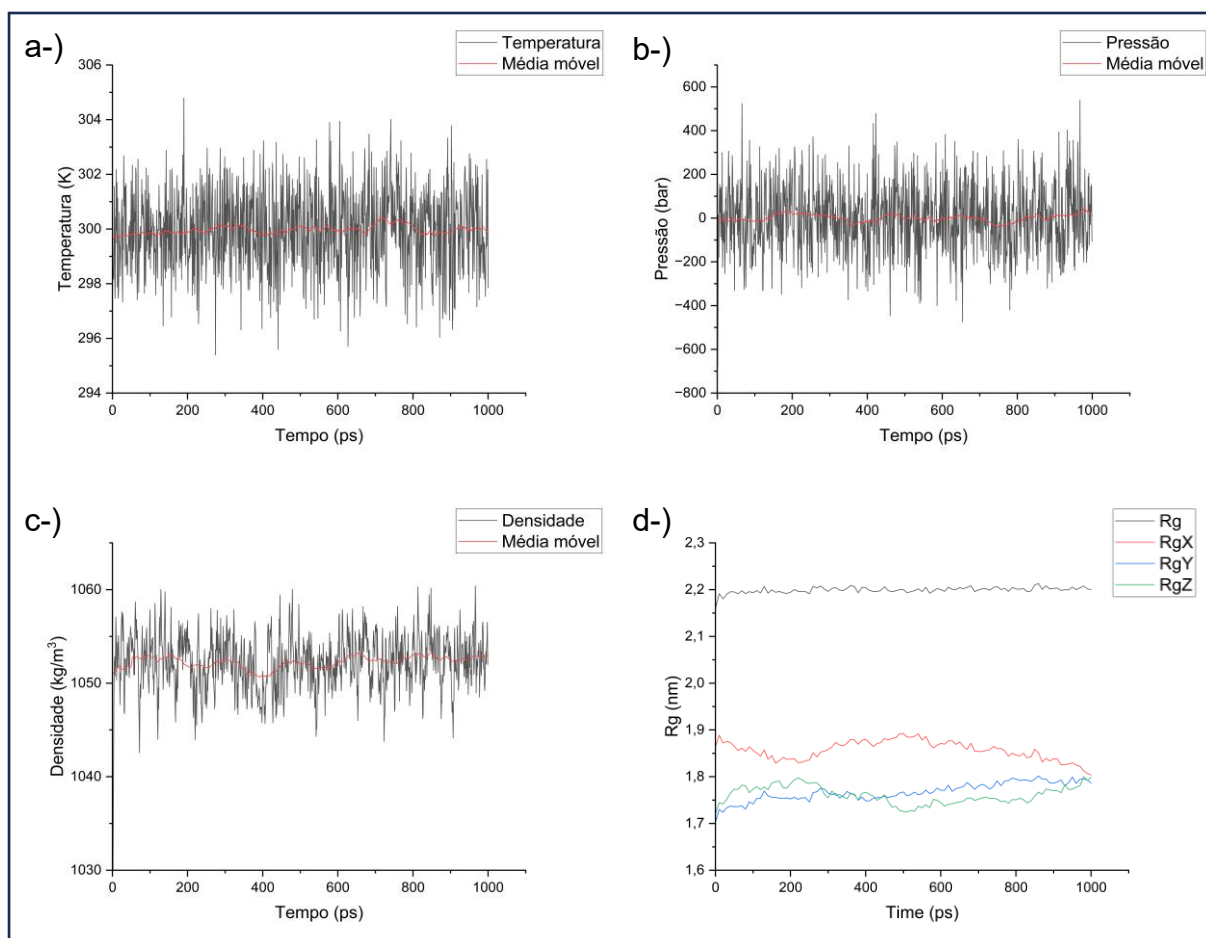


Figura 5.24: Gráficos da simulação para o complexo LacTI-4NF. a-) Variação da temperatura do sistema durante a simulação. b-) Variação da pressão do sistema durante a simulação. c-) Variação da densidade do sistema durante a simulação. d-) Raio de giro da LacTI em torno do próprio eixo e dos eixos X, Y e Z. Fonte: Própria.

A análise do Rg (raio de giro) foi realizada a fim de observar o nível de estabilidade e compactação da proteína complexada durante o tempo de simulação. Os valores de Rg tanto para a LacTv quanto para a LacTI em torno do seu próprio eixo manteve uma constância próxima a 2,2 nm, o que evidencia que as duas enzimas se mantiveram bastante estáveis estruturalmente, sem muita variação durante a dinâmica, uma vez que, quanto menor o desvio da posição inicial provocado pelas interações estabelecidas para o complexo receptor-ligante mais forte a evidência de estabilidade da proteína e de que não há uma tendência de desnaturação da mesma

na presença do contaminante (Figura 5.23 d e Figura 5.24 d) (Arooj et al., 2020; Xue et al., 2023).

Os picos de RMSD dos complexos foram inferiores a 0,1581 nm para LacTV-4NF com RMSD médio de 0,13 nm e inferiores a 0,1679 nm para LacTI-4NF com RMSD médio de 0,15 nm (Figura 5.25 a), demonstrando que a complexação da lacase com o 4NF não afeta sua estabilidade, visto que, valores baixos de RMSD indicam poucas mudanças estruturais da proteína durante a dinâmica em relação à posição inicial (Karunakaran; Muniyan, 2023).

O RMSF é semelhante ao RMSD, no entanto, calcula o desvio para cada resíduo durante a simulação e analisa a diferença na flexibilidade dos resíduos em relação à posição inicial da dinâmica (Kumar et al., 2014). A maior flutuação para os resíduos de aminoácidos foi de 0,2131, 0,2119 e 0,2070 nm para os resíduos Asn 288, Asp 517 e Gln 384 na LacTI e de 0,1954, 0,1943 e 0,1888 nm para os resíduos Arg 156, Hsd 397 e Val 288 na LacTv (Figura 5.25 b). Esse resultado indica uma baixa flutuação e é mais uma evidência de que o sistema está em equilíbrio e de que a complexação da lacase ao 4NF e a flexibilidade dos resíduos não prejudica a estabilidade dos complexos, sugerindo, portanto, que não houve mudanças estruturais significativas que pudessem afetar a interação do complexo durante a simulação (Sharma; Panwar; Sharma, 2020).

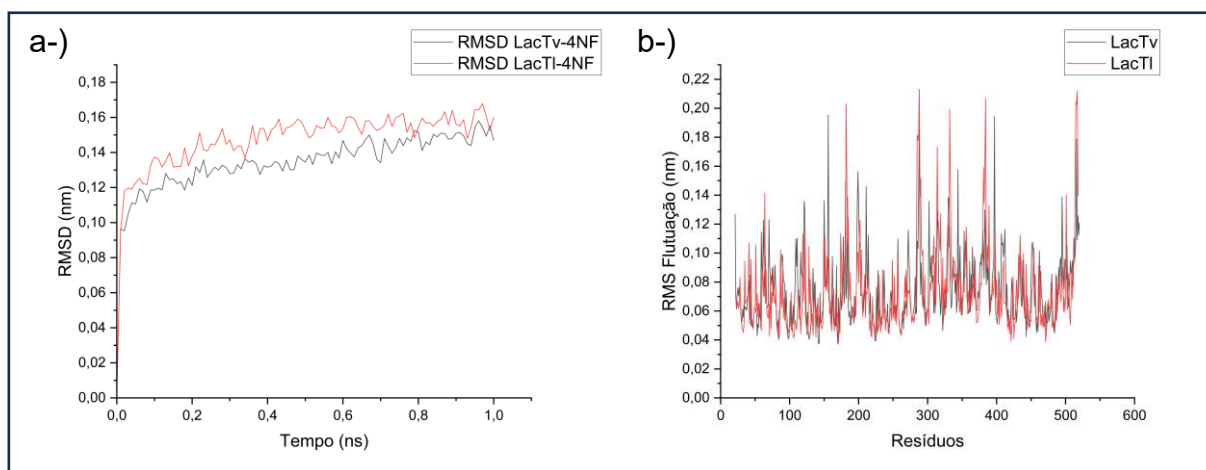


Figura 5.25: RMSD dos complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF (a) e Raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF) da posição atômica por resíduo de aminoácido (b). Fonte: Própria.

A contribuição das energias de interação de van der Waals/hidrofóbica (LJ-SR) para a estabilidade do complexo lacase-4NF foi maior do que a contribuição por energias eletrostáticas de interação (Coul-SR) como ligações de hidrogênio, com energias de LJ-SR de -100,7920 e -104,1550 KJ.mol⁻¹ e Coul-SR de -80,2382 e -34,0181 KJ.mol⁻¹, somando uma energia de interação total de -181,0302 e -138,1731 KJ.mol⁻¹ para os complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF, respectivamente (Tabela 5.9 e Tabela 5.10 e Figura 5.26 a e b). A maior contribuição apresentada por interações hidrofóbicas pode ser explicada pelo aumento da hidrofobicidade dos produtos do nonilfenol etoxilado à medida que este é degradado (He et al., 2020; Ichale; Kanhed; Vora, 2023; Scott; Jones, 2000).

Tabela 5.9: Energias de interação do complexo LacTv-4NF.

Energia	Média (KJ.mol⁻¹)	Err. Est. (KJ.mol⁻¹)
Coul-SR:LacTv-4NF	-80,2382	0,79
LJ-SR:LacTv-4NF	-100,7920	2,5
Total	-181,0302	

Fonte: Própria.

Tabela 5.10: Energias de interação do complexo LacTI-4NF.

Energia	Média (KJ.mol⁻¹)	Err. Est. (KJ.mol⁻¹)
Coul-SR:LacTI-4NF	-34,0181	1,6
LJ-SR:LacTI-4NF	-104,1550	3,3
Total	-138,1731	

Fonte: Própria.

Como mostra a Figura 5.26 c e d, o número de ligações de hidrogênio entre a lacase durante a dinâmica varia de 1 a 5 para a LacTv e de 0 a 3 para a LacTI no início da simulação até atingir uma constância de 0 a 2 ligações de hidrogênio após decorridos 10 ps. Apesar de a contribuição das interações eletrostáticas, como as ligações de hidrogênio, ter sido menor do que a contribuição de interações hidrofóbicas para a estabilidade dos complexos como mostra o cálculo das energias de interação (Figura 5.26 a e b), a possibilidade de ocorrência de ligações de hidrogênio é fundamental para que a atividade catalítica da lacase aconteça, visto que as ligações de hidrogênio tendem a ser lineares, tendo, portanto, forte capacidade de minimizar a repulsão entre as cargas parciais negativas dos átomos eletronegativos

participantes, além de serem fundamentais para manter a estabilidade estrutural da proteína (BARREIRO et al., 2015; Guimarães, 2012).

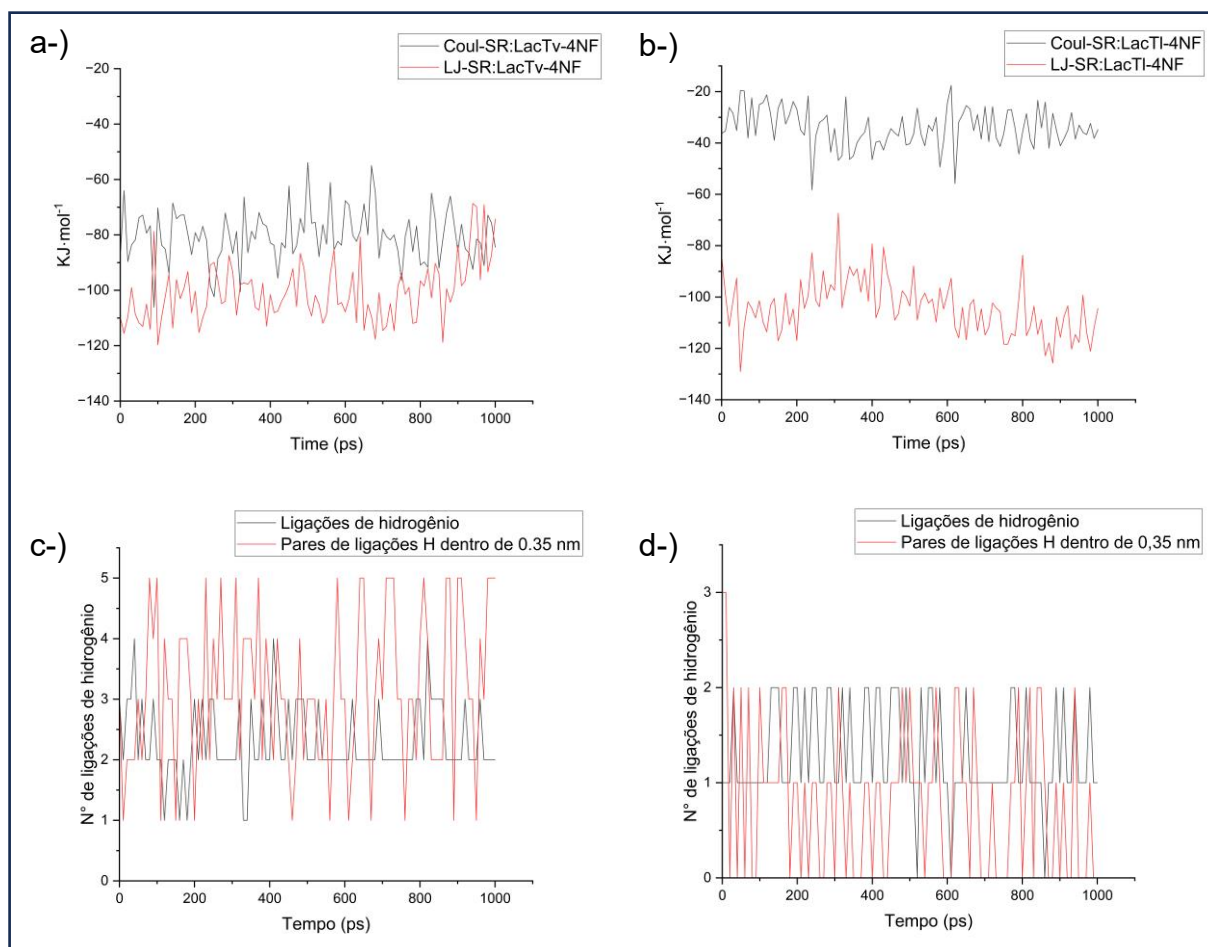


Figura 5.26: Energias eletrostáticas de interação (Coul-SR) e energias de interação van der Waals/hidrofóbica (LJ-SR) entre a LacTv e 4NF (a) e a LacTI e 4NF (b); número de ligações de hidrogênio durante a simulação entre a LacTv e 4NF (c) e a LacTI e 4NF(d). Fonte: Própria.

A área de superfície acessível ao solvente (SASA, do inglês *Solvent Accessible Surface Area*) calcula a área da proteína que interage com as moléculas do solvente e o aumento considerável desse valor durante a dinâmica representa alterações na proteína, como a desnaturação ou mudanças conformacionais induzidas por alguma interação ou por aumento da temperatura (Mazola et al., 2015; Xue et al., 2023). Os resultados obtidos para a SASA da LacTv e LacTI apresentaram semelhança, com médias de $189,356 \pm 2.578$ e $188,008 \pm 2,303$ nm², respectivamente. A variação foi pequena, com SASA significativamente estável, entre 176,282 nm² da posição inicial à uma área máxima de 195,037 nm² durante a dinâmica da LacTv e entre 177,353 e

193,883 nm² durante a dinâmica da LacTI, com coeficientes de variação de 1,36 e 1,22%, respectivamente (Figura 5.27). O que sugere que não ocorre mudanças estruturais significativas na proteína, sendo, portanto, a lacase dessas duas espécies candidatos potenciais para a catálise da degradação do 4NF em termos de biorremediação (Bhatt et al., 2021).

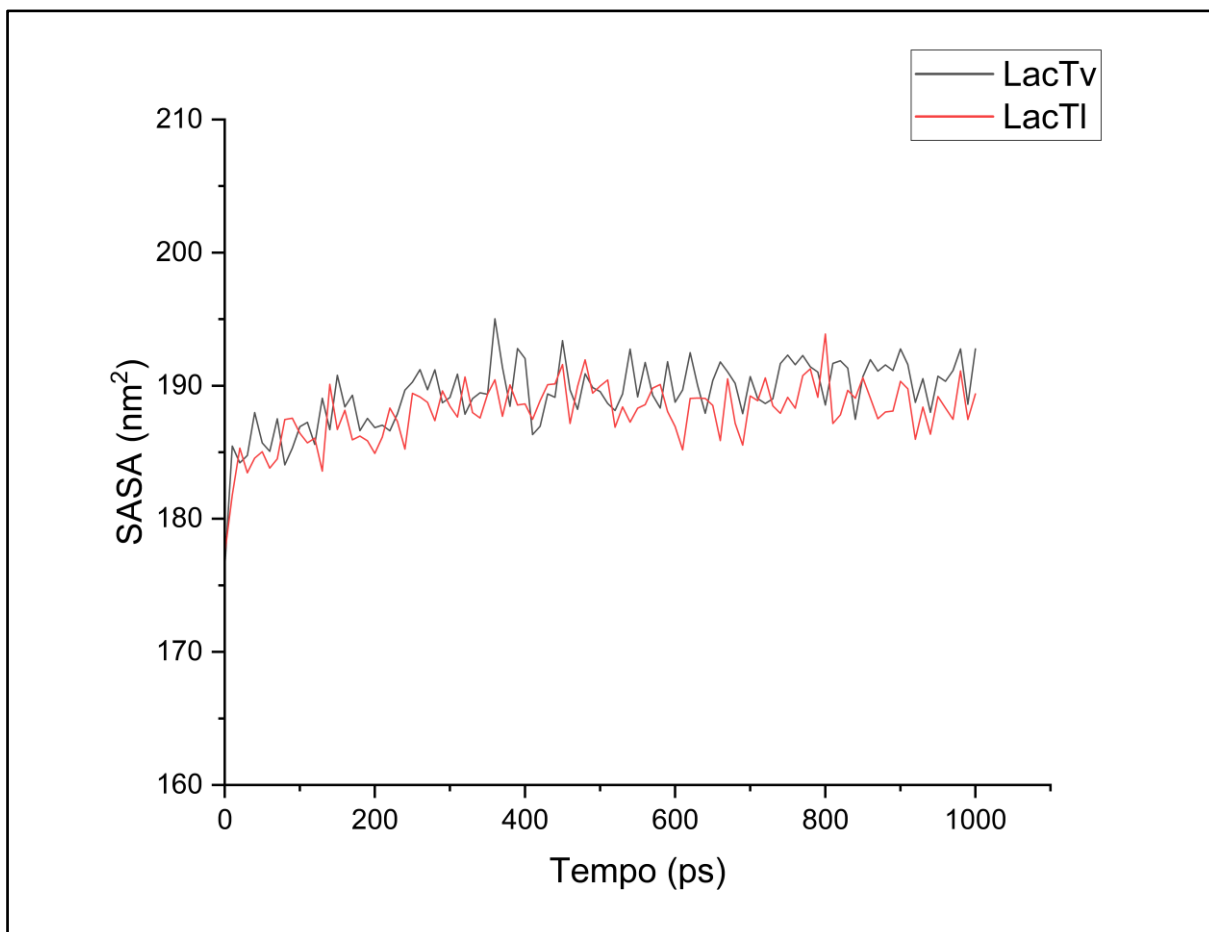


Figura 5.27: Área de superfície acessível ao solvente (SASA) para a LacTv e LacTI durante o tempo de simulação da dinâmica.

Embora os resultados observados nas simulações de *docking* tenham demonstrado boa afinidade entre a lacase e os nonilfenóis com valores de ΔG_{bind} negativos, é necessário que o ligante se mantenha acoplado à enzima por tempo suficiente para que a degradação ocorra, por isso é importante analisar a interação do complexo formado ao longo da trajetória da dinâmica molecular. Então, foram extraídos *frames* das conformações e das interações dos complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF nos tempos 0, 200, 400, 600 800 e 1000 ps (Figura 5.28, Figura 5.29, Figura 5.30 e Figura 5.31) e constatou-se que as interações são estáveis para os dois complexos variando principalmente na quantidade de interações hidrofóbicas

envolvendo os resíduos Phe 259, Ile 321, Pro 414 e Ala 430 na interação com a LacTv e os resíduos Leu 478, Pro 367, Leu 133, Leu 79, Phe 365 e Phe 469 na interação com a LacTI.

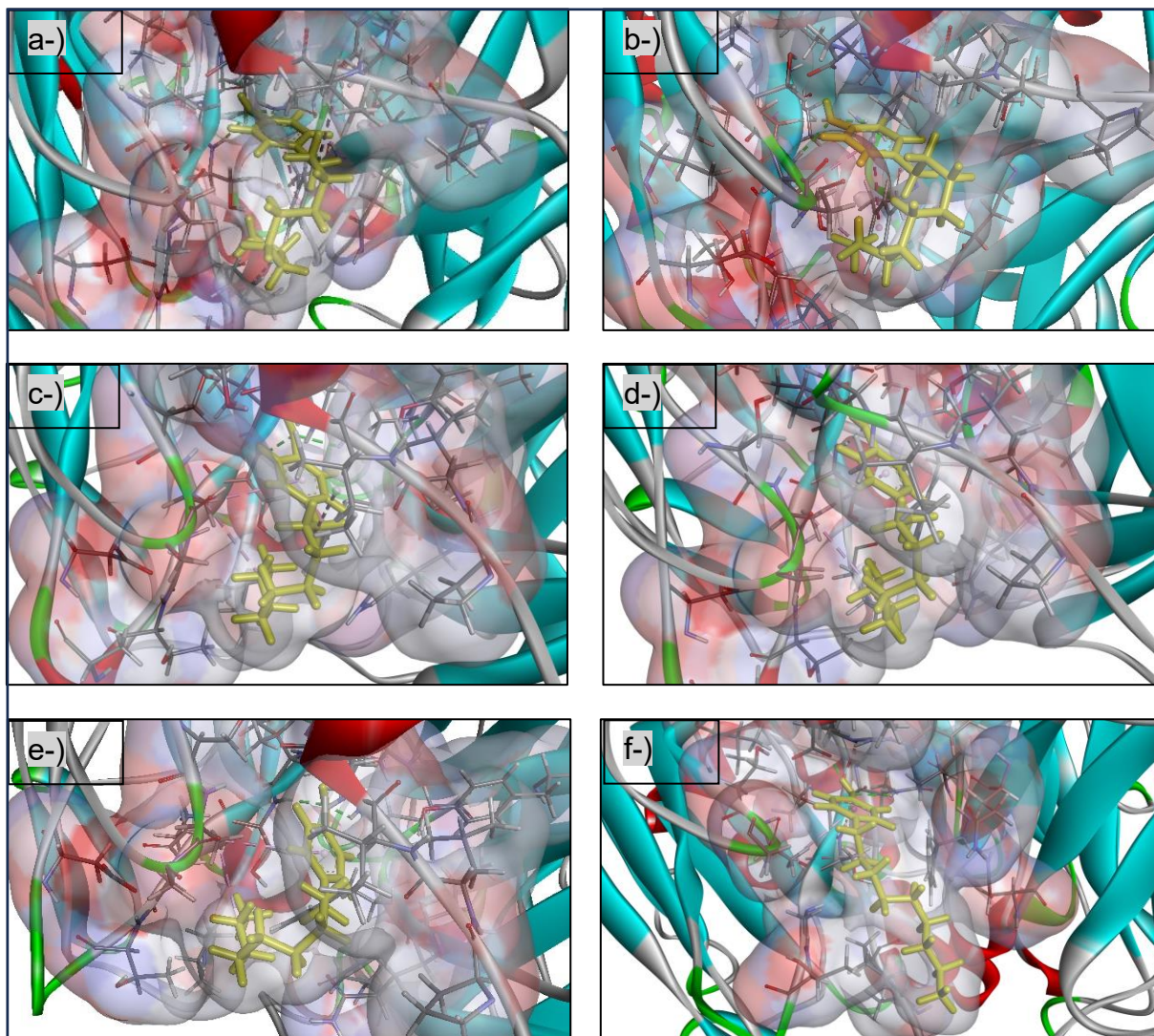


Figura 5.28: Frames da mudança conformacional do complexo LacTv-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

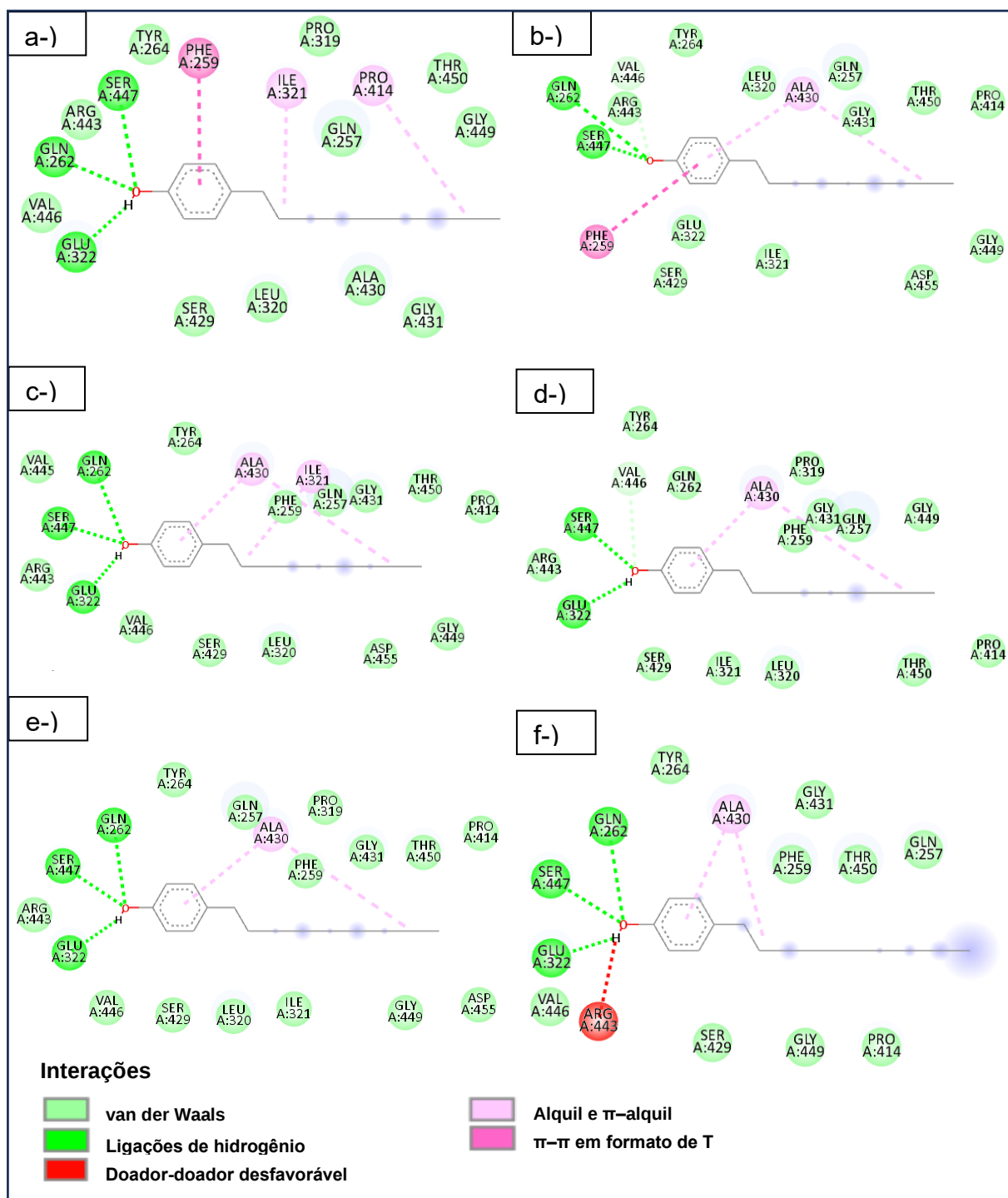


Figura 5.29: Interações do complexo LacTv-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

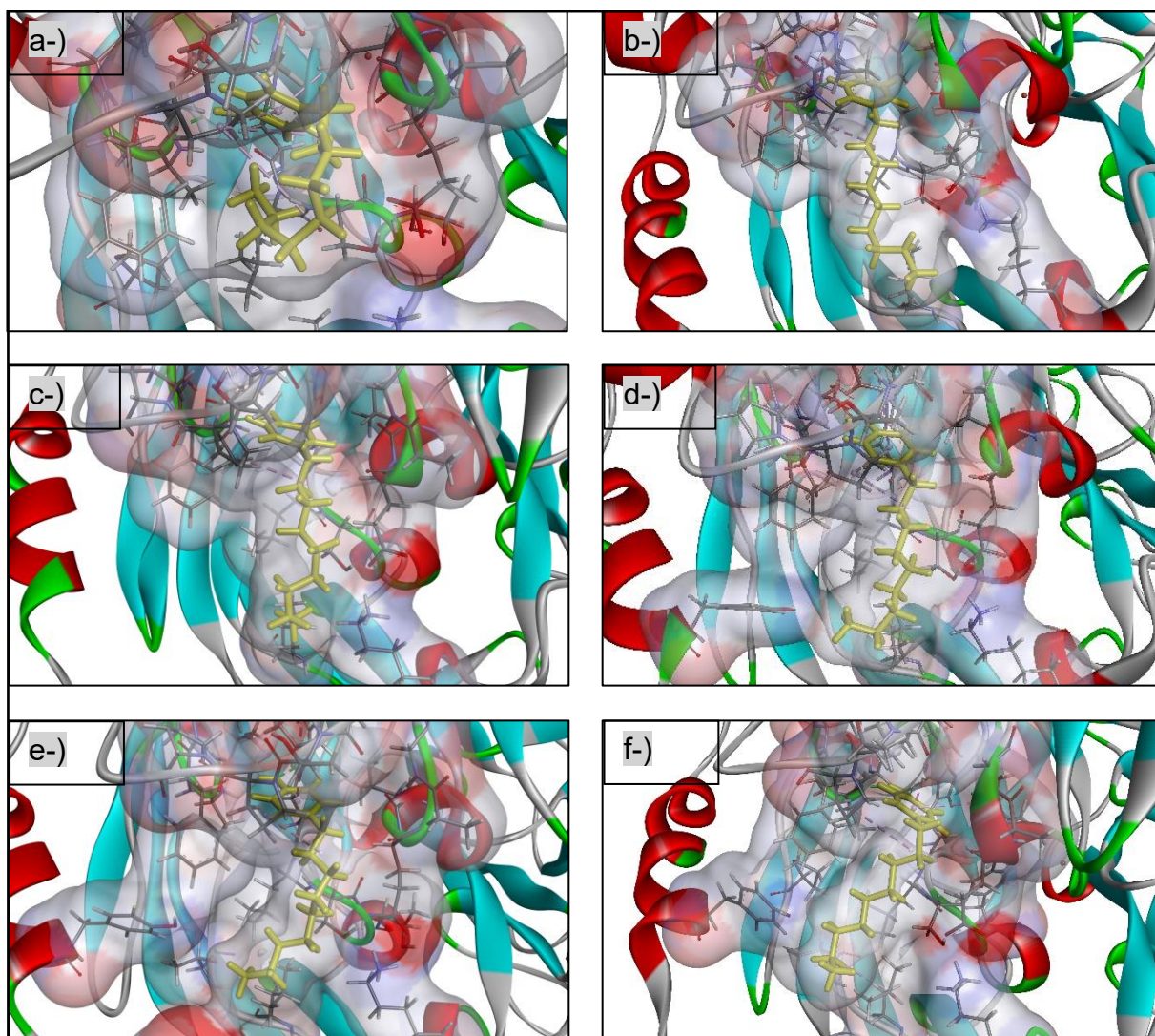


Figura 5.30: Frames da mudança conformacional do complexo LacTI-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

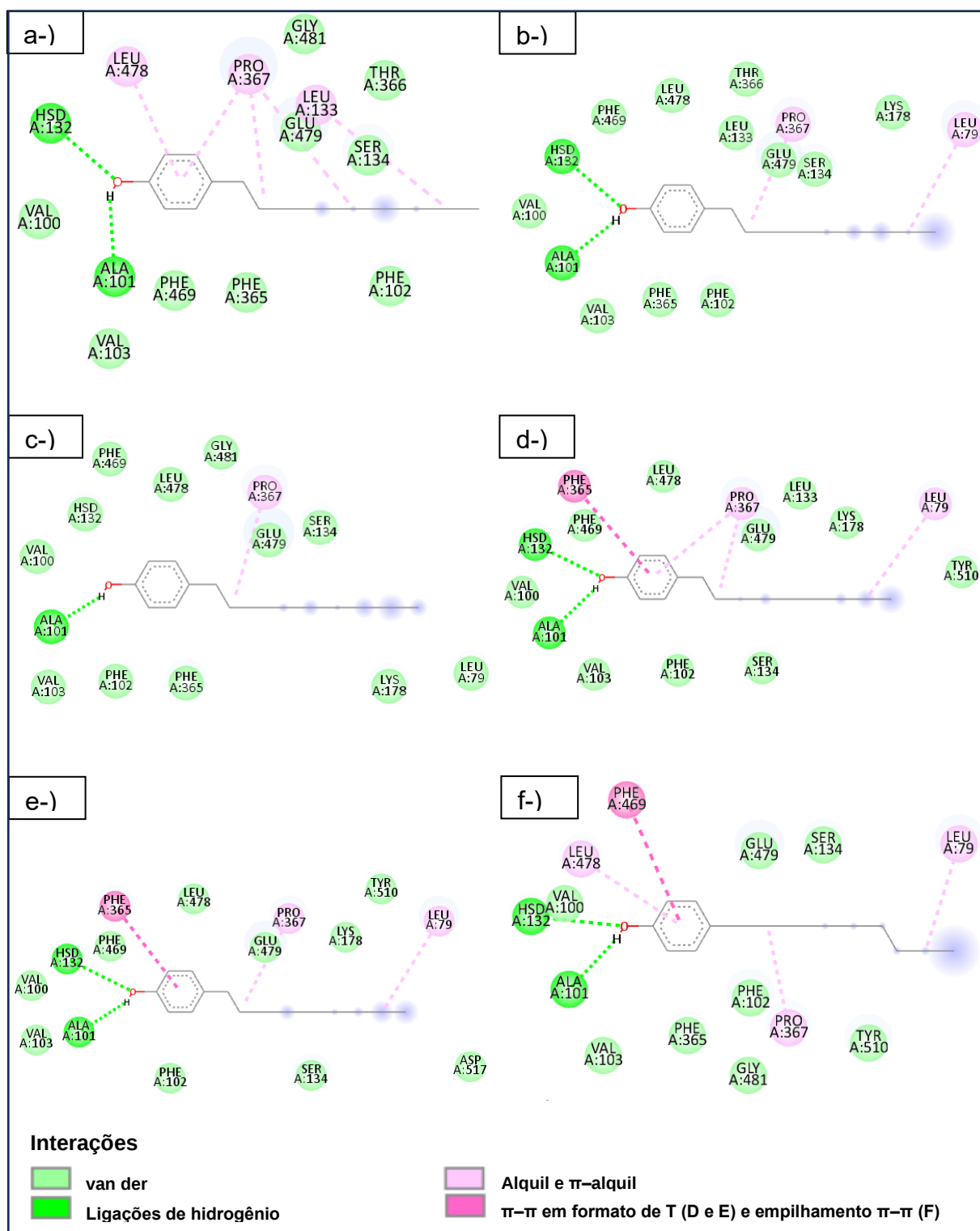


Figura 5.31: Interações do complexo LacTI-4NF durante a trajetória da dinâmica para os tempos 0 ps (a), 200 ps (b), 400 ps (c), 600 ps (d), 800 ps (e) e 1000 ps (f). Fonte: Própria, elaborada no *discovery studio*.

A combinação das técnicas de *docking* e de dinâmica molecular tem sido considerada uma ferramenta poderosa para obtenção de informações sobre a interação entre pequenas moléculas (ligantes) e proteínas alvo (Abdjan et al., 2023). Os resultados obtidos dessa combinação, para a energia livre de ligação (ΔG_{bind}) dos complexos LacTv-4NF e LacTI-4NF durante a dinâmica molecular, calculados por meio do pacote MMPBSA, mostraram que a afinidade da lacase pelo o 4NF aumenta quando a reação ocorre em um sistema solvatado (Figura 5.32), o que resultou valores médios de ΔG_{bind} de -26,45 e -17,73 kcal.mol⁻¹ para LacTv-4NF e LacTI-4NF, respectivamente (Tabela 5.11).

Tabela 5.11: Decomposição de energias e energia livre de ligação geral do estado final para os complexos LacTI-4NF e LacTv-4NF de simulações MD equilibradas e estáveis calculadas por MM/PBSA (todos os valores são relatados em kcal.mol⁻¹). SD(Prop) - SD obtido com a propagação da fórmula da incerteza; SD - desvio padrão da amostra; SEM(Prop.) - SEM obtido com a propagação da fórmula da incerteza; SEM - erro padrão amostral da média.

COMPONENTE DE ENERGIA	MÉDIA		SD(Prop.)		SD		SEM(Prop.)		SEM	
Complexo Lacase-4NF	LacTI	LacTv	LacTI	LacTv	LacTI	LacTv	LacTI	LacTv	LacTI	LacTv
ΔBOND	0	0	1,86	1,46	0	0	0,18	0,14	0	0
ΔANGLE	0	0	1,84	1,97	0	0	0,18	0,2	0	0
ΔDIHED	0	0	1,38	1,91	0	0	0,14	0,19	0	0
ΔUB	0	0	0,69	0,6	0	0	0,07	0,06	0	0
ΔIMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΔCMAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\Delta \text{VDWAALS}$	-27,67	-26,79	0,28	1,12	2,59	2,59	0,03	0,11	0,26	0,26
ΔEEL	-4,89	-20,12	1,31	1,1	1,82	2,09	0,13	0,11	0,18	0,21
$\Delta 1-4 \text{ VDW}$	0	0	1,21	1,23	0	0	0,12	0,12	0	0
$\Delta 1-4 \text{ EEL}$	0	0	1,74	1,49	0	0	0,17	0,15	0	0
ΔEGB	19,01	24,75	0,01	0,33	1,42	1,46	0	0,03	0,14	0,15
ΔESURF	-4,18	-4,29	0,02	0,08	0,3	0,26	0	0,01	0,03	0,03
ΔGGAS	-32,56	-46,91	1,51	1,68	2,66	2,5	0,15	0,17	0,26	0,25
ΔGSOLV	14,83	20,46	0,02	0,34	1,25	1,4	0	0,03	0,12	0,14
ΔTOTAL	-17,73	-26,45	1,51	1,71	2,43	2,24	0,15	0,17	0,24	0,22

Fonte: Própria.

Portanto, uma vez que, a precisão dos métodos para os cálculos de energia livre de ligação utilizados neste trabalho está de acordo com resultados obtidos experimentalmente e comprovados por várias pesquisas (De Vivo et al., 2016; Hou et al., 2011; Wang et al., 2018), os resultados observados das análises das predições do *docking* e da dinâmica molecular, trazem fortes evidências, com base na boa afinidade de ligação apresentada, de que a lacase proveniente das espécies *T. villosa* e *T. lactinea* tem forte potencial para degradar o 4NF, como demonstrado experimentalmente para a lacase da espécie *T. versicolor* na degradação de outros desreguladores fenólicos como o bisfenol A (Enyoh et al., 2022; Hongyan et al., 2019; Joshi et al., 2023).

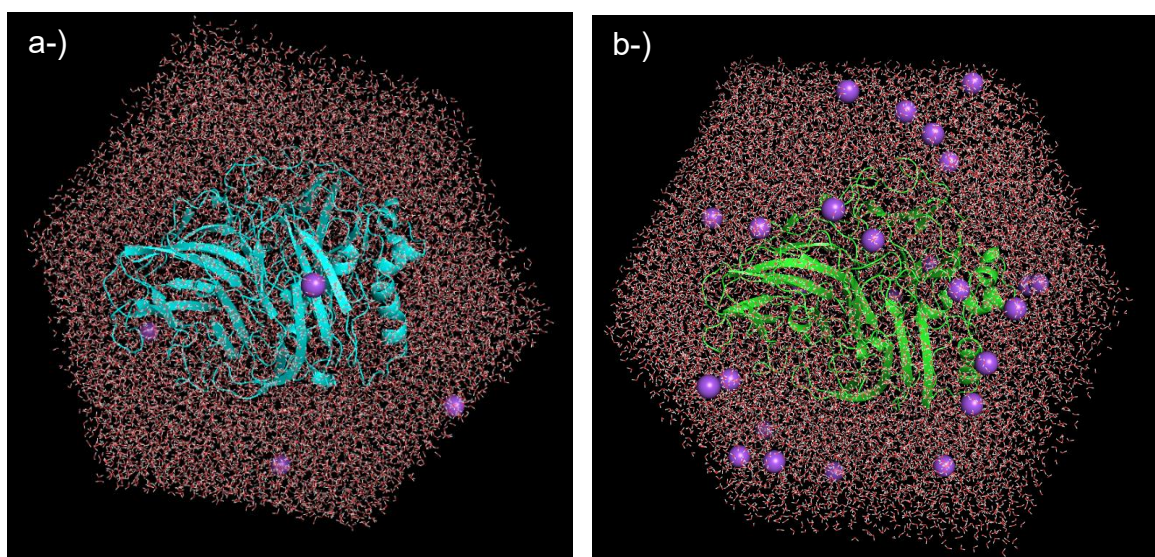


Figura 5.32: Complexos LacTv-4NF (a) e LacTI-4NF (b) solvatados e neutralizados. Fonte: Própria, elaborada no *PyMOL*.

6. CONCLUSÕES

Foi possível obter a partir dos métodos clássico (MMFF94s) e semiempírico (PM7), as estruturas tridimensionais dos nonilfenóis em uma conformação de mínimo global de energia. O que permitiu a obtenção de dados como descritores de reatividade global e de parâmetros termodinâmicos, importantes para a compreensão do comportamento dos compostos analisados. Esses dados indicaram baixa reatividade das moléculas na natureza, o que reflete a difícil degradação desses compostos.

Com a aplicação do *docking* e a correlação observada entre o ΔG_{bind} dos complexos e os descritores teóricos para cada composto, foi possível observar que algumas propriedades químicas como dureza, potencial de ionização e eletronegatividade, são parâmetros importantes para a interação lacase-nonilfenóis e para a espontaneidade da complexação. Foi possível ainda, inferir que a lacase das duas espécies avaliadas mantém seu sítio ativo conservado, com a presença coincidente dos resíduos Ala, Glu, Leu, Phe, Pro, Ser e Val na interação com o 4NF, contribuindo para a estabilidade dos complexos principalmente por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênios, sendo então a presença destes resíduos no sítio ativo, cruciais para uma boa eficiência de degradação.

A partir das poses iniciais dos complexos gerados pelo *docking*, a estabilidade espontânea destes foi demonstrada com sucesso pelos excelentes resultados obtidos por dinâmica molecular, e os cálculos das médias da energia livre de ligação durante a trajetória da dinâmica indicam que o 4NF se liga fortemente com a LacTv e LacTl, com ΔG_{bind} de -26.45 e -17.73 kcal.mol⁻¹, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam, portanto, que há um alto potencial da lacase extraída de *T. villosa* e *T. lactinea* apresentar uma boa taxa de degradação *in vitro* do 4NF e de seus intermediários, além disso, as correlações observadas entre a afinidade de ligação e os descritores teóricos fornecem informações para otimização do meio para degradação em biorreatores, a fim de aumentar a eficiência da degradação e obter bons resultados *in vitro*. Assim, os resultados obtidos lançam novas perspectivas no estudo e aplicação de lacases na degradação de contaminantes ambientais e para a continuação deste trabalho recomenda-se a realização de estudos experimentais para validação dos resultados teóricos obtidos por simulação molecular.

REFERÊNCIAS:

- ABDJAN, M. I. *et al.* Synthesis of Ester Derivatives of Catechin Isolated from *Uncaria gambir* and their Anticancer Activity. **Engineered Science**, v. 27, n. 0, p. 997-, 26 out. 2023.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.
- AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91, 1 set. 2018.
- ALVES DA SILVA, A. P. *et al.* Endocrine Disruptors in Aquatic Environment: Effects and Consequences on the Biodiversity of Fish and Amphibian Species. **Aquatic Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 35, 31 jan. 2018.
- ANDRICOPULO, A.; SALUM, L.; ABRAHAM, D. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 771–790, 1 jun. 2009.
- ARNOLD, K. *et al.* The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 15 jan. 2006.
- AROOJ, M. *et al.* Physicochemical stability study of protein–benzoic acid complexes using molecular dynamics simulations. **Amino Acids**, v. 52, n. 9, p. 1353–1362, 1 set. 2020.
- ARREGUI, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 200, 14 dez. 2019.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, 2006.
- BARREIRO, E. J. *et al.* **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3 ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. v. 3
- BECK, S. *et al.* Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 146–159, fev. 2018.
- BEIRAS, R. *et al.* Polyethylene microplastics do not increase bioaccumulation or toxicity of nonylphenol and 4-MBC to marine zooplankton. **Science of The Total Environment**, v. 692, p. 1–9, nov. 2019.
- BERGÉ, A. *et al.* Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 3798–3819, 5 nov. 2012.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BERTRAND, G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. **CR Hebd Seances Acad Sci**, v. 123, p. 463–465, 1896.

BHANDARI, G. *et al.* Occurrence, potential ecological risks, and degradation of endocrine disrupter, nonylphenol, from the aqueous environment. **Chemosphere**, v. 275, p. 130013, 1 jul. 2021.

BHATT, P. *et al.* Binding interaction of glyphosate with glyphosate oxidoreductase and C–P lyase: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, p. 124927, 5 maio 2021.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, jun. 2007.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, 2010.

BRAUN, J. M. *et al.* Prenatal phthalate, triclosan, and bisphenol A exposures and child visual-spatial abilities. **NeuroToxicology**, v. 58, p. 75–83, 1 jan. 2017.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, jun. 2003.

BROWN, M. A.; ZHAO, Z.; GRANT MAUK, A. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: Laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, n. 1, 2002.

CARRASCOZA, F.; ZARIC, S.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 50, 2014.

CATAPANE, M. *et al.* Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, n. 1, p. 337–346, 15 mar. 2013.

CATHERINE, H.; PENNINGCKX, M.; FRÉDÉRIC, D. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 5, p. 250–266, abr. 2016.

CHANDRASEKARAN, G. *et al.* Computational Modeling of complete HOXB13 protein for predicting the functional effect of SNPs and the associated role in hereditary prostate cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43830, 8 mar. 2017.

CHAURASIA, P. K.; YADAV, R. S. S.; YADAVA, S. A review on mechanism of laccase action. **Research & Reviews in Biosciences**, v. 7, n. 2, 2013.

CHE, X.; LIU, Q.; ZHANG, L. An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina. **Results in Engineering**, v. 19, p. 101335, 1 set. 2023.

CHEN, J. **Computational modelling of solvent effects**. Tese—[s.l.] The University of New South Wales, jun. 2022.

CHINNASAMY, K.; POOMANI, K. Intermolecular interactions and charge density distribution of endocrine-disrupting molecules (xenoestrogens) with ER α : QM/MM perspective. **Structural Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 1013–1028, 7 jun. 2020.

COOPER, C. D.; BARDHAN, J. P.; SANTA MARÍA, F. A Simple Electrostatic Model for the Hard-Sphere Solute Component of Nonpolar Solvation. 13 mar. 2020.

CRANE, J. L. Distribution and toxic potential of alkylphenols, nonylphenol ethoxylates, and pyrethroids in Minnesota, USA lake sediments. **Science of The Total Environment**, v. 776, p. 145974, jul. 2021.

DAÂSSI, D. *et al.* Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 110, 2016.

DARBRE, P. D. Chemical components of plastics as endocrine disruptors: Overview and commentary. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 17, p. 1300–1307, 1 out. 2020.

DE VIVO, M. *et al.* Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 12 maio 2016.

DONG, C.-D. *et al.* Degradation of 4-nonylphenol in marine sediments by persulfate over magnetically modified biochars. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 143–148, jun. 2019.

DTSC, T. D. O. T. S. C. **Product-Chemical Profile for Nonylphenol Ethoxylates in Laundry Detergents**. [s.l.] california environmental protection agency - CalEPA, 2018.

DUNN, M. F. Protein–Ligand Interactions: General Description. Em: **eLS**. [s.l.] Wiley, 2010.

EISENMENGER, F.; ARGOS, P.; ABAGYAN, R. A Method to Configure Protein Side-chains from the Main-chain Trace in Homology Modelling. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 3, p. 849–860, 5 jun. 1993.

ENGUITA, F. J. *et al.* Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, 2003.

ENYOH, C. E. *et al.* In silico binding affinity studies of microbial enzymatic degradation of plastics. **Journal of Hazardous Materials Advances**, v. 6, p. 100076, 1 maio 2022.

EPA. **Aquatic life ambient water quality criteria-nonylphenolEpa-822-R-05-005.** [s.l: s.n.].

FEIZI-DEHNAYEBI, M.; DEHGHANIAN, E.; MANSOURI-TORSHIZI, H. A novel palladium(II) antitumor agent: Synthesis, characterization, DFT perspective, CT-DNA and BSA interaction studies via in-vitro and in-silico approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 249, p. 119215, mar. 2021.

FERREIRA-SILVA, V. *et al.* Trametes lactinea and T. villosa collected in Brazil are able to discolor indigo carmine. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, 2022.

GAŁĄZKA, A.; JANKIEWICZ, U. Endocrine Disrupting Compounds (Nonylphenol and Bisphenol A)–Sources, Harmfulness and Laccase-Assisted Degradation in the Aquatic Environment. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2236, 11 nov. 2022.

GARCIA-MORALES, R. *et al.* Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in Groundwater: Bisphenol A, Nonylphenol, Ethynylestradiol and Triclosan by a Laccase Cocktail from Pycnoporus sanguineus CS43. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 8, p. 1–14, 23 jul. 2015.

GOPALAKRISHNAN, K. *et al.* Ramachandran Plot on The Web (2.0). **Protein & Peptide Letters**, v. 14, n. 7, p. 669–671, 1 jul. 2007.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUIMARÃES, C. R. W. The Many Contributions to Protein-Ligand Binding: Implications in Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, 2012.

HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 720–729, maio 1999.

HE, X. *et al.* Nonylphenol ethoxylates biodegradation increases estrogenicity of textile wastewater in biological treatment systems. **Water Research**, v. 184, p. 116137, out. 2020.

HETÉNYI, C.; VAN DER SPOEL, D. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. **FEBS Letters**, v. 580, n. 5, p. 1447–1450, 20 fev. 2006.

HEVENER, K. E. *et al.* Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 23 fev. 2009.

HONGYAN, L. *et al.* Study on transformation and degradation of bisphenol A by Trametes versicolor laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, v. 224, p. 743–750, jun. 2019.

HOU, T. *et al.* Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics

simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69–82, 24 jan. 2011.

HRISTOVA, K.; WIMLEY, W. C. A Look at Arginine in Membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 239, n. 1–2, p. 49–56, 25 jan. 2011.

HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 30 set. 2013.

ICHALE, R.; KANHED, A. M.; VORA, A. Coumarin linked thiazole derivatives as potential α -glucosidase inhibitors to treat diabetes mellitus. **Molecular Diversity**, v. 1, p. 1–9, 29 abr. 2023.

JAMBOR, T. *et al.* In vitro effect of 4-nonylphenol on human chorionic gonadotropin (hCG) stimulated hormone secretion, cell viability and reactive oxygen species generation in mice Leydig cells. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 219–225, mar. 2017.

JOSHI, A. *et al.* Delineating the Structure-Dynamics-Binding Differences among BA.1, BA.4/5, and BF.7 SARS-CoV-2 Variants through Atomistic Simulations: Correlation with Structural and Epidemiological Features. **ACS Omega**, v. 8, n. 41, p. 37852–37863, 17 out. 2023.

JUNGHANNS, C. *et al.* Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 45–57, 1 jan. 2005.

KADAM, S. K. *et al.* Enzymatic analysis, structural study and molecular docking of laccase and catalase from *B. subtilis* SK1 after textile dye exposure. **Ecological Informatics**, v. 48, p. 269–280, nov. 2018.

KAMARAJ, S.; VUPPU, S. Recent Review on the Extraction and Qualitative Assay of Cysteine and Other Amino Acids from Vellore Feather Waste and Molecular Docking Studies of Cysteine for Pharmacological Applications. **Molecular Biotechnology**, p. 1–29, 16 set. 2023.

KAMEL, M.; MOHAMMADIFARD, K. Thermodynamic and reactivity descriptors Studies on the interaction of Flutamide anticancer drug with nucleobases: A computational view. **Chem Rev Lett**, v. 4, p. 54–65, 2021.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology** 2002 9:9, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.

KARUNAKARAN, K.; MUNIYAN, R. Identification of allosteric inhibitor against AKT1 through structure-based virtual screening. **Molecular Diversity**, v. 27, n. 6, p. 2803–2822, 1 dez. 2023.

KARUNAKARAN, V.; BALACHANDRAN, V. FT-IR, FT-Raman spectra, NBO, HOMO–LUMO and thermodynamic functions of 4-chloro-3-nitrobenzaldehyde based on ab initio HF and DFT calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 98, p. 229–239, dez. 2012.

KHALID, M. *et al.* Synthesis, characterization and exploration of optical non-linearity of secondary ketamine derivatives via DFT study. **Optical and Quantum Electronics**, v. 55, n. 13, p. 1–23, 1 dez. 2023.

KIM, D.; KWAK, J. IL; AN, Y. J. Physiological response of crop plants to the endocrine-disrupting chemical nonylphenol in the soil environment. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 573–580, 1 ago. 2019.

KIM, S. *et al.* Association between maternal exposure to major phthalates, heavy metals, and persistent organic pollutants, and the neurodevelopmental performances of their children at 1 to 2 years of age- CHECK cohort study. **Science of The Total Environment**, v. 624, p. 377–384, 15 maio 2018.

KIM, S. *et al.* PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D1388–D1395, 8 jan. 2021.

KIMURA, Y. *et al.* Removal of bisphenol A and its derivatives from aqueous medium through laccase-catalyzed treatment enhanced by addition of polyethylene glycol. **Environmental technology**, v. 37, n. 14, p. 1733–1744, 17 jul. 2016.

KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2019 20:11, v. 20, n. 11, p. 681–697, 15 ago. 2019.

KUMAR, C. V. *et al.* Computational analysis reveals the association of threonine 118 methionine mutation in PMP22 resulting in CMT-1A. **Advances in Bioinformatics**, v. 2014, 2014.

KUMAR, S. S. *et al.* Bioinformatics aided microbial approach for bioremediation of wastewater containing textile dyes. **Ecological Informatics**, v. 31, p. 112–121, 1 jan. 2016.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 28 jul. 2014.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, 1996.

LLORET, L. *et al.* Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 3, 2010.

LU, Y. *et al.* Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. **Environment International**, v. 77, p. 5–15, 1 abr. 2015.

MacKerell Lab. Disponível em: <https://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml>. Acesso em: 7 set. 2023.

MALLERMAN, J. *et al.* Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates by litter-basidiomycetous fungi. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 103316, 1 out. 2019.

MANOGAR, P. *et al.* In silico studies on CNR1 receptor and effective cyanobacterial drugs: Homology modelling, molecular docking and molecular dynamic simulations. **Gene Reports**, v. 17, p. 100505, dez. 2019.

MARINHO, M. M.; CASTRO, R. R.; MARINHO, E. S. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO SEMI-EMPÍRICO PM7 PARA CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO ATALURENO: HOMO, LUMO, MESP. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 1, n. 1, 2016.

MARTÍNEZ-MORALES, F. *et al.* Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 2, p. 391–396, 1 jul. 2015.

MAXIMIZE MARKET RESEARCH. **Nonylphenol Market: Global Industry Analysis and Forecast (2023-2029)**. Disponível em: <<https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-nonylphenol-market/116266/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

MAZOLA, Y. *et al.* A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic β -fructosidase enzymes. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 9, p. 1–11, 14 set. 2015.

MEHANDIA, S.; SHARMA, S. C.; ARYA, S. K. Immobilization of laccase on chitosan-clay composite beads to improve its catalytic efficiency to degrade industrial dyes. **Materials Today Communications**, v. 25, 1 dez. 2020.

MEHRA, R. *et al.* A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17285, 23 nov. 2018.

MEYER, E. A.; CASTELLANO, R. K.; DIEDERICH, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 11, 2003.

MIAR, M. *et al.* Theoretical investigations on the HOMO–LUMO gap and global reactivity descriptor studies, natural bond orbital, and nucleus-independent chemical shifts analyses of 3-phenylbenzo[d]thiazole-2(3H)-imine and its para-substituted derivatives: Solvent and subs. **Journal of Chemical Research**, v. 45, n. 1–2, p. 147–158, 21 jan. 2021.

MO, D. *et al.* Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 3, p. 331–343, 1 mar. 2018.

MOHIT, E.; TABARZAD, M.; FARAMARZI, M. A. Biomedical and Pharmaceutical-Related Applications of Laccases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 1, p. 78–98, 29 out. 2019.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, 1998.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 443p. 365–382.

MOSHKOV, K. A. *et al.* Multinuclear blue copper-proteins: The evolutionary design. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 50, n. 3, 2014.

MTIBAÀ, R. *et al.* Biodegradation and toxicity reduction of nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 2,4-dichlorophenol by the ascomycetous fungus *Thielavia* sp HJ22: Identification of fungal metabolites and proposal of a putative pathway. **Science of the Total Environment**, v. 708, 15 mar. 2020.

MUSHTAQUE, M. *et al.* Synthesis, structural and biological activity of N-substituted 2-methyl-4-/5-nitroimidazole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1185, p. 440–449, 5 jun. 2019.

NAKAMURA, K.; GO, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 18, 2005.

NAKANO, S. *et al.* X-Ray Crystal Structure of a Mutant Assimilatory Nitrite Reductase That Shows Sulfite Reductase-Like Activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 9, p. 1989–1999, 13 set. 2012.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, out. 2008.

NICOLUCCI, C. *et al.* Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 673–683, jun. 2011.

NOVIČ, M. *et al.* The Comparison of Docking Search Algorithms and Scoring Functions. Em: [s.l: s.n.]. p. 99–127.

OLESEN, T. S. *et al.* Prenatal phthalate exposure and language development in toddlers from the Odense Child Cohort. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 65, p. 34–41, 1 jan. 2018.

OLIVEIRA, B. G. STATE OF THE ART IN HYDROGEN BOND. **Química Nova**, 2015.

ÖMEROĞLU, S.; SANIN, F. D. Fate and degradation kinetics of nonylphenol compounds in aerobic batch digesters. **Water research**, v. 64, p. 1–12, 1 nov. 2014.

PANAGOPOULOS, P. *et al.* Effects of endocrine disrupting compounds on female fertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 88, p. 102347, 1 jun. 2023.

PARK, H. J. *et al.* Nonylphenol Induces Apoptosis through ROS/JNK Signaling in a Spermatogonia Cell Line. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 307**, v. 22, n. 1, p. 307, 30 dez. 2020.

PILLI, S. R.; BANERJEE, T.; MOHANTY, K. HOMO–LUMO energy interactions between endocrine disrupting chemicals and ionic liquids using the density functional theory: Evaluation and comparison. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 112–124, jul. 2015.

- PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 1 abr. 2013.
- RADVEIKIENĖ, I. *et al.* Characterization of a yellow laccase from *botrytis cinerea* 241. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, 2021.
- RAMÍREZ, V. *et al.* Role of endocrine disrupting chemicals in children's neurodevelopment. **Environmental Research**, v. 203, p. 111890, 1 jan. 2022.
- RATTAN, S.; FLAWS, J. A. The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 3, p. 635–644, 1 set. 2019.
- RENUGA PARAMESWARI, A.; RAJALAKSHMI, G.; KUMARADHAS, P. A combined molecular docking and charge density analysis is a new approach for medicinal research to understand drug–receptor interaction: Curcumin–AChE model. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 21–31, 5 jan. 2015.
- ROMÁN, J. *et al.* Molecular modeling of epithiospecifier and nitrile-specifier proteins of broccoli and their interaction with aglycones. **Molecules**, v. 25, n. 4, 2020.
- RÓZALSKA, S. *et al.* Biodegradation of nonylphenol by a novel entomopathogenic *Metarhizium robertsii* strain. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 166–172, 1 set. 2015.
- RYAN, H. *et al.* A comparison of X-ray and calculated structures of the enzyme MTH1. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, n. 7, p. 168, 27 jul. 2016.
- SALO-AHEN, O. M. H. *et al.* Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. **Processes** 2021, Vol. 9, Page 71, v. 9, n. 1, p. 71, 30 dez. 2020.
- SALONEN, L. M.; ELLERMANN, M.; DIEDERICH, F. Aromatic rings in chemical and biological recognition: Energetics and structures. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 21, 2011.
- SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.
- SANTOS, C. B. R. DOS *et al.* Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. **Reviews in Theoretical Science**, v. 2, n. 2, p. 91–115, 2 jan. 2014.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, mar. 2003.
- SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1508, n. 1–2, p. 235–251, 23 nov. 2000.

SHARMA, V.; PANWAR, A.; SHARMA, A. K. Molecular Dynamic Simulation Study on Chromones and Flavonoids for the In Silico Designing of a Potential Ligand Inhibiting mTOR Pathway in Breast Cancer. **Current Pharmacology Reports**, v. 6, n. 6, p. 373–379, 6 dez. 2020.

SHEN, C. *et al.* From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand docking. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 10, n. 1, p. e1429, 1 jan. 2020.

SHI, L. *et al.* Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 1–10, 1 jul. 2017.

SOARES, A. *et al.* The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 719–725, 9 mar. 2005.

SOLOMON, E. I. *et al.* Copper active sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, 2014.

SPINA, F. *et al.* Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. **Journal of Cleaner Production**, v. 100, p. 185–194, 1 ago. 2015.

STENHOLM, Å. *et al.* Removal of nonylphenol polyethoxylates by adsorption on polyurethane foam and biodegradation using immobilized *Trametes versicolor*. **Science of the Total Environment**, v. 724, 1 jul. 2020.

STEWART, J. J. P. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 4, n. 1, p. 1–103, mar. 1990.

STEWART, J. J. P. An investigation into the applicability of the semiempirical method PM7 for modeling the catalytic mechanism in the enzyme chymotrypsin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 5, p. 154, 4 maio 2017.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 13 jan. 2011.

TANAKA, T. *et al.* Treatment of nonylphenol with laccase in a rotating reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 541–546, 2003.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 1994.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 04, p. 1010–1020, dez. 2010.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. *et al.* Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 12 out. 2021.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. v. 53

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 1 jul. 2001.

WAHL, J. *et al.* Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 53, 7 dez. 2019.

WANG, C. *et al.* Recent developments and applications of the MMPBSA method. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, n. JAN, p. 312193, 10 jan. 2018.

WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 1, p. 11–26, 2002.

WATANABE, A. *et al.* Levonorgestrel causes feminization and dose-dependent masculinization in medaka fish (*Oryzias latipes*): Endocrine-disruption activity and its correlation with sex reversal. **Science of The Total Environment**, v. 876, p. 162740, 10 jun. 2023.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, 2018.

WOLF, Y. I.; GRISHIN, N. V.; KOONIN, E. V. Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 4, p. 897–905, 16 jun. 2000.

XIONG, W. *et al.* Biological consequences of environmental pollution in running water ecosystems: A case study in zooplankton. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1483–1490, 1 set. 2019.

XUE, C. *et al.* Effects of pH and NaCl on the Spatial Structure and Conformation of Myofibrillar Proteins and the Emulsion Gel System—Insights from Computational Molecular Dynamics on Myosin of Golden Pompano. **Gels**, v. 9, n. 4, p. 270, 1 abr. 2023.

YEKEEN, A. A. *et al.* CHAPERONg: A tool for automated GROMACS-based molecular dynamics simulations and trajectory analyses. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 21, p. 4849–4858, 1 jan. 2023.

YOSHIDA, H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. **J. Chem. Soc., Trans.**, v. 43, n. 0, p. 472–486, 1883.

YOU, H. H.; SONG, G. Review of endocrine disruptors on male and female reproductive systems. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 244, p. 109002, 1 jun. 2021.

YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, 2013.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C. B. Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 8, p. 1554–1561, 1 mar. 2007.

ZHANG, J. *et al.* Biotransformation of nonylphenol ethoxylates during sewage treatment under anaerobic and aerobic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 135–141, 1 fev. 2008.