



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# **Estudo Teórico do Mecanismo Catalítico da Enzima Piruvato Formato Liase**

Maria de Fátima Assunção Lucas

Departamento de Química  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2002



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# **Estudo Teórico do Mecanismo Catalítico da Enzima Piruvato Formato Liase**

Maria de Fátima Assunção Lucas

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
para obtenção do grau de Mestre em Química

Departamento de Química  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2002

# Índice

Agradecimentos.....	3
Dedicatória.....	5
Resumo.....	7
Abstract.....	9
Índice.....	11
1-Capítulo 1 <i>Enzimas e sua função catalítica</i>	
1.1-Introdução.....	15
1.2-Enzimas.....	15
1.3-Cinética enzimática.....	17
1.4-Mecanismos enzimáticos: catalítico e de inibição.....	20
1.5-Piruvato Formato Liase.....	22
2-Capítulo 2 <i>Mecanismo catalítico da PFL</i>	
2.1-Introdução.....	27
2.2-Characterização do centro activo.....	28
2.3-Mecanismos baseados em dados experimentais .....	29
2.3.1-Mecanismos propostos por Knappe.....	30
2.3.2-Mecanismos propostos por Kozarich.....	34
2.4-Mecanismos baseados em cálculos teóricos.....	35
3-Capítulo 3 <i>Modelos teóricos</i>	
3.1-Introdução.....	41
3.2-Métodos <i>ab initio</i> .....	41
3.2.1-Aproximação de Born Oppenheimer.....	42
3.2.2-Campo auto-consistente.....	43
3.2.3-Modelos de Hartree-Fock.....	44

3.2.4-Método de Hartree-Fock-Roothaan.....	47
3.2.5-Funções de base.....	48
3.2.6-Correlação electrónica.....	49
3.2.7-Teoria do funcional de densidade.....	50
3.3-Métodos semi-empíricos.....	55

## 4-Capítulo 4            *Resultados e discussão*

4.1-Introdução.....	61
4.2-Modelos usados para representar a enzima piruvato formato liase.....	62
4.2.1-Modelos neutros.....	63
4.2.2-Modelos carregados.....	64
4.3-Reacções químicas.....	64
4.4-Possibilidades de mecanismo estudados neste trabalho.....	65
4.5-Tranferência de hidrogénio da cisteína 419 para a glicina 734.....	67
4.6-Adição de uma cisteína ao ácido pirúvico.....	69
4.7-Rearranjo do grupo $\bullet$ COOH.....	71
4.8-Saída do átomo de H para uma cisteína e formação do produto.....	72
4.9-Adição de uma cisteína ao piruvato.....	74
4.10-Formação do formato.....	76
4.11-Transesterificação.....	77
4.12-Permuta de hidrogénio entre as duas cisteínas.....	78
4.13-Ataque da cisteína 418 ao piruvato.....	80
4.14-Modelos neutros vs modelos carregados.....	82
4.15-Proposta de mecanismo para a enzima piruvato formato liase.....	87

## 5-Capítulo 5            *Conclusões*

5.1-Breves considerações finais.....	91
--------------------------------------	----

## *Referências*

# *Enzimas e sua função catalítica*

# 1. Capítulo 1

## 1.1 Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos, responsáveis pelo apoio a reacções químicas que mantêm a homeostasia, isto é, a manutenção das condições internas do organismo dentro dos limites de tolerância.

As enzimas catalisam uma grande variedade de reacções químicas. Os seus grupos funcionais podem participar em processos de ácido-base e interacções de natureza estereoquímica ou electrostática. São menos adequadas para reacções de oxidação-redução ou transferência de grupos de átomos. Embora as enzimas catalisem tais processos é necessário que se associem a co-factores. O co-factor pode ser um ião metálico ou, uma pequena molécula orgânica. A parte proteica da enzima denomina-se apoenzima e, combinada com o co-factor forma, a holoenzima. As enzimas que possuem um átomo de metal que se mantém retido sob quaisquer circunstâncias, são designadas por metaloenzimas (alguns iões comuns são  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ). Se o ião metálico tiver menor afinidade sendo no entanto, essencial para a actividade da enzima, estas são designadas por enzimas activadas por metal, que é geralmente um metal alcalino ou alcalino terroso ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Outros co-factores importantes, são moléculas orgânicas denominadas por co-enzimas, cuja função é o transporte de grupos de átomos ou electrões. No caso, do co-factor orgânico se manter retido à enzima, estamos na presença de um grupo prostético<sup>1</sup>.

## 1.2 Enzimas

As enzimas são geralmente proteínas globulares que aumentam a velocidade de reacções, fazendo baixar a energia de activação do processo. Encontram-se, em pequenas quantidades nas células, uma vez que não são alteradas. As enzimas são altamente específicas para cada substrato, nome vulgarmente atribuído a qualquer molécula que se combine com uma enzima, originando reacção.

Embora as enzimas estejam sujeitas às mesmas leis da natureza, que governam o comportamento de todas as outras substâncias (algo que foi posto em causa durante muito tempo), elas diferem do comportamento catalítico habitual, em vários aspectos.

- Apresentam velocidades de conversão muito elevadas. Aumentam de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes as reacções não catalisadas e são algumas ordens de grandeza mais eficientes que as correspondentes reacções catalisadas por agentes químicos.
- Actuam em condições mais suaves. As reacções catalisadas ocorrem, geralmente, em condições severas de temperatura e pH. Em contraste, as enzimas requerem temperaturas abaixo dos  $100^\circ\text{C}$  e pH praticamente neutro.
- São muito mais específicas. As enzimas são, habitualmente, exclusivas para um dado substrato ou pequeno grupo de moléculas. Esta característica manifesta-se no facto de raramente existirem produtos secundários.

As enzimas são também passíveis de regulação. A capacidade catalítica de muitas enzimas varia em resposta à concentração de outras substâncias além dos substratos. O processo de regulação inclui controlo alostérico, modificação covalente das enzimas e variação da quantidade de enzima sintetizada.

Para além do processo de controlo, que regula a quantidade de enzima presente nas células, a actividade enzimática é afectada por um conjunto de factores:

- Concentração da enzima. Admitindo existir substrato em excesso, o aumento da concentração de enzima conduz geralmente a um aumento na velocidade da reacção.
- Concentração do substrato. A baixas concentrações de substrato, este é o factor limitante de velocidade de reacção. À medida que se aumenta a concentração de substrato aumenta também a velocidade de reacção, até um ponto em que o aumento de concentração não afecta a velocidade.
- Temperatura. Cada enzima tem uma temperatura ideal. Um aumento de temperatura conduz, geralmente, a um aumento na actividade enzimática. Porém, se a temperatura for muito elevada, pode ocorrer desnaturação da enzima, causando perda da sua estrutura tridimensional por ruptura de pontes de hidrogénio. Baixas temperaturas, por outro lado, diminuem a velocidade de reacção.

- pH e força iónica. Tal como acontece com a temperatura, cada enzima apresenta um conjunto óptimo de pH e força iónica e qualquer alteração das condições ideais pode provocar desnaturação.

Ultrapassado o enigma associado à *performance* das enzimas sabe-se hoje, que a razão do seu sucesso está associada à elevada especificidade para um dado substrato e um arranjo óptimo dos grupos catalíticos. Esta característica deve-se provavelmente a anos de evolução no sentido de aperfeiçoamento.

A interacção enzima-substrato pode ocorrer de várias formas consoante o processo em vista:

- A enzima promove alterações conformacionais no substrato.
- A enzima conduz à aproximação e orientação conveniente dos grupos reactivos.
- A enzima fornece ou remove protões de espécies envolvidas na reacção.
- Ocorre reacção covalente entre a enzima e o substrato, formando-se um intermediário reactivo.

### 1.3 Cinética enzimática

Muitas vezes é conhecida a razão entre a quantidade de produtos e reagentes presentes num sistema e espera-se, à partida, que a mistura dos reagentes produza reacção. Porém, na prática, verifica-se que nem sempre assim é. Existem outros factores que regulam a conversão de reagentes em produtos.

A cinética é o estudo das velocidades a que ocorrem as reacções químicas. Mesmo que uma dada reacção química apresente uma constante de equilíbrio termodinâmica elevada, a formação de produtos pode estar limitada por uma barreira energética, difícil de ultrapassar.

A velocidade a que uma reacção ocorre, e a forma como o sistema reage a diferentes condições, está intimamente relacionada com o percurso seguido e, conseqüentemente, com o mecanismo da reacção. Com vista a uma melhor compreensão do comportamento enzimático, o estudo cinético surge como uma poderosa ferramenta. A combinação de informação cinética e estrutural pode revelar que um dado substrato (ou inibidor) apresenta maior ou menor afinidade para a enzima, o que permite avaliar alternativas de mecanismo.

Muito embora as enzimas apresentem um comportamento único na natureza, tal como já foi mencionado anteriormente, elas regem-se pelas mesmas regras associadas a qualquer outro sistema químico.

Podemos observar na figura 1 a curva de energia potencial que separa os reagentes dos produtos num sistema bi-molecular.



Figura 1- Perfil reaccional. O eixo das ordenadas representa a coordenada reaccional e o eixo das abcissas representa a energia potencial. O complexo activado encontra-se muito próximo do máximo e o estado de transição é o próprio máximo.

Inicialmente existem apenas reagentes mas, à medida que a reacção prossegue, os reagentes vão-se aproximando, até um ponto em que começa a haver distorção de geometria. A energia potencial aumenta e próximo do máximo encontramos um complexo activado. Após o máximo, a energia potencial diminui até atingir os produtos onde encontra um novo mínimo. O ponto máximo da curva de energia potencial é o estado de transição, que corresponde a uma geometria, onde basta uma pequena distorção para que o sistema evolua para os produtos. Pode acontecer que algumas moléculas que se encontrem no estado de transição possam reverter para os reagentes, porém, uma vez atingido este estado, é inevitável que haja formação de produtos <sup>2</sup>.

Este modelo simplificado pode, na realidade, ser extrapolado para sistemas mais complexos. Se considerarmos um sistema com três átomos de hidrogénio, onde inicialmente existe uma molécula de  $H_2$  e um átomo de  $H$ , podemos observar a forma como o sistema evolui a partir de um gráfico tridimensional:

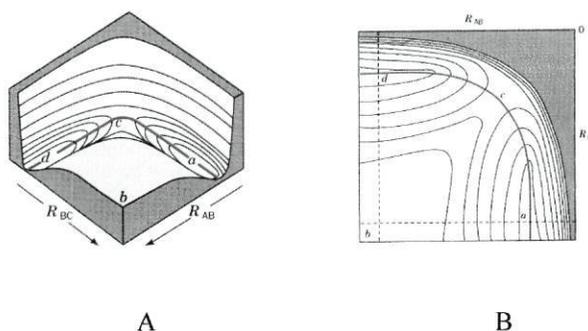


Figura 2- Variação da energia potencial de um sistema constituído por três átomos de hidrogénio.

Na figura 2 A e B, os dois “vales” correspondem à distância de equilíbrio  $H_1-H_2$  e  $H_2-H_3$ , os pontos a e d respectivamente. O ponto b traduz a energia do sistema no caso dos três átomos se encontrarem todos afastados. O ponto c une os dois mínimos e é um ponto de sela, que corresponde ao estado de transição.

Embora os percursos possíveis para levar os reagentes aos produtos sejam vários, acontece que, tal como os sistemas com apenas dois átomos, existe um percurso mínimo de energia. Assim, mesmo sistemas complexos, com muitos átomos, podem ser estudados através de uma curva reaccional, pois construir uma superfície de potencial para sistemas maiores tornar-se-ia incomportável.

A curva reaccional para este sistema encontra-se na figura 3 A e podemos observar que a energia dos produtos é a mesma que a dos reagentes. Se a energia dos reagentes e produtos for diferente, então podemos ter uma curva como se vê na figura 3 B e observar, além de energia de activação  $\Delta G^\ddagger$ , a energia de Gibbs associada ao processo.

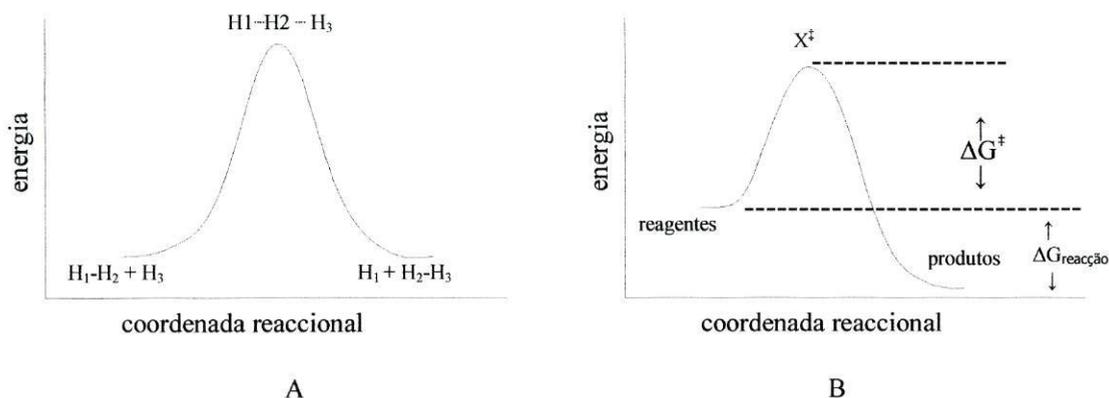


Figura 3- A figura A mostra a curva reaccional que liga os reagentes aos produtos de um sistema atérmico. A figura B representa um sistema exotérmico, com uma barreira de activação  $\Delta G^\ddagger$ .

Neste último caso estamos em presença de uma reacção exotérmica, uma vez que a energia dos produtos é inferior à dos reagentes. Numa curva deste tipo o estado de transição é atingido cedo, assemelhando-se aos reagentes; se a reacção for endotérmica, o estado de transição é atingido tarde e assemelha-se aos produtos.

A velocidade de uma reacção está directamente ligada à barreira de activação,  $\Delta G^\ddagger$ , sendo esta dada pela seguinte relação matemática:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (1.1)$$

onde  $k$  é a velocidade específica da reacção,  $k_B$  é a constante de Boltzman,  $T$  a temperatura,  $h$  a constante de Planck e  $R$  a constante dos gases perfeitos. Esta equação permite verificar que a velocidade de uma dada reacção diminui à medida que  $\Delta G^\ddagger$  aumenta. Por outro lado, se a temperatura aumentar, aumenta a energia térmica e, conseqüentemente, será mais fácil ultrapassar a barreira energética, aumentando a velocidade de reacção (no caso das enzimas isto só é verdade até certo ponto dado poder ocorrer desnaturação). A teoria do estado de transição é um modelo e embora os sistemas reais tenham comportamentos mais complicados, em termos qualitativos verifica-se que é um bom modelo de base.

O efeito real de um catalisador consiste em baixar a barreira de activação,  $\Delta G^\ddagger$ , que limita a velocidade de reacção. É possível observar na figura 4 o aspecto da curva reaccional na presença ou não de um catalisador positivo.

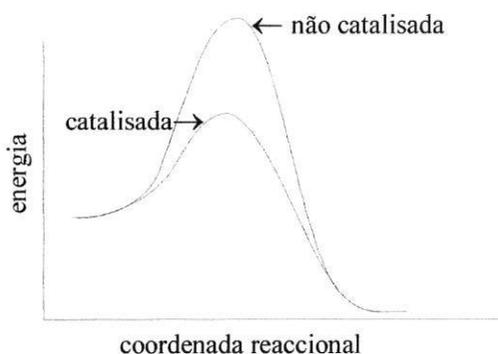


Figura 4 – Gráfico da descida da barreira de activação por acção de um catalisador.

#### 1.4 Mecanismos enzimáticos: catalítico e de inibição

##### *Mecanismo catalítico*

O número de substratos envolvidos numa reacção pode variar. A situação mais vulgar consiste na existência de um único substrato. Podem, no entanto, existir outros grupos necessários à reacção, que se ligam à enzima em regiões que não o centro activo. Se existirem dois substratos a reagir, no centro activo de uma dada enzima, a ordem pela qual ocorre ligação é característica de cada sistema. Para reacções de transferência de grupos é possível distinguir duas classificações mecanísticas:

- reacções sequenciais
- reacções ping-pong

Reacções onde todos os substratos têm de se combinar com a enzima, antes de ocorrer reacção, são denominadas reacções sequenciais. Dentro das reacções sequenciais, podemos ainda ter duas situações. A ordem pela qual os substratos se ligam é irrelevante e a reacção prossegue, independentemente de qual o substrato se ligou primeiro - reacção aleatória. Reacções ordenadas em que, para o segundo substrato se ligar, é essencial que tenha havido ligação de um primeiro substrato.

As reacções ping-pong correspondem a situações onde há formação de produtos antes de todos os substratos se terem ligado à enzima. No caso de uma reacção de transferência, por exemplo, isso significa que há uma primeira reacção de um substrato que conduz à formação de produtos e, só em seguida, se liga o segundo substrato, originando um segundo produto.

### ***Mecanismo de inibição***

Muitas substâncias alteram a actividade de uma enzima combinando-se de forma que influencia a ligação ao substrato ou a velocidade de conversão. Substâncias que reduzem a actividade da enzima são denominadas inibidores.

O estudo de inibidores de uma dada enzima surge, actualmente, como uma abordagem complementar ao estudo mecanístico de uma enzima. O seu estudo é importante para encontrar meios de controlar a sua actividade, por exemplo, na cura de doenças.

Os inibidores enzimáticos podem ser divididos em duas classes genéricas: aqueles que causam inibição irreversível e os inibidores cujos efeitos podem ser revertidos.

Os inibidores irreversíveis causam, geralmente, inactivação por modificação covalente da enzima. O efeito cinético consiste em diminuir a concentração da enzima. Os inibidores irreversíveis são muitas vezes considerados venenosos e inadequados para fins terapêuticos.

Os inibidores reversíveis são mais interessantes do ponto de vista prático. Permitem a sua utilização quando necessários mas, quando deixam de ter interesse, o seu efeito pode ser facilmente revertido. Podem ser divididos em duas categorias principais:

- inibidores competitivos
- inibidores não-competitivos

Os inibidores competitivos são, habitualmente, substâncias estruturalmente semelhantes ao substrato que competem com este pela ligação à enzima, ocorrendo um equilíbrio dinâmico. O inibidor competitivo actua de forma a diminuir a concentração disponível de enzima. O efeito é facilmente anulado baixando a concentração de inibidor.

Os inibidores não-competitivos ligam-se à enzima, ou ao complexo enzima-substrato, mas nunca ao centro activo. Não há alteração da ligação entre o substrato e a enzima mas o complexo por eles formado não pode conduzir aos produtos.

Existe ainda uma terceira classe mais rara, os inibidores anti-competitivos. Estes ligam-se ao complexo enzima-substrato, num ponto exterior ao centro activo. A ligação do substrato à enzima altera a última, tornando possível a ligação do inibidor <sup>1</sup>.

### 1.5 Piruvato Formato Liase

A enzima tradicionalmente denominada Piruvato Formato Liase (PFL), de acordo com a NC-IUBMC (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) designa-se por Formato C-acetiltransferase e pertence à classificação enzimática EC-2.3.1.54. EC significa *Enzyme Commission*, o primeiro número, 2, indica que pertence à classe transferase, ou seja, promove a transferência de grupos funcionais. O segundo número, 3, indica a subclasse, transferência de um grupo acetilo e o 1 é a subsubclasse em que o grupo transferido não é um grupo amino-acetilo. Dentro das várias possibilidades de grupos não amino-acetilo, encontramos o formato C-acetilo (54) cuja ordenação é aleatória.

A enzima piruvato formato liase é um homodímero, com uma massa de  $2 \times 85$  kDa <sup>3</sup>.

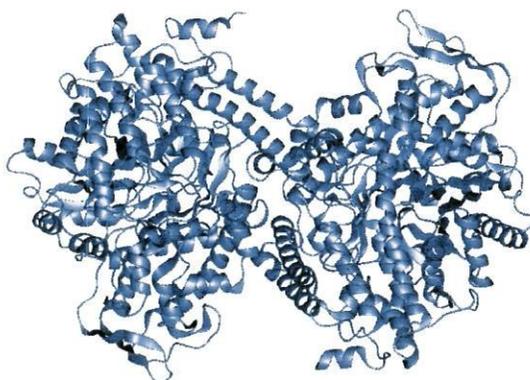
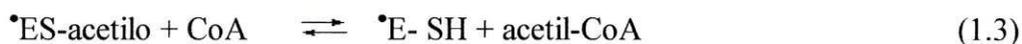
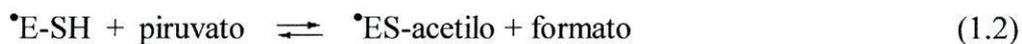


Figura 5 – A enzima piruvato formato liase. A enzima é constituída por dois monómeros iguais.

A forma activa da PFL contém um radical localizado no resíduo 734. Este radical encontra-se ligado ao carbono  $\alpha$  de um péptido, a glicina 734<sup>4</sup>. O radical é cineticamente estável graças à estabilização por ressonância, possível devido à presença de grupos amina e carbamida vizinhos, mas extremamente sensível à presença de oxigénio<sup>5</sup>. O radical resulta da remoção, pós-tradução, de um átomo de hidrogénio catalisada pela enzima PFL-activase (PFL-AE)<sup>6-9</sup>. A PFL-AE, activada por ferro, é dependente de S-adenosilmetionina, para a remoção do átomo de hidrogénio da glicina, e de flavodoxina como co-factores<sup>4</sup>. Ao contrário da enzima Ribonucleótida Reductase, (que se crê divergir de um ancestral comum)<sup>10</sup> a PFL contém o radical no próprio centro activo<sup>11</sup>. Além da glicina 734, são também conhecidos outros resíduos com participação directa na reacção (centro activo). Estudos experimentais de mutação revelam que as cisteínas adjacentes 418 e 419<sup>11</sup> são essenciais ao mecanismo catalítico da PFL. Foram detectadas, também, duas argininas cuja proximidade pode indicar uma possível contribuição estereoquímica<sup>10,11</sup>.

A PFL é a enzima equivalente anaeróbia da piruvato desidrogenase na *Escherichia coli*. Na ausência de oxigénio, a piruvato formato liase é a enzima central do metabolismo de degradação da glucose, daquela bactéria. Catalisa a conversão reversível de piruvato e coenzima A (CoA) em acetil-CoA e formato. Segue uma cinética ping-pong, com uma constante de equilíbrio de 750 para a reacção global a pH 8.1 e 30°C<sup>3</sup> e uma velocidade específica de 770 s<sup>-1</sup>, para a reacção directa e 260 s<sup>-1</sup> para a inversa<sup>12</sup>:



o intermediário acetilado foi detectado experimentalmente.

São conhecidos vários inibidores entre os quais se pode citar o hipofosfito<sup>13</sup>, o acetilfosfinato<sup>14</sup>, fluoropiruvato<sup>15</sup>, e metilcrlato<sup>16</sup>. Estes estudos experimentais fornecem dados valiosos no estabelecimento de um mecanismo correcto.



## ***Mecanismo catalítico da PFL***

## 2. Capítulo 2

### 2.1 Introdução

A piruvato formato liase catalisa a conversão reversível do piruvato e CoA em acetil-CoA e formato:



A reacção constitui o passo fundamental na degradação anaeróbia da glucose para a *Escherichia coli* e várias outras bactérias. Em termos funcionais assemelha-se à reacção da  $\beta$ -ceto-tiolase no ciclo de degradação dos ácidos gordos. O mecanismo da PFL é, no entanto, diferente já que a cisão carbono-carbono do substrato ocorre homoliticamente <sup>4</sup>.

A reacção ocorre em dois passos. Primeiro a ligação covalente entre a enzima e o piruvato originando um produto da reacção, o formato, e também um intermediário estável acetil-PFL <sup>3</sup> (reacção (1)). É então o composto acetil-PFL que reage com a CoA formando-se o segundo produto da reacção, o acetil-CoA (reacção (2)). É seguida uma cinética de ping-pong uma vez que a formação do segundo produto só é possível após a formação do formato e a participação de um segundo substrato, a co-enzima A.



No presente trabalho a atenção será centrada apenas no primeiro passo de reacção, sendo a segunda parte do mecanismo objecto de estudo num futuro próximo.

## 2.2 Caracterização do centro activo

Ao longo dos anos, várias tentativas têm sido feitas com o intuito de estudar o mecanismo catalítico da PFL. Com esse fim em vista, a caracterização do centro activo é o primeiro passo de um longo percurso.

Vários estudos <sup>4, 11</sup> têm revelado que o centro activo da PFL inclui uma glicina na posição 734 (G<sup>734</sup>) e duas cisteínas adjacentes nas posições 418 (C<sup>418</sup>) e 419 (C<sup>419</sup>). Existe também evidência da possível intervenção de duas argininas: Arg 176 e Arg 435. Estas podem ter um papel estereoquímico orientando o substrato para uma posição mais conveniente e/ou uma função de estabilização de carga.

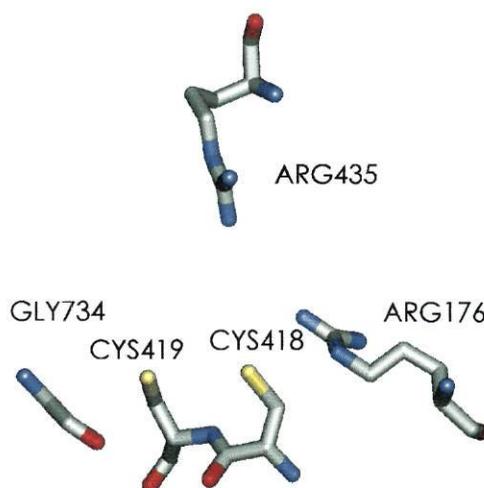


Figura 6- Resíduos que constituem o centro activo da enzima piruvato formato liase.

A piruvato formato liase é o primeiro exemplo de uma enzima com spin localizado na cadeia principal da proteína <sup>6</sup>. O radical encontra-se num carbono  $\alpha$  da glicina 734 <sup>5</sup>. O radical é sensível a oxigénio o que dificulta, de certo modo, o seu estudo experimental sendo porém, extremamente estável em condições anaeróbias. O facto de se manter estável durante horas a 303K, ou mesmo dias a 273K, é uma propriedade invulgar, uma vez que não existe qualquer estabilização por um centro metálico. Assim, seria de esperar que o radical se encontrasse muito protegido pela estrutura da proteína. A facilidade com que ocorre permuta do hidrogénio C2 da glicina com o solvente nega esse facto. A estabilidade tem, então, de ser explicada pela vizinhança do radical. A presença de grupos carboxamida vizinhos conduz a uma

estabilização por ressonância, energeticamente comparável à de radicais em sistemas  $\pi$  aromáticos <sup>4</sup>.

Um dado curioso que prendeu a atenção de alguns cientistas é a velocidade de permuta do hidrogénio  $\alpha$  da glicina. O estudo para uma glicina isolada <sup>17</sup> revela que esta pode permutar o hidrogénio por duas vias: intra e intermolecularmente. A permuta intramolecular é demasiado rápida para ser seguida por um estudo de EPR (Electron Paramagnetic Resonance). A permuta intermolecular é relativamente lenta ocorrendo em alguns dias <sup>17</sup>. Atendendo a isto, foi sugerido um pKa invulgarmente baixo, para explicar a rápida permuta para o hidrogénio  $\alpha$ , na PFL activa. A explicação pode estar relacionada com a presença de uma cisteína, a 419, que funciona como catalisador para a permuta. Estudos de mutação na C<sup>419</sup> confirmam esta hipótese. A mutação na C<sup>418</sup> não afecta o equilíbrio de permuta.

Para além da participação no processo de permuta, espera-se que a C<sup>419</sup> tenha uma função fundamental no mecanismo catalítico, já que a sua mutação conduz à inactivação da enzima. O mesmo sucede com a cisteína 418. Mesmo que a enzima se encontre na forma radicalar a mutação destes dois resíduos não permite que ocorra reacção. A mutação da glicina 734 por uma alanina impossibilita a formação de radical verificando-se, também neste caso, a perda de actividade da enzima <sup>4</sup>.

A reunião de dados experimentais tem permitido a apresentação de vários mecanismos para a participação catalítica da enzima piruvato formato liase.

### 2.3 Mecanismos baseados em dados experimentais

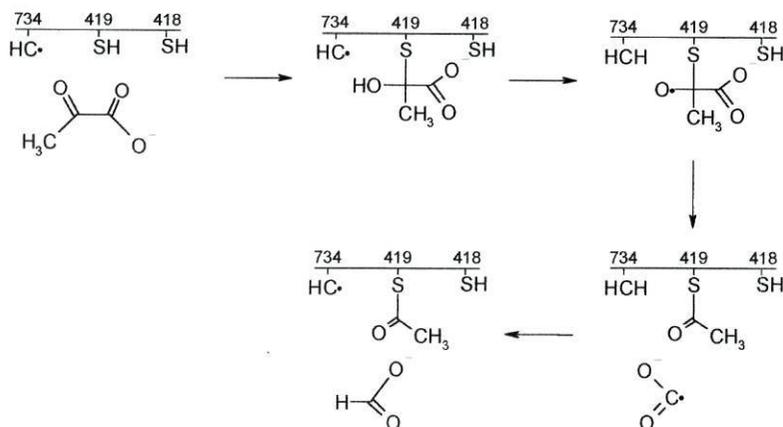
Estudos de EPR sugerem a existência de um radical por dímero ocorrendo actividade em apenas um monómero da PFL. Há conservação de radical, ao longo do mecanismo, o que sustenta a hipótese de um mecanismo homolítico <sup>18</sup>.

É possível encontrar na literatura várias alternativas de mecanismo, das quais se destacam os trabalhos realizados por Joachim Knappe, John Kozarich, Leif Eriksson e respectivos colaboradores. Os dois primeiros, apresentam resultados baseados em evidência experimental, enquanto que Leif Eriksson efectuou um estudo teórico tendo por base o trabalho apresentado por Kozarich.

Nos sub-capítulos seguintes será feita uma breve descrição do trabalho desenvolvido ao longo dos anos pelos cientistas citados.

### 2.3.1 Mecanismos propostos por Knappe

O primeiro trabalho apresentado remonta a 1974 quando se observou um intermediário acetilado estável<sup>3</sup>. Este facto confirma a cinética tipo ping-pong para a PFL. Alguns anos mais tarde é estudado um inibidor e simultaneamente a primeira hipótese de mecanismo<sup>19</sup>.

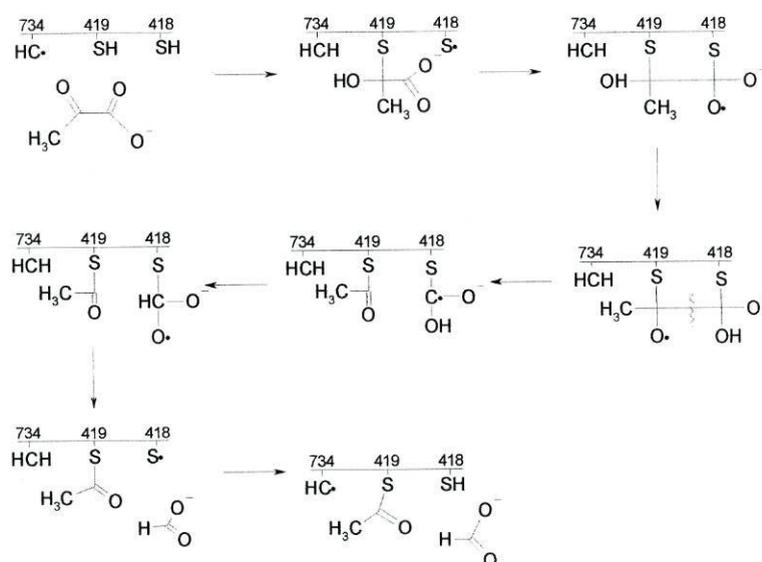


Esquema 1- Mecanismo para a PFL apresentada por Knappe e colaboradores<sup>19</sup>.

É proposto que, após activação da enzima por formação de um radical na glicina 734, ocorra ataque da C<sup>419</sup> ao carbono carbonilo do piruvato. Simultaneamente observa-se a transferência do hidrogénio da C<sup>419</sup> para o oxigénio adjacente ao carbono 2 do piruvato. Esse hidrogénio é novamente transferido para a glicina. Ocorre então, quebra da ligação C-C com saída do grupo formilo radicalar. Este remove o átomo de hidrogénio à glicina regenerando-se o radical na cadeia principal da enzima.

É utilizado um inibidor, o hipofosfito, que reage com o intermediário acetilado sob condições anaeróbias. Marcação com carbono 14 evidencia que se forma um éster ligado a um enxofre, encontrando-se o grupo acetilado predominantemente na cisteína 419 e, também, que o inibidor se encontra ligado à C<sup>418</sup>, confirmando que esta se encontra livre após a acetilação.

Alguns anos mais tarde é proposto um novo percurso catalítico para a enzima <sup>6</sup>. Neste mecanismo, forma-se um intermediário após ataque da C419 ao piruvato, com transferência de dois átomos de hidrogénio, ficando a cisteína 418 na forma radicalar. Em seguida forma-se um novo intermediário ligado simultaneamente às duas cisteínas que se dissocia para originar os produtos do primeiro passo da reacção. A adição do piruvato à C419 mantém-se mas, neste caso, espera-se a formação de radical na C418 vizinha e não na glicina para o último passo da reacção. No esquema 2 podemos observar o intermediário formado, bem como a sua dissociação nos produtos.



Esquema 2 – Mecanismo catalítico da PFL proposto em 1993 pelo laboratório de Knappe <sup>6</sup>.

Em 1999 é publicado um trabalho onde é revelada a estrutura cristalográfica da PFL na forma não radicalar <sup>11</sup>. Esta foi isolada com um composto estruturalmente idêntico ao piruvato mas, quimicamente inerte, o oxamato. A observação do posicionamento desta espécie no centro activo revelou que, caso o piruvato se encontre na mesma posição, é possível uma nova perspectiva para o mecanismo da PFL.

Podemos observar na figura 7, obtida a partir de um excerto do ficheiro cristalográfico, que o oxamato se encontra posicionado de forma favorável ao ataque no carbono carbonilo pela  $C^{418}$  e que o grupo formilo se encontra orientado para a  $C^{419}$ .

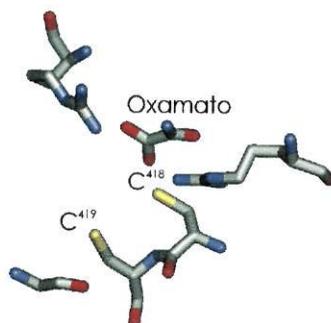
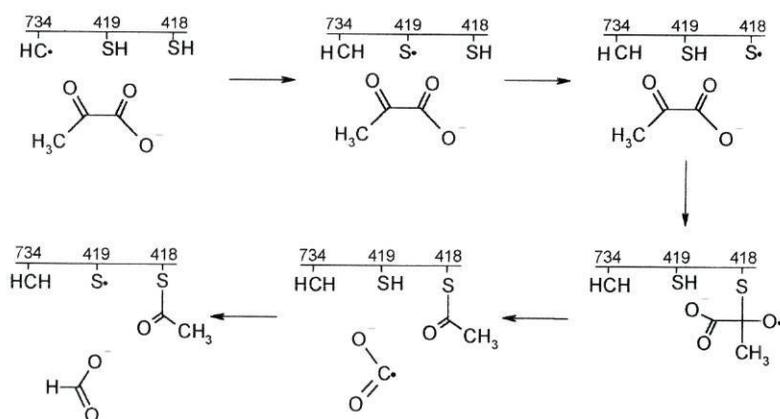


Figura 7 – Centro activo da PFL na presença de oxamato.

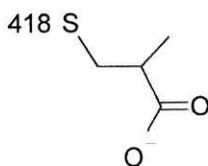
Baseados na localização do oxamato é proposto um mecanismo alternativo. A aproximação do substrato promove a transferência do hidrogénio da cisteína 418 para a glicina via a cisteína 419. O enxofre radicalar (418) adiciona então ao piruvato, no carbono 2, produzindo um intermediário tetraédrico. Este colapsa, posteriormente, formando-se um tioéster e um radical formilo. O formilo remove então, um átomo de hidrogénio à  $C^{419}$  regenerando o radical da enzima.



Esquema 3 – Mecanismo da PFL com uma nova função atribuída à cisteína 418 <sup>11</sup>.

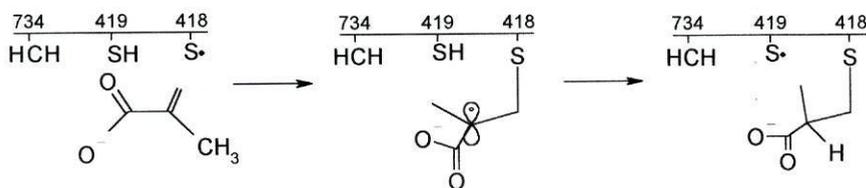
O mecanismo ilustrado no esquema 3 atribuí à C<sup>419</sup> uma função exclusivamente de transferência de hidrogénio. Este percurso é muito mais simples que os apresentados anteriormente e é consistente com a maior parte dos dados experimentais. A única excepção foi apresentada por este mesmo grupo, em trabalho anterior <sup>19</sup>. O isolamento de um produto de inibição revela que a enzima acetilada se encontra livre na C<sup>418</sup>. Este facto é justificado por um possível equilíbrio de transesterificação que deverá ocorrer apenas na ausência de formato e CoA como co-substratos.

A apoiar esta última proposta de mecanismo foi encontrado recentemente um inibidor da PFL <sup>16</sup>. O metacrilato diminui a velocidade de reacção da enzima activa, identificando-se o seguinte produto final:



Esquema 4 – Produto de inibição da PFL com metacrilato.

É sugerido um mecanismo para a inibição que evidencia a necessidade de ataque por parte da cisteína 418 radicalar.



Esquema 5 – Mecanismo de inibição da PFL por metacrilato proposto por Knappe <sup>16</sup>.

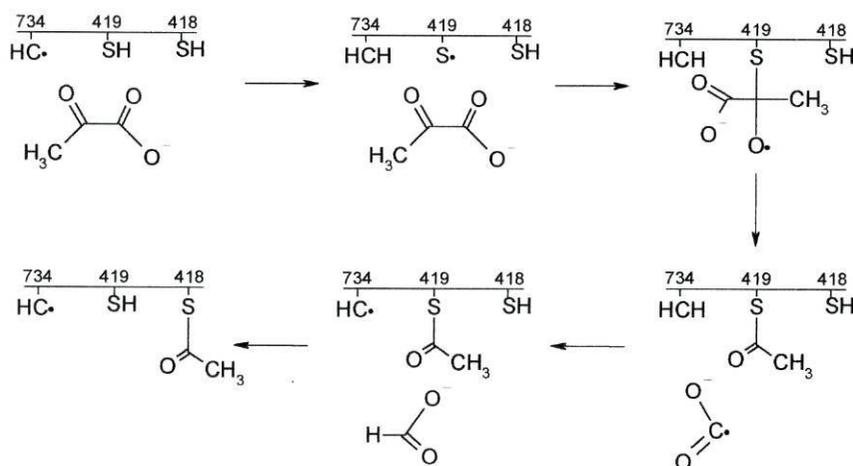
### 2.3.2 Mecanismos propostos por Kozarich

Paralelamente ao trabalho desenvolvido por outros cientistas, o grupo de trabalho liderado por John Kozarich realizou vários estudos com base em inibidores da piruvato formato liase, que permitiu apresentar alternativas para o mecanismo catalítico da enzima <sup>10, 17</sup>.

Foi verificado que a acetilação da PFL não impossibilita a permuta do hidrogénio  $\alpha$  da glicina o que conduz a duas observações importantes <sup>17</sup>:

- O radical da glicina 734 deve ser regenerado no fim do processo de acetilação.
- A cisteína 419 deve encontrar-se livre de modo a catalisar o processo de permuta.

Atendendo a estes factos foi proposto um mecanismo que apresenta uma nova etapa, uma transesterificação entre a C<sup>419</sup> e a C<sup>418</sup>.

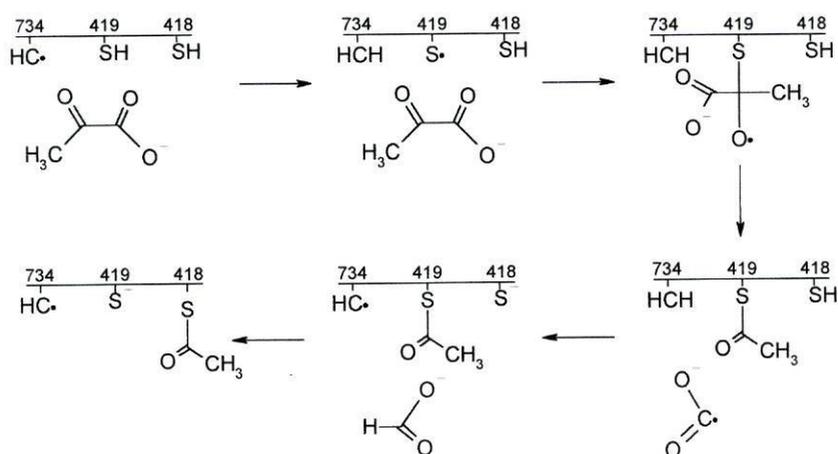


Esquema 6 – Mecanismo catalítico da PFL proposto por Kozarich <sup>17</sup>.

Podemos observar no esquema 6 uma transferência de hidrogénio da C<sup>419</sup> para a glicina e um ataque da cisteína radicalar ao piruvato. O intermediário colapsa no formilo radicalar e mantém o grupo acetilo ligado à cisteína 419. Uma vez formado o produto é regenerado o radical na posição 734 e ocorre a transesterificação. Liberta-se assim a cisteína 419, o que permite a permuta do hidrogénio  $\alpha$ , da glicina, observada experimentalmente.

A inovação deste mecanismo é sem dúvida a transesterificação. Um estudo mais aprofundado da estrutura da enzima revela que as duas cisteínas se encontram num centro hidrofóbico. A cisteína 418 mais protegida pela estrutura tridimensional da proteína <sup>10</sup>. Esta característica pode estabilizar o radical na C<sup>418</sup> no caso de uma transferência homolítica ou, então, poderá contribuir para um aumento da sua nucleofilicidade caso se encontre na forma aniónica e participe numa transferência heterolítica.

No esquema 5 verificamos a nova alternativa de mecanismo com um passo de transesterificação heterolítica <sup>10</sup>.



Esquema 7 – Mecanismo catalítico da PFL com transesterificação heterolítica <sup>10</sup>.

## 2.4 Mecanismo baseado em cálculos teóricos

### Mecanismo proposto por Eriksson

Atendendo aos meios computacionais existentes actualmente, o estudo teórico de uma enzima (ou qualquer outro sistema de grandes dimensões) requer antes de mais a escolha de modelos que a representem convenientemente. No trabalho efectuado por Leif Eriksson e colaboradores <sup>21</sup> a glicina 734 foi representada na sua totalidade uma vez que, na forma radicalar, o spin encontra-se deslocalizado por toda a molécula. As cisteínas foram representadas como CH<sub>3</sub>SH dado que o aumento da cadeia não introduz alterações significativas nos resultados obtidos <sup>20</sup>. O mecanismo proposto por Kozarich

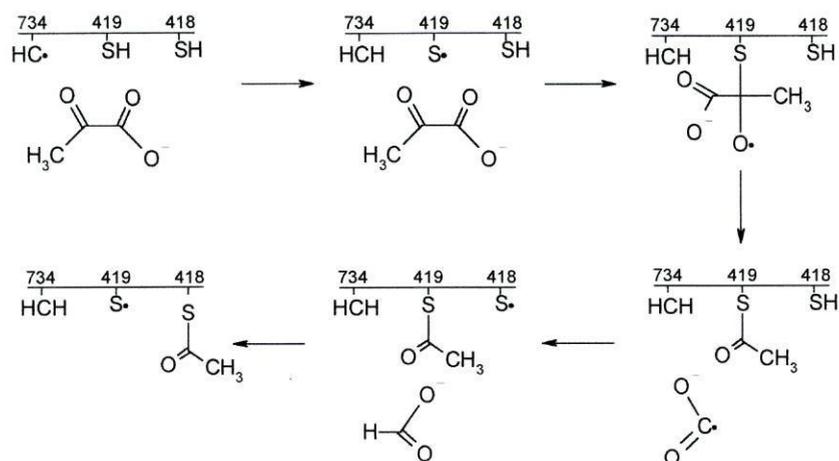
em 1999 (esquema 3) <sup>11</sup> foi utilizado como ponto de referência. Foram escolhidos modelos neutros para o piruvato e formato modelados como ácido pirúvico e ácido fórmico <sup>21</sup>.

O primeiro passo, uma transferência de hidrogénio da cisteína 419 para a glicina é ligeiramente endotérmico, indicando que o radical glicilo é mais estável que o tiilo. Este facto é apoiado pela observação experimental do radical na glicina, indicando um maior tempo de permanência neste resíduo. A transferência é limitada por uma barreira de activação de 9.9 kcal/mol. O ataque nucleófilo da cisteína radicalar ao piruvato é endotérmico e ocorre em dois passos: uma primeira aproximação da cisteína ao piruvato, formando-se um intermediário tetraédrico instável, seguida da saída do grupo formilo radicalar. Os dois processos ocorrem com barreiras de activação de 12.3 e 2.8 kcal/mol respectivamente. Outra possibilidade de reacção é o ataque directo da cisteína não-radicalar. Esta é uma alternativa proposta por Knappe no esquema 1. A energia deste processo é de apenas 1.6 kcal/mol mas, a activação requer 37.6 kcal/mol. Um estudo efectuado por Siegbahn no mecanismo da RNR <sup>22</sup> para um passo idêntico, apresenta uma energia de activação demasiado elevada porém, o mesmo processo mediado por um grupo carboxilato vizinho, baixou a energia de activação consideravelmente. O mesmo estudo foi efectuado neste contexto e observou-se uma diminuição da barreira de 41 para 16 kcal/mol, tornando o passo viável. Este seria um passo competitivo, não fosse o facto de não existir na vizinhança qualquer grupo carboxilato capaz de catalisar a reacção. Neste ponto a reacção não radicalar foi posta de parte.

O grupo formilo radicalar, proveniente da reacção anterior, é extremamente reactivo e necessita de um átomo de hidrogénio para formar o produto da reacção. A remoção do átomo de hidrogénio pelo formilo pode ser feita na glicina, tal como é proposto por Kozarich sendo acompanhada por uma libertação de 17.5 kcal/mol e apresentando uma barreira de 4.9 kcal/mol a transpor. Atendendo à continuação do mecanismo, o grupo pensou também na remoção do átomo de hidrogénio à cisteína vizinha. Embora este processo ocorra com uma menor libertação de energia, é cineticamente mais favorável (1.1 kcal/mol). A cisteína 418 na forma radicalar, permite uma transesterificação com uma barreira de activação de 11.6 kcal/mol, mais favorável que o processo não radicalar que apresenta uma barreira de 41.2 kcal/mol. De acordo com este modelo, o processo heterolítico é impossível atendendo à barreira limitante de velocidade esperada, experimentalmente, de apenas 13.5 kcal/mol <sup>3</sup>. Estes processos são

atérmicos já que as duas cisteínas são modeladas de forma igual. Na realidade deve existir uma variação de energia que não é possível quantificar.

Atendendo aos resultados obtidos, o grupo apresentou um novo mecanismo ilustrado no esquema 8 <sup>21</sup>:



Esquema 8 – Mecanismo proposto por Eriksson e colaboradores a partir de um estudo teórico <sup>21</sup>.

Os resultados obtidos teoricamente permitem a apresentação de um novo percurso mecanístico, não excluindo porém, algumas das possibilidades anteriormente apresentadas. Na tabela 1 podemos observar um resumo dos resultados apresentados na sequência do estudo anterior.

**Tabela 1 – Sumário dos resultados apresentados por Eriksson e colaboradores <sup>21</sup>.**

Reacção	Barreira	Energia
Gly• + Cys → Gly + Cys•	9.9	3.4
Cys + piruvato → intermediário tetraédrico (carboxilato)	37.6	1.6
Cys + piruvato → intermediário tetraédrico	12.0	1.6
Cys• + piruvato → intermediário radicalar tetraédrico	12.3	9.9
Intermediário radicalar tetraédrico → acetil-Cys + formil•	2.8	-3.9
Cys• + piruvato → acetil-Cys + formil•	-	6.0
formil• + Gly → formato + Gly•	4.9	-17.5
formil• + Cys → formato + Cys•	1.1	-14.1
acetil-Cys + Cys• → Cys• + acetil-Cys	11.6	0.0
acetil-Cys + Cys → intermediário tetraédrico	41.2	9.0
Cys• + Cys → Cys + Cys•	2.4	0.0
Cys• + Gly → Cys + Gly•	6.5	-3.4
Reacção global: piruvato + CoA → formato + acetil-CoA	-	-8.1



## ***Modelos teóricos***

## 3. Capítulo 3

### 3.1 Introdução

O papel desempenhado pelas enzimas constitui um desafio à compreensão do seu funcionamento. Sabe-se actualmente que apesar da sua dimensão, as enzimas apresentam pontos específicos onde se concentra a sua actividade. O estudo teórico de uma enzima pode ser levado a cabo por duas abordagens distintas: o estudo da enzima na sua globalidade e possível inclusão de solvente ou simplesmente partes específicas das enzimas conhecidas por centros activos.

O estudo da enzima parcial ou na sua totalidade, numa das abordagens, implica o uso de métodos teóricos que incluam apenas os átomos como partículas menores, ignorando a interacção de electrões e núcleos. O sistema é representado como um conjunto de esferas rígidas, onde se consideram condensadas, a totalidade das partículas sub-atómicas, que constituem o átomo. Estes métodos baseiam-se nos conceitos de mecânica clássica e regem-se pelas leis de Newton.

Em alternativa, podemos concentrar a nossa atenção em partes mais limitadas da molécula e usar métodos mais exactos para a sua representação. Os métodos quânticos constituem um bom instrumento de trabalho quando é possível limitar o sistema a poucas dezenas de átomos.

### 3.2 Métodos *ab initio*

Se estamos interessados em estudar um sistema onde a descrição electrónica é essencial, é necessário recorrer à mecânica quântica. Os electrões são partículas muito leves e não podem ser correctamente descritos pela mecânica clássica<sup>23</sup>.

A equação de Schrödinger independente do tempo escrita da seguinte forma:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (3.1)$$

tem resolução analítica apenas para sistemas hidrogenóides. Os métodos *ab initio* resolvem a equação de Schrödinger de forma numérica. Estes métodos não recorrem a

dados experimentais, efectuando os cálculos com todas as partículas intervenientes, recorrendo apenas às leis da mecânica quântica e, às constantes físicas fundamentais. Os métodos *ab initio* têm como principal desvantagem a aplicabilidade a um pequeno grupo de átomos. Se estamos interessados em sistemas de maiores dimensões, é necessário recorrer a métodos que introduzem dados experimentais como é o caso dos semi-empíricos. Estes serão abordados posteriormente.

### 3.2.1 Aproximação de Born-Oppenheimer

A equação de Schrödinger, independente do tempo, é uma equação de valores próprios do Hamiltoniano,  $\hat{H}$ , cuja função de onda,  $\Psi(q_M, q_N)$ , depende das coordenadas espaciais dos  $N$  núcleos e  $M$  electrões de um sistema molecular. Assumindo que os electrões e núcleos são cargas pontuais o Hamiltoniano, não relativístico, em unidades atómicas é dado por:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_A^N \frac{1}{m_A} \nabla_A^2 + \sum_{A<B}^N \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} - \frac{1}{2} \sum_i^M \nabla_i^2 - \sum_A^N \sum_i^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i<j}^M \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.2)$$

Dissecando a expressão, o primeiro termo representa o operador energia cinética dos núcleos de massa  $m_A$ . O segundo a repulsão electrostática internuclear e os restantes a energia cinética dos electrões, a atracção electrostática sentida pelos electrões no campo dos núcleos e o termo de repulsão electrónica respectivamente. Este operador Hamiltoniano é demasiado complexo para ser resolvido para sistemas moleculares, tornando-se inevitável recorrer a algumas simplificações. Uma primeira aproximação, fundamental, vulgarmente designada por aproximação de Born-Oppenheimer, consiste em separar o movimento nuclear do electrónico <sup>24</sup>. Esta aproximação baseia-se na observação que a massa dos núcleos é muito superior à dos electrões e, como tal, as suas velocidades são muito distintas. Deste modo, podemos considerar que o movimento dos electrões é independente do movimento, muito mais lento, dos núcleos que são considerados fixos. Em termos quantitativos verificamos que o Hamiltoniano é reduzido a três termos, relacionados apenas com o movimento dos electrões, que definem assim um Hamiltoniano electrónico,  $\hat{H}_{ele}$ :

$$\hat{H}_{ele} = -\frac{1}{2} \sum_i^M \nabla_i^2 - \sum_A^N \sum_i^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i<j}^M \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.3)$$

O primeiro termo da equação 3.2 é desprezado e o segundo é uma constante para cada conformação dos N núcleos.

Podemos agora escrever a função de onda como produto de funções electrónica e nuclear:

$$\psi(q_M, q_N) = \psi_{ele}(q_M, q_N) \cdot \psi_{nuc}(q_N) \quad (3.4)$$

A componente electrónica,  $\psi_{ele}$ , da função de onda total, representa o estado electrónico no campo gerado pelos núcleos, numa conformação fixa. A componente nuclear,  $\psi_{nuc}$ , é solução da equação 3.5:

$$[T_{nuc}(q_N) + V_{nuc}(q_N) + E_{ele}(q_N)]\Psi_{nuc}(q_N) = E \cdot \Psi_{nuc}(q_N) \quad (3.5)$$

Podemos verificar que embora  $\Psi_{nuc}(q_N)$  seja independente das coordenadas electrónicas, o movimento dos núcleos depende da energia potencial,  $E_{ele}$ , gerado pelos electrões num dado arranjo espacial dos núcleos. Esta aproximação permite a construção de superfícies de energia que cada conformação de núcleos gera. O estudo de uma superfície permite identificar geometrias correspondentes a mínimos ou máximos importantes num sistema molecular. Para sistema mais complexos a construção de superfícies de energia potencial é impossível, porém, podemos limitar a sua projecção às partes com interesse e seguir, por exemplo, um dado percurso que ligue dois mínimos (reagentes e produtos) via um máximo (estado de transição).

### 3.2.2 Campo auto-consistente

A resolução da equação de Schrödinger para sistemas multieletrónicos implica que sejam introduzidas simplificações. Vimos já que a *aproximação de Born-Oppenheimer*, assim como a isenção de efeitos relativísticos, tornam o problema mais acessível. O Hamiltoniano definido em 3.2 só inclui operadores de coordenadas espaciais. Pode considerar-se o movimento de spin electrónico independente e assim definir funções  $\phi$  como produto das funções orbital e spin – orbitais-spin. Cada electrão tem um número quântico de spin  $\frac{1}{2}$ . Na presença de um campo magnético externo existem dois estados possíveis, correspondentes a um alinhamento a favor ou contra esse campo. As funções de spin electrónico correspondentes são denotadas por  $\alpha$  e  $\beta$ . A

função de onda electrónica total deve ser antissimétrica com respeito à troca de coordenadas de dois electrões. O princípio de exclusão de Pauli, que estabelece que dois electrões não podem ter todos os números quânticos iguais, é uma consequência directa do princípio da antissimetria. A função de estado antissimétrica,  $\Psi_{elec}$ , pode ser representada por um determinante de Slater:

$$\Psi_{elec} = \frac{1}{\sqrt{M!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_1(2) & \cdots & \phi_1(M) \\ \phi_2(1) & \phi_2(2) & \cdots & \phi_2(M) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \phi_M(1) & \phi_M(2) & \cdots & \phi_M(M) \end{vmatrix} \quad (3.6)$$

onde as funções  $\phi$  são ortonormais.

Se a função de onda consistir num único determinante, isso significa que a correlação electrónica é negligenciada, isto é, a repulsão interelectrónica é incluída apenas através de um campo efectivo médio. Esta abordagem é designada por *aproximação orbital* e consiste em descrever cada electrão por uma função que depende apenas das suas coordenadas.

Uma vez escolhido o determinante, podemos recorrer ao princípio variacional para resolver a equação de Schrödinger. O princípio variacional diz-nos que qualquer função de onda aproximada tem uma energia superior ou igual ao valor real.

A resolução da equação de Schrödinger tem de ser feita iterativamente. Começa-se por estabelecer uma função hipótese com a qual se procede ao cálculo. A solução é então comparada à função inicial. A equação é resolvida de novo usando a solução anterior. O procedimento é repetido até que se atinja um valor de campo auto-consistente quando em duas iterações sucessivas as funções e a energia electrónica alcançam o critério de convergência previamente estabelecido.

### 3.2.3 Modelos de Hartree-Fock

As soluções da equação de Schrödinger no contexto da aproximação orbital são fornecidas pelo esquema de Hartree-Fock (HF) <sup>25, 26</sup>.

Se não forem impostas restrições às orbitais moleculares usadas para a construção do determinante de Slater, então este é escrito em termos de orbitais-spin sendo estas produto das orbitais espaciais pelas funções de spin. Neste caso obtém-se uma função

de onda não restrita - UHF (Unrestricted Hartree-Fock). A função de onda UHF atribui orbitais espaciais diferentes, para dois electrões numa mesma orbital. Em sistemas moleculares de camada fechada é possível restringir pares de electrões na mesma orbital espacial, um com spin  $\alpha$  e outro  $\beta$ . Este modelo é denominado Hartree-Fock restrito (RHF). Para sistemas de camada aberta, como por exemplo um duplete, forçar as orbitais moleculares  $\alpha$  e  $\beta$  a serem iguais é realmente uma restrição. Um electrão desemparelhado com spin  $\alpha$  irá necessariamente interagir de forma diferente com electrões  $\alpha$  ou  $\beta$ .

O esquema de Hartree-Fock restrito obriga a ocupação dupla de orbitais. Considera-se um número par de electrões,  $M$ , que se distribuem por  $M/2$  funções de coordenadas espaciais  $\phi_i$ .

Considerando o Hamiltoniano electrónico definido na equação 3.3 e a função de onda normalizada  $\Psi_{\text{ele}}$ , a resolução da equação de Schrödinger conduz à seguinte expressão para a energia electrónica total do sistema:

$$E = 2 \sum_i^{M/2} \langle \phi_i | h_i | \phi_i \rangle + \sum_i^{M/2} \sum_j^{M/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.7)$$

O termo  $J_{ij}$  designado *integral de Coulomb*, traduz a repulsão electrostática entre electrões  $a$ ,  $b$  nas orbitais  $i$  e  $j$  e é definido como:

$$J_{ij} = \left\langle \phi_i(a)\phi_j(b) \left| \frac{1}{r_{ab}} \right| \phi_i(a)\phi_j(b) \right\rangle \quad (3.8)$$

O termo  $K_{ij}$  designado por *integral de permuta* é definido segundo:

$$K_{ij} = \left\langle \phi_i(a)\phi_j(b) \left| \frac{1}{r_{ab}} \right| \phi_i(b)\phi_j(a) \right\rangle \quad (3.9)$$

O integral de permuta é nulo quando o spin dos electrões não são iguais.

De acordo com o princípio variacional é possível encontrar as funções  $\phi_i$  que minimizem a energia 3.7 mantendo a sua condição de ortonormalização, através das equações de Hartree-Fock:

$$\mathcal{F}\phi_i(a) = \varepsilon_i\phi_i(a) \quad (3.10)$$

O operador de *Fock*,  $\mathcal{F}$ , define-se como:

$$\mathcal{F}(a) = h(a) + \sum_{j=1}^N 2J_j(a) - \mathcal{K}_j(a) \quad (3.11)$$

sendo,

$$h(a) = -\frac{1}{2}\nabla_a^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{aA}} \quad (3.12)$$

Os operadores  $J$  e  $\mathcal{K}$  respectivamente de Coulomb e de permuta definem-se por sua vez:

$$J_j \phi_i(a) = \left\langle \phi_j(b) \left| \frac{1}{r_{ab}} \right| \phi_j(b) \right\rangle \phi_i(a) \quad (3.13)$$

$$\mathcal{K}_j \phi_i(a) = \left\langle \phi_j(b) \left| \frac{1}{r_{ab}} \right| \phi_i(b) \right\rangle \phi_j(a) \quad (3.14)$$

Os valores próprios da equação 3.10 são as energias das orbitais-spin dadas por:

$$\varepsilon_i = H_{ii} + \sum_{j=1}^{M/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.15)$$

A energia total do sistema é então:

$$E = 2 \sum_i^{M/2} \varepsilon_i - \sum_i^{M/2} \sum_j^{M/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.16)$$

A energia electrónica total do sistema não é o simples somatório das energias de todos os electrões nas suas orbitais-spin pois, desta forma, as interacções interelectrónicas seriam contabilizadas a dobrar. O segundo termo da equação 3.16 corrige este facto.

### 3.2.4 Método de Hartree-Fock-Roothaan

O procedimento de Hartree-Fock (HF) é implementado de forma relativamente simples no caso de átomos pois a simetria esférica destes permite que as equações de HF sejam resolvidas de forma numérica. No caso das moléculas a solução numérica não é computacionalmente acessível e é necessário usar uma técnica modificada. Roothaan<sup>27</sup> sugeriu representar as orbitais como uma combinação linear de um conjunto,  $p$  de funções de base,  $\chi_\mu$ :

$$\phi_i = \sum_{\mu}^p C_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (3.17)$$

Conhecidas as funções de base, os únicos parâmetros a determinar são os coeficientes  $C_{\mu i}$  o que simplifica consideravelmente o problema de cálculo.

As equações 3.10 são então transformadas nas equações Hartree-Fock-Roothaan que podem ser escritas como:

$$Fc = Sc\varepsilon \quad (3.18)$$

onde  $F$  é a matriz de Fock,  $c$  é uma matriz  $p \times p$  composta dos elementos  $C_{\mu i}$ ,  $S$  é a matriz de sobreposição entre orbitais atómicas e a sua presença indica-nos que as funções de base  $\chi_\mu$  não é necessariamente ortogonal. Por último  $\varepsilon$  é uma matriz diagonal cujos elementos são as energias das orbitais moleculares.

### 3.2.5 Funções de base

Os métodos *ab initio* fornecem informação através da resolução da equação de Schrödinger, sem recorrer à ajuda de dados experimentais. A resolução envolve o cálculo numérico de integrais que o tornam moroso. A complexidade está largamente associada à base de funções usada. A expansão de uma função desconhecida, tal como uma orbital molecular, num conjunto de funções conhecidas, não é por si só uma aproximação, desde que a base esteja completa. No entanto, o uso de um conjunto infinito de funções é computacionalmente impraticável e não permite que a energia de HF diminua mais do que um dado valor. Este valor de energia é conhecido como o *limite de Hartree-Fock*. O procedimento, habitual, para representar orbitais  $\phi_i$  consiste no uso de combinações lineares de um conjunto de  $p$  funções de base  $\chi_\mu$ .

$$\phi_i = \sum_{\mu}^p C_{\mu} \chi_{\mu} \quad (3.19)$$

Quanto maior for a semelhança entre as funções de base utilizadas e as orbitais menor será o número de funções necessárias. Sabendo que o esforço computacional dos métodos *ab initio* escala com  $P^4$  com o número de funções  $P$  é essencial reduzir o conjunto ao mínimo, sem comprometer a qualidade dos resultados. As funções de base mais utilizadas são de dois tipos:

#### ***Orbitais do tipo Slater***

Estas funções têm uma dependência exponencial na distância do electrão ao núcleo, que reflecte o comportamento das orbitais no átomo de hidrogénio. As funções de Slater não têm quaisquer nodos radiais. Os nodos são introduzidos efectuando combinações lineares de funções de Slater. A dependência exponencial assegura uma convergência relativamente rápida com o aumento de funções não sendo possível, porém, calcular integrais de três ou quatro centros analiticamente. As funções do tipo Slater são particularmente úteis em sistemas mono ou diatómicos onde é exigida elevada exactidão, ou em métodos semi-empíricos onde os integrais com três ou quatro centros são negligenciados.

O uso de apenas uma base mínima (o menor número possível de funções) num cálculo *ab initio* torna o processo menos rigoroso que o uso de, por exemplo, uma base “double zeta” (o dobro das funções necessárias).

### ***Orbitais do tipo Gaussiano***

As funções gaussianas foram usadas pela primeira vez por Boys<sup>28</sup> com o intuito de ultrapassar as dificuldades de cálculo de integrais bielectrónicos a vários centros, encontradas nas funções de base do tipo Slater. A principal vantagem destas funções deve-se ao facto de o produto de duas funções gaussianas, centradas em diferentes pontos, ser ainda uma gaussiana centrada num novo ponto. Esta circunstância facilita o cálculo de integrais bielectrónicos a vários centros. Em contrapartida as funções do tipo gaussiano representam de forma deficiente o comportamento junto ao núcleo, o que obriga ao uso de um maior número de funções. É comum combinar duas ou mais gaussianas com coeficientes fixos (primitivas), de modo a obter novas funções de base designadas por funções contraídas.

Esta contracção de primitivas tem a vantagem de usar menos funções de base modificadas de melhor qualidade reduzindo assim o processo iterativo de convergência.

No presente trabalho foram usadas funções de base do tipo gaussiano. As optimizações de estrutura foram realizadas com a base de funções 6-31G(d), com polarização apenas nos átomos pesados. O cálculo de energia do ponto zero foi efectuado com o mesmo nível teórico. A energia electrónica, dessas geometrias foi posteriormente determinada com uma base significativamente maior, 6-311++G (3df,3pd), que inclui polarização em todos os átomos, assim como o uso de funções difusas para todo o sistema. A razão do uso da primeira função para a optimização de geometria está relacionado com o processo computacional que é limitado pelo aumento de funções de base. No entanto este procedimento é perfeitamente aceitável, uma vez que, a energia do sistema é muito mais sensível ao número de funções de base que a optimização de geometria desse mesmo sistema.

### **3.2.6 Correlação electrónica**

As soluções da equação de Schrödinger geradas pelo método de Hartree-Fock consideram a repulsão interelectrónica como uma interacção média. A diferença entre a energia de Hartree-Fock e a mais baixa energia possível, para uma dada base, é

denominada *energia de correlação electrónica*. Fisicamente esta energia de correlação electrónica prende-se com o facto do movimento dos electrões estar correlacionado encontrando-se, em média, mais afastados que o previsto pela função de onda de HF. O facto de um dado electrão depender das posições instantâneas dos restantes é, até certo ponto, reproduzido pelo método não restrito de Hartree-Fock. Neste contexto o monodeterminante de Slater é usado como aproximação mas, as funções orbitais-spin são desdobradas em duas, acomodando assim os electrões com spins diferentes. O facto de os electrões  $\alpha$  não “sentirem” da mesma forma os electrões  $\alpha$  e  $\beta$  é, por si só, uma manifestação de correlação electrónica (embora de forma muito limitada!).

Os métodos *post-Hartree-Fock* incluem efeitos de correlação electrónica representando a função de estado com dois ou mais determinantes. De forma genérica uma função, composta por vários determinantes, pode ser escrita da seguinte forma:

$$\Psi = \sum_k a_k \Psi_k \quad (3.20)$$

Os métodos existentes diferem, fundamentalmente, na forma como os coeficientes são determinados. A introdução de mais de um determinante acarreta, evidentemente, um dispêndio computacional acrescido. Em alternativa aos métodos HF, e com uma crescente popularidade, na última década, encontramos a teoria do funcional de densidade. Neste trabalho, recorreu-se à teoria do funcional de densidade pelo que esta é apresentada, de forma breve, no próximo sub-capítulo.

### 3.2.7 Teoria do funcional de densidade

Pouco tempo após a formulação da mecânica quântica, em fins da década de 20, Thomas e Fermi<sup>29,30</sup> introduziram a ideia de exprimir a energia de um sistema como função da densidade electrónica total. Os modelos apresentados despertaram a curiosidade na época, mas foram rapidamente postos de parte devido aos resultados obtidos serem pouco satisfatórios. Em 1951 Slater<sup>31</sup> desenvolveu um método posteriormente denominado por  $X\alpha$  apresentado originalmente como um método aproximado da teoria de Hartree-Fock. Actualmente o método  $X\alpha$  é visto como o precursor da teoria do funcional de densidade.

Em 1956 surge o formalismo do funcional de densidade, DFT. Pierre Hohenberg e Walter Kohn<sup>32</sup> provaram que, para moléculas no estado fundamental, a energia desse estado, a função de onda e todas as propriedades electrónicas são determinadas por um funcional de densidade do sistema  $\rho(x,y,z)$ . Embora a teoria prove a existência de tal funcional a forma do mesmo não é conhecida. Em contraste com o formalismo de Hartree-Fock, que descreve os electrões individualmente interagindo entre si e com os núcleos, a DFT começa por considerar todo o sistema electrónico.

De acordo com a teoria do funcional de densidade a energia total é composta por três contribuições: energia cinética,  $E^T$ , devida ao movimento dos electrões, energia de Coulomb,  $E^V$ , devido às interações clássicas entre todas as partículas carregadas do sistema e, finalmente, um termo denominado de permuta e de correlação,  $E^{XC}$ , que engloba todas as interações restantes a vários centros.

$$E = E^T + E^V + E^{XC} \quad (3.21)$$

Esta decomposição é formalmente correcta mas o termo que descreve a permuta e correlação é desconhecido. O maior problema enfrentado pela DFT consiste em derivar fórmulas adequadas para este termo. Existem diversas metodologias para contornar esta limitação mas, antes de verificar como pode ser estabelecido este funcional, vamos admitir que ele é conhecido.

Dentro dos vários formalismos de DFT a teoria de Kohn-Sham<sup>33</sup> resolve um conjunto de equações muito semelhantes às de Hartree-Fock:

$$\left[ h_i(1) + \int \frac{\rho(2)}{r_{1,2}} d\tau_2 + \mathcal{V}_{XC}(1) \right] \phi_i' = \varepsilon_i \cdot \phi_i' \quad (3.22)$$

O primeiro termo da equação 3.22 corresponde à atracção dos N núcleos. O segundo a interacção electrostática com a densidade electrónica total  $\rho$  que pode ser dada por:

$$\rho = \sum_i^M |\phi_i'|^2 \quad (3.23)$$

Por último o termo  $\mathcal{V}_{XC}$  descreve o potencial de permuta-correlação (cuja forma é desconhecida). O termo de permuta-correlação deve incluir a correlação electrónica, os efeitos de permuta (correspondentes ao operador de permuta da teoria de Hartree-Fock) e um termo de correcção devido ao facto de se ter introduzido uma “auto-interacção” da orbital  $\phi_i$  no termo de interacção electrostática na equação 3.22.

As orbitais de Kohn-Sham  $\{\phi'_i\}$  não devem ser confundidas com as de HF pois, embora permitam o cálculo de  $\rho$  através da equação anterior, não têm qualquer significado físico.

Admitindo então que se conhece a forma do funcional, o problema que se segue é semelhante ao encontrado na teoria de Hartree-Fock: estabelecer um conjunto de orbitais ortogonais capazes de minimizar a energia correspondente. Na teoria do funcional de densidade, a densidade electrónica total é decomposta em densidades unielectrónicas que são construídas a partir de funções de onda monoelectrónicas. Embora o fim em vista da teoria de HF e DFT seja semelhante, existe uma diferença importante. Se o termo de correlação e permuta “exacto” fosse conhecido, então seria possível determinar a energia real do sistema incluindo a correlação electrónica. Assim sendo, os métodos de DFT têm a vantagem de incluir a correlação electrónica que constitui uma desvantagem do HF a um custo computacional idêntico. Esta afirmação é correcta para um termo de permuta e correlação aproximado. Não se sabe porém, se o termo exacto é igualmente resolúvel, em tempo útil, já que o funcional pode ser de tal modo complexo, que torne a sua aplicação incomportável tal como sucede com a resolução exacta da equação de Schrödinger.

Sabe-se que o termo de permuta e correlação,  $E^{XC}(\rho)$ , é totalmente determinado pela densidade electrónica. Na prática, é habitual dividir o termo  $E^{XC}$  em duas partes naturalmente designadas por permuta,  $E_X(\rho)$ , e correlação,  $E_C(\rho)$ :

$$E_{XC}(\rho) = E_X(\rho) + E_C(\rho) \quad (3.24)$$

Não é certo que esta separação seja uma hipótese válida. Os dois termos da equação 3.24 podem ser: funcionais locais que dependem apenas da densidade electrónica,  $\rho$ , ou funcionais de gradiente corrigido, função da densidade e simultaneamente do seu gradiente,  $\nabla\rho$ .

### ***Funcional de densidade local***

Na aproximação de densidade local (LDA) assume-se que a densidade pode ser tratada localmente como uma nuvem gasosa de electrões uniformemente distribuídos ou, de forma equivalente, a densidade é um funcional cuja variação é muito lenta. A energia de correlação e permuta para um gás electrónico uniforme é dado de forma geral por:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = E_X^{LDA}[\rho] + E_C^{LDA}[\rho] \quad (3.25)$$

O funcional de permuta local  $E_X^{LDA}$  é definido como:

$$E_X^{LDA}(\rho) = -C_x \int \rho^{4/3}(r) dr \quad (3.26)$$

onde  $C_x$  é uma constante numérica. Podemos encontrar na literatura várias expressões possíveis para o funcional de correlação local. Entre as mais populares estão o funcional de Vosco, Wilk e Nusair<sup>34</sup> e o funcional de Perdew<sup>35</sup>.

Esta aproximação consiste basicamente em considerar que, para um sistema num dado ponto, existe uma densidade electrónica bem definida. Assume-se que um electrão sente o mesmo campo produzido pelos restantes como se a densidade fosse a mesma em todo o sistema. A energia de permuta e correlação é então dada pelo integral a todo o espaço de contribuições infinitesimais de pequenos elementos de volume. A aproximação de densidade local é exacta para um metal perfeito (cuja densidade electrónica é constante) mas para sistemas com densidades electrónicas que variem significativamente em função das coordenadas espaciais, como é o caso de moléculas, os resultados obtidos com LDA são pouco credíveis.

### ***Funcional de gradiente corrigido***

Tendo em vista um melhoramento de qualidade foi proposto o uso de funcionais de permuta e de correlação, ambos dependentes não só da densidade electrónica mas também do seu gradiente,  $\nabla\rho$ .

Dos vários funcionais de permuta de gradiente corrigido, Becke formulou em 1988 um funcional de permuta baseado no funcional LDA:

$$E_{Becke88}^X = E_{LDA}^X - \gamma \int \frac{\rho^{4/3} x^2}{(1 + 6\gamma \sinh^{-1} x)} d^3r \quad (3.27)$$

Além dos funcionais de permuta corrigidos existem também funcionais de correlação de gradiente corrigidos. De entre os vários existentes pode ser referido a título de exemplo o desenvolvido por Lee, Yang e Parr <sup>36</sup>.

Para além dos métodos DFT, como o BLYP, que consistem da combinação de funcionais de permuta com funcionais de correlação existem também vários funcionais híbridos que resultam da combinação de funcionais de permuta-correlação da teoria de funcional de densidade com o termo de permuta de Hartree-Fock.

Alguns dos métodos híbridos mais usados, actualmente, são os funcionais desenvolvidos por Becke, cuja energia é dada por:

$$E_{XC}^{híbrido} = C_{HF} E_X^{HF} + C_{DFT} E_{XC}^{DFT} \quad (3.28)$$

onde  $C_{HF}$  e  $C_{DFT}$  são constantes.

Neste trabalho é utilizado um método híbrido com 3 parâmetros de Becke, (B3) associados com o funcional de correlação de gradiente corrigido de Lee, Yang e Parr, (LYP), o B3LYP <sup>36</sup>, que conduz a resultados mais exactos que os funcionais anteriores.

A utilização de DFT como alternativa ao HF, pode ser justificada pelo facto de a um custo computacional idêntico ao do Hartree-Fock, o DFT incluir efeitos de correlação. Em contrapartida nos métodos HF é conhecida a forma de melhorar progressivamente os resultados. Nas técnicas de Hartree-Fock o aumento de funções de base e a introdução de níveis sucessivamente superiores de correlação traduzem-se normalmente num aumento na qualidade dos resultados. Põe-se, no entanto, a questão do tempo computacional. Melhorar o funcional do DFT não conduz necessariamente a um acréscimo de tempo computacional. Porém, muitas vezes mesmo com o aumento da base de funções até ao limite, não se obtêm resultados exactos já que o funcional de permuta-correlação não é o correcto. O funcional de DFT, ao contrário do HF, só pode ser melhorado por comparação com resultados experimentais. Entre os vários

formalismos de DFT existentes, os de gradiente corrigido apresentam, geralmente, resultados melhores que os de densidade local.

Podemos ainda questionar se os métodos DFT podem ser considerados métodos *ab initio* ou não. Se o funcional de permuta-correlação fosse conhecido, então o método DFT de Kohn-Sham, seria de facto, um método *ab initio*. Porém, verificámos já que este funcional é desconhecido e a sua substituição por modelos como o gradiente corrigido pode fazer com que não se possa assim considerar. Alguns métodos de gradiente corrigido contêm parâmetros ajustados de forma a obterem-se os resultados mais concordantes possíveis com dados experimentais. Devemos notar que, embora isto seja por vezes feito, o número de parâmetros assim ajustados são em muito menor número do que no caso, por exemplo, dos métodos quânticos semi-empíricos. Outros funcionais são derivados totalmente a partir de métodos teóricos e nestas circunstâncias podem ser considerados *ab initio*.

### 3.3 Métodos Semi-empíricos

Atendendo às dimensões dos sistemas adoptados, no âmbito deste trabalho, optou-se por fazer uma primeira tentativa para o estabelecimento de geometrias chave (essencialmente estados de transição) com um método teórico mais acessível em termos de esforço computacional. Seguindo esta abordagem os métodos aplicados foram os semi-empíricos\*.

Os métodos *ab initio* apresentam um elevado custo computacional que se deve principalmente ao número de integrais bi-electrónicas necessários à construção da matriz de Fock. Os semi-empíricos reduzem o esforço computacional fazendo diminuir o número desses integrais. Estes métodos conservam a natureza quântica dado que se destinam à resolução da equação de Schrödinger, mas recorrem a parâmetros ajustados a resultados experimentais ou cálculos *ab initio* rigorosos.

Nos métodos semi-empíricos assume-se, geralmente, que os electrões das camadas mais internas dos átomos não têm intervenção directa. Apenas os electrões de valência são considerados para o cálculo, sendo os electrões do cerne contabilizados por potenciais que influenciam os electrões mais externos. Ainda como aproximação, os electrões de valência são representados por bases mínimas.

---

\* Evidentemente que todos os cálculos foram, posteriormente, refeitos com DFT. Os métodos semi-empíricos constituem, no entanto, uma ferramenta útil para nos familiarizarmos com o sistema em estudo.

Embora as simplificações anteriores reduzam o tempo de cálculo, o resultado não é satisfatório pelo que outras têm de ser feitas com vista a uma diminuição vantajosa. A principal aproximação utilizada nos métodos semi-empíricos é a da *sobreposição diferencial nula*<sup>37</sup> que ignora todos os produtos de funções dependentes das mesmas coordenadas electrónicas localizadas em átomos diferentes. Como consequência os integrais a vários centros são nulos. Para compensar este facto são introduzidos parâmetros empíricos. O número de integrais negligenciados e a forma como a parametrização é feita diferencia os vários métodos semi-empíricos.

O CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) negligencia todos os integrais bieléctrónicos mesmo quando orbitais atómicas diferentes pertencem ao mesmo átomo.

O INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap) é um melhoramento do CNDO e não negligencia as interacções de repulsão a um centro.

O NDDO (Neglect of Differential Overlap) considera nulos os integrais bieléctrónicos apenas quando as orbitais atómicas de um dado electrão pertencem a átomos diferentes.

Estes métodos foram construídos para reproduzir tão bem quanto possível os resultados de um cálculo HF com uma base mínima. Tal como seria de esperar, eles serão tão exactos quanto o rigor de um cálculo com uma base mínima. Sabendo que um método semi-empírico está profundamente dependente da qualidade dos dados a que é feito o ajuste dos parâmetros, quanto melhor esse conjunto representar as propriedades pretendidas, melhor será o método.

As diferentes parametrizações originam diferenças dentro de um mesmo método sendo assim possível dividi-los em grupos, de acordo com o fim a que se destinam. As versões CNDO1<sup>38</sup>, CNDO2<sup>39</sup>, INDO<sup>40</sup> e NDDO<sup>41</sup> destinam-se à reprodução dos resultados obtidos por métodos *ab initio*. As várias versões do método MINDO (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap)<sup>42, 43, 44</sup>, e do MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap)<sup>45</sup> o AM1 (Austin Model 1)<sup>46</sup> e o PM3 (Parametric Method number 3 do MNDO, sendo o AM1 as versões 1 e 2)<sup>47</sup> visam a reprodução de resultados experimentais de certas propriedades moleculares.

Dos métodos conhecidos, neste contexto, foi utilizado o PM3 implementado no Gaussian98<sup>48</sup>. Este método foi desenvolvido a partir da parametrização de MNDO. A evolução do PM3 relativamente ao MDNO consiste em efectuar o ajuste de parâmetros por um processo automático desenvolvido por Stewart<sup>47</sup>. É possível, assim, uma

optimização simultânea obtendo-se o melhor conjunto de parâmetros para um dado conjunto de dados experimentais. Apesar da automatização do processo, é ainda necessária intervenção humana para efectuar a selecção de dados experimentais e para atribuir diferentes pesos a cada conjunto de dados.



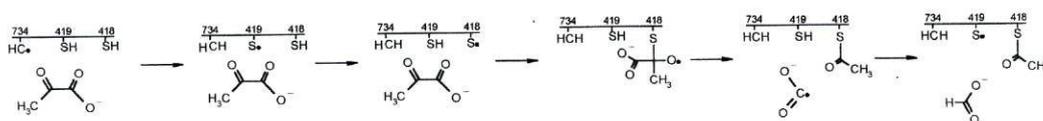
## ***Resultados e discussão***

## 4. Capítulo 4

### 4.1 Introdução

No capítulo 2 encontramos várias propostas de mecanismo para a conversão do piruvato em formato catalisado pela PFL. Das propostas apresentadas, o mecanismo proposto por Kozarich em 1999<sup>12</sup> foi posteriormente estudado por DFT por Himo e Eriksson<sup>21</sup> utilizando para isso modelos neutros para representar o substrato, piruvato.

No presente trabalho foi efectuado um estudo do mecanismo catalítico da enzima com DFT tendo como referência o mecanismo proposto pelo grupo de trabalho de Knappe<sup>11</sup>.



Esquema 3 – Mecanismo da PFL com uma nova função atribuída à cisteína 418<sup>11</sup>.

As principais diferenças introduzidas neste mecanismo estão relacionadas com a participação da cisteína 418 que anteriormente<sup>6, 17, 19</sup> tinha apenas um papel fundamental na segunda parte do mecanismo.

As perspectivas futuras são optimistas quanto à possível utilização de toda a enzima por meio de métodos híbridos<sup>49-52</sup>. Estes seccionam o sistema permitindo que a parte com maior relevância seja estudada com um elevado nível teórico e o restante sistema com um método computacionalmente mais acessível. No presente trabalho porém, para iniciar o estudo deste sistema, optou-se por representar apenas uma pequena parcela da enzima que se crê reproduzir convenientemente o sistema real. A veracidade desta afirmação só poderá ser comprovada quando, num futuro próximo, se completar o estudo com toda a enzima. Esperamos, porém, que se o modelo for adequado a inclusão de toda a enzima não deverá conduzir a diferenças significativas nos resultados.

Estabelecida a abordagem escolhida resta agora identificar os modelos usados e as razões para a sua escolha.

## 4.2 Modelos usados para representar a enzima piruvato formato liase.

A forma activa da enzima contém um radical localizado na glicina 734, aminoácido este que se situa no centro activo. Verificou-se que este radical apresenta uma estabilidade extraordinária. Por esta razão, o modelo usado deve ser cuidadosamente escolhido já que a deslocalização de spin é muito elevada. Num estudo realizado por Himo e Eriksson<sup>21</sup> verificou-se que é importante que não só a glicina seja incluída mas, também, parte dos resíduos vizinhos para assim reproduzir convenientemente a deslocalização dos electrões  $\pi$ . O modelo recomendado CHO-NH-CH-CO-NH<sub>2</sub> (figura 8) apresenta um valor de spin no carbono  $\alpha$  ligeiramente sobrestimado relativamente a dados experimentais (valor calculado 0,68; valor experimental 0,55). Uma das razões que podemos apontar para esta discrepância poderá estar relacionada com o equilíbrio do radical entre a glicina e a cisteína 419 vizinha<sup>17</sup>. Este processo poderá induzir uma deslocalização adicional para a cisteína. Se observarmos a estrutura otimizada da glicina radicalar na presença de uma cisteína verificamos que o valor de spin no carbono  $\alpha$  se mantém praticamente igual (0,69) e concluimos que provavelmente seria necessário aumentar o tamanho da cadeia para melhor reproduzir a deslocalização de spin. O mesmo estudo, referido anteriormente, revela que a energia de dissociação C $\alpha$ -H com este modelo é a esperada. Dado ser este o fenómeno que estamos interessados em observar parece razoável não aumentar o tamanho do sistema de modo a manter o custo computacional ao mínimo.

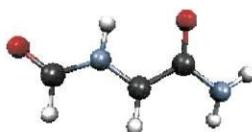


Figura 8- Modelo usado na representação da glicina radicalar.

Além da glicina sabe-se que duas cisteínas têm um papel fundamental no mecanismo desta enzima<sup>4</sup>. O estudo realizado por Himo e Eriksson demonstra que o aumento da cadeia alquilo ligada ao grupo SH conduz a alterações mínimas na energia de ligação S-H. Também o spin localizado nas partículas  $\cdot$ SH,  $\cdot$ SHCH<sub>3</sub>,  $\cdot$ SHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> e em toda a cisteína é de 1.03, 0.98, 0.98 e 0.98 respectivamente, pelo que se conclui que o modelo SHCH<sub>3</sub> é uma representação adequada de uma cisteína. Para além deste modelo e, por razões que serão esclarecidas posteriormente, pensou-se em aplicar também um modelo com as duas cisteínas adjacentes ligadas. Na figura 9 podemos ver

a estrutura otimizada das cisteínas 418 e 419 com o radical localizado na cisteína 419. Neste caso verificamos que o valor de spin é de 0.97.

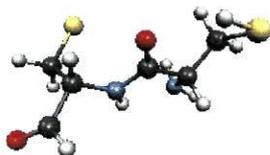


Figura 9 – Estrutura otimizada das duas cisteínas com o radical localizado na cisteína 419.

Definido o centro activo falta ainda caracterizar um modelo para o substrato, o piruvato. No trabalho apresentado pelos cientistas referidos anteriormente todos os cálculos foram efectuados usando modelos neutros, isto é, o piruvato foi representado por ácido pirúvico e o formato por ácido fórmico. As razões apontadas para esta escolha relacionam-se com dificuldades de convergência nos cálculos, devidas a um excesso de interações coulombicas. No presente trabalho foram preteridos os modelos neutros e em substituição usou-se o piruvato e o formato.

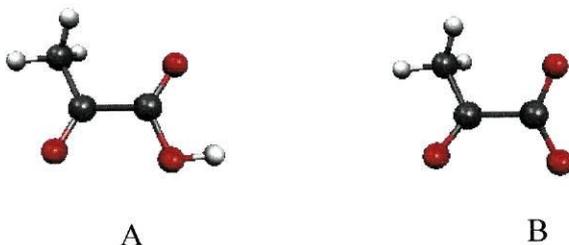


Figura 10 – Modelos usados para (A) ácido pirúvico e (B) piruvato.

#### 4.2.1 Modelos neutros

O uso de modelos neutros em fase gasosa está relacionado com o comportamento artificial, criado por partículas carregadas que em solução são estabilizadas pelo solvente. Um caso interessante foi apresentado por Per Siegbahn num estudo do processo de Wacker<sup>53</sup>. O primeiro passo envolve uma adição nucleófila de um grupo hidróxilo a um ligando etileno. O grupo OH<sup>-</sup>, tal como se poderia esperar, conduz a resultados desviados da realidade já que, para partículas tão densamente carregadas, a solvatação é muito importante. Siegbahn verificou que a repetição da experiência com várias moléculas de água revela uma maior concordância com resultados experimentais. Podemos concordar que a simulação de partículas com elevada densidade de carga, em fase gasosa, deve ser feita com algum sentido crítico já que a inexistência do processo

de estabilização por parte do solvente pode conduzir a desvios do comportamento real do sistema.

Himo e Eriksson no trabalho publicado sobre o mecanismo da PFL seguiu esta linha de pensamento e introduziu todos os modelos sem carga.

#### 4.2.2. Modelos carregados

Embora as afirmações anteriores pareçam lógicas a escolha de modelos neutros ou não para sistemas mais complexos deve ser feita com algum cuidado. A escolha de uns em detrimento de outros deve ser sustentada por resultados experimentais e seguindo um raciocínio químico do que será mais adequado para as condições em causa.

No presente trabalho foram realizadas uma série de novas experiências com modelos carregados. Ao contrário daquilo que foi feito por Himo e Eriksson, neste trabalho o uso do ácido pirúvico deve-se não à simplificação do cálculo, mas porque tentamos estabelecer que o substrato possa encontrar-se na forma ácida. Outro estudo muito importante consiste do ataque directo do radical tiolo ao piruvato na forma aniónica. É possível constatar diferenças significativas na transição do modelo neutro para carregado. Face aos resultados obtidos é proposta uma nova alternativa de mecanismo. O uso de modelos carregados parece neste contexto mais apropriado, já que não é esperada uma grande estabilização por parte do solvente e, em acréscimo, os resíduos que poderiam ter um papel estabilizante são as argininas 176 e 435, que se encontram afastadas, e a cisteína vizinha que é introduzida no modelo maior.

### 4.3 Reacções químicas

Antes de seguir para os mecanismos de reacção estudados neste trabalho, é importante fazer uma pequena referência ao conceito de reacção química em termos teóricos.

O curso de uma reacção química é determinado pela função de energia potencial para o movimento nuclear. A superfície de energia potencial (PES) de um dado sistema é estabelecida por resolução da equação de Schrödinger electrónica para um grande conjunto de configurações electrónicas. Tal como seria de esperar, esta tarefa é apenas exequível no caso de sistemas com um número muito limitado de átomos. Os sistemas estudados neste trabalho têm um número elevado de átomos, o que torna esta abordagem impossível. Como alternativa procuramos encontrar apenas as componentes

mais importantes da superfície. Todos os pontos com as primeiras derivadas nulas são estados estacionários. Um estado estacionário pode ser um mínimo, um máximo ou um ponto de sela. Os máximos têm pouco interesse do ponto de vista químico. Os mínimos locais correspondem a reagentes, produtos ou intermediários. Um intermediário corresponde ao produto de um passo elementar e ao reagente num passo elementar subsequente. Estas estruturas são, muitas vezes, muito reactivas com um tempo de vida muito curto. Um ponto de sela é identificado como um mínimo relativamente a todas as coordenadas menos uma. Para determinar a natureza de um estado estacionário é necessário avaliar as derivadas de segunda ordem. Estas derivadas são usadas para calcular as  $3N-6$  frequências de vibração (ou  $3N-5$  no caso de moléculas lineares). Num mínimo local todas as frequências de vibração são números reais. O estado de transição (que é um caso particular de um ponto de sela) é caracterizado por ter todas as frequências positivas menos uma, que é uma frequência imaginária. Um ponto de sela com mais de uma frequência imaginária não é um estado de transição.

Como foi referido, o estudo de uma superfície de energia potencial para um sistema com mais de 4 ou 5 átomos é impraticável. Em alternativa podemos estudar os estados estacionários correspondentes a uma dada coordenada de reacção. A coordenada de reacção leva os reagentes e produtos que têm a mais baixa energia possível pelo estado de transição onde a energia tem um máximo. Uma vez encontrado um estado de transição é necessário determinar a natureza dos reagentes e dos produtos seguindo o percurso de energia mínima, vulgarmente designado por coordenada de reacção intrínseca (IRC). De acordo com este método, o sistema é deslocado a partir do estado de transição para os reagentes (ou produtos) segundo a coordenada da reacção com velocidade infinitesimal.

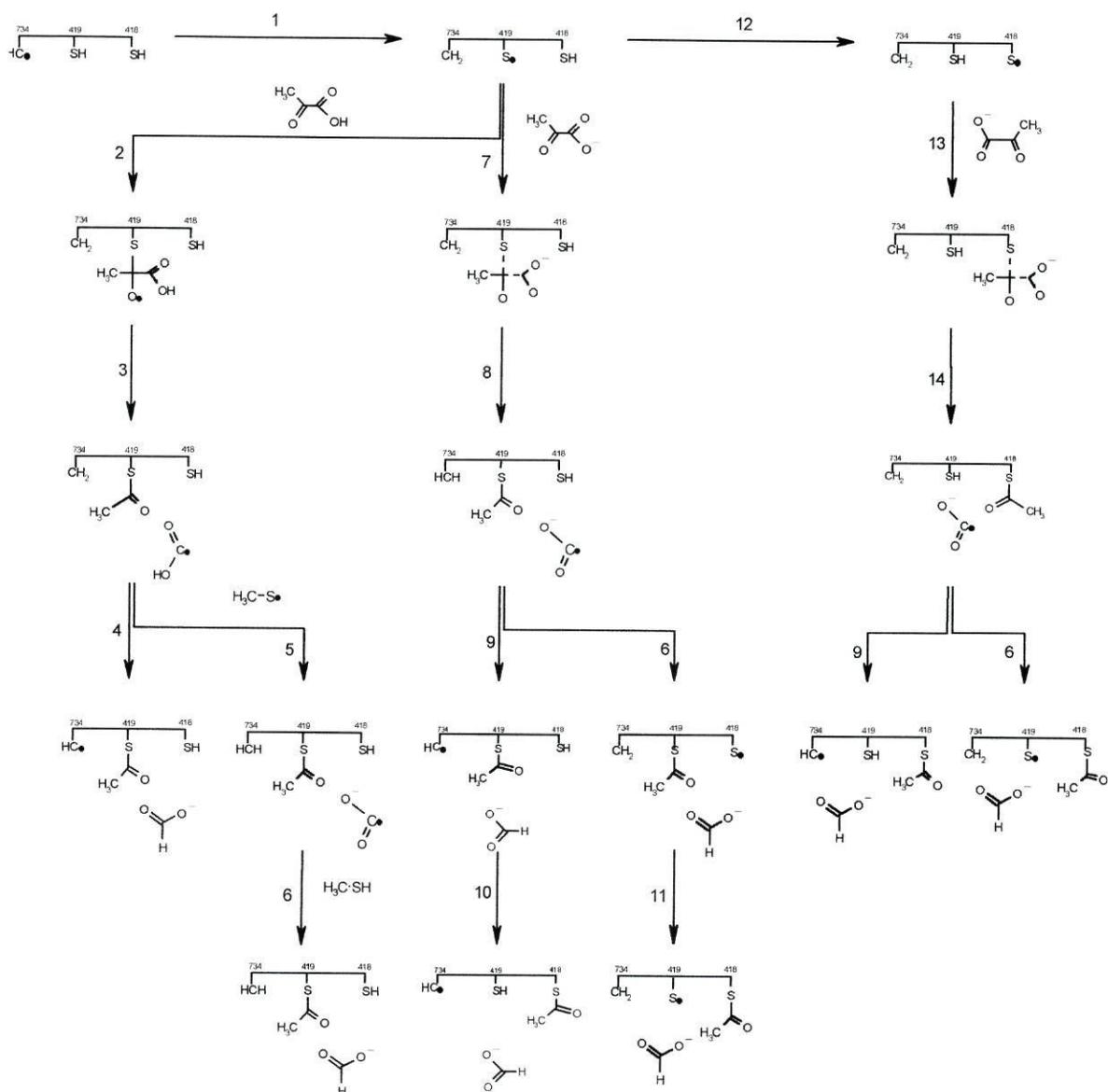
O estado de transição governa a cinética do sistema condicionando a conversão dos reagentes em produtos. A diferença de energia entre o estado de transição e os reagentes é designado por energia de activação.

#### **4.4 Possibilidades de mecanismo estudados neste trabalho.**

Foi já referido que o mecanismo proposto por Knappe em 1999<sup>11</sup> é utilizado como ponto de referência para o estudo desenvolvido neste trabalho. Knappe propõe uma transferência de hidrogénio da cisteína 418 para a glicina 734 via C<sup>419</sup>. A cisteína 418 radicalar adiciona então ao carbono 2 do piruvato. Liberta-se finalmente o radical

formilo que remove um átomo de hidrogénio à C<sup>419</sup> originando o produto. Tendo isto em mente, assim como todos os dados experimentais reportados até ao momento, foi elaborado um esquema de trabalho de modo a incluir todas as alternativas de mecanismo.

No esquema 9 podemos observar as várias alternativas de mecanismo que foram investigadas neste trabalho.



Esquema 9 – Propostas de mecanismo exploradas neste trabalho.

1. Transferência de hidrogénio da cisteína 419 para a glicina 734.
2. Adição da cisteína ao ácido pirúvico.
3. Saída do grupo HOCO•.

4. Rearranjo do grupo  $\text{HOCO}^\bullet$  originando o produto da reacção.
5. Saída do átomo de hidrogénio do  $\text{HOCO}^\bullet$  para uma cisteína.
6. Formação do formato.
7. Adição da cisteína ao piruvato.
8. Saída do radical formilo.
9. Remoção de hidrogénio pelo radical formilo à glicina.
10. Transesterificação por ataque nucleófilo directo da cisteína não radicalar ao carbono carbonilo do acetilo.
11. Transesterificação homolítica.
12. Transferência de hidrogénio da cisteína 418 para a cisteína 419. Este processo é estudado usando os dois sistemas para as cisteínas.
13. Ataque da cisteína 418 ao piruvato.
14. Saída do radical formilo.

Começa-se por analisar o mecanismo proposto por Himo e Eriksson recorrendo a modelos neutros admitindo que o piruvato se possa encontrar na forma ácida. Posteriormente o mesmo estudo é desenvolvido mas com os modelos carregados e por fim, recorreu-se também a um modelo para as cisteínas que inclui parte da cadeia principal da enzima. Deste modo é possível distingui-las permitindo que se estude directamente o comportamento da  $\text{C}^{418}$  na presença do piruvato.

No presente capítulo é feita uma descrição minuciosa de cada passo estudado com observação dos diferentes estados de transição, distâncias chave e estruturas optimizadas com respectivas energias. A descrição encontra-se dividida de acordo com o esquema 9.

#### **4.5 Transferência de hidrogénio da cisteína 419 para a glicina 734<sup>‡</sup> (passo 1).**

Estudos realizados por EPR revelam inequivocamente que a PFL activa contém um radical na glicina 734<sup>6</sup>. Geralmente a activação ocorre num resíduo afastado do centro activo porém, neste caso particular, a glicina encontra-se localizada no centro reactivo da enzima. Todos os estudos publicados, até ao momento, sobre o mecanismo catalítico da PFL<sup>6, 11, 17, 19, 21</sup>, são unânimes em afirmar que o primeiro passo é uma

---

<sup>‡</sup> Este processo assim como o passo 2 (com o modelo  $\text{HSCH}_3$ ) e o 12 foram também realizados por Himo e Eriksson<sup>21</sup>.

transferência de hidrogénio da cisteína 419 para a glicina 734. Assim sendo, parece natural que se comece por este passo. É também a razão porque este processo é comum a todos os mecanismos apresentados no esquema 9.

O sistema utilizado consiste da glicina radicalar e uma cisteína na forma HSCH<sub>3</sub> (figura 11). O modelo com as duas cisteínas não é utilizado neste processo dado o tamanho do sistema em causa que tornaria o cálculo demasiado exigente em termos de tempo computacional. Não é esperado, de qualquer das formas, que a inclusão do segundo resíduo tivesse influência significativa no processo de transferência.

Podemos observar na figura 11 que os reagentes apresentam uma energia inferior à dos produtos o que é compatível com a localização preferencial do radical na glicina<sup>4,11</sup>. O processo é endotérmico com uma barreira de activação de 12.39 kcal/mol.

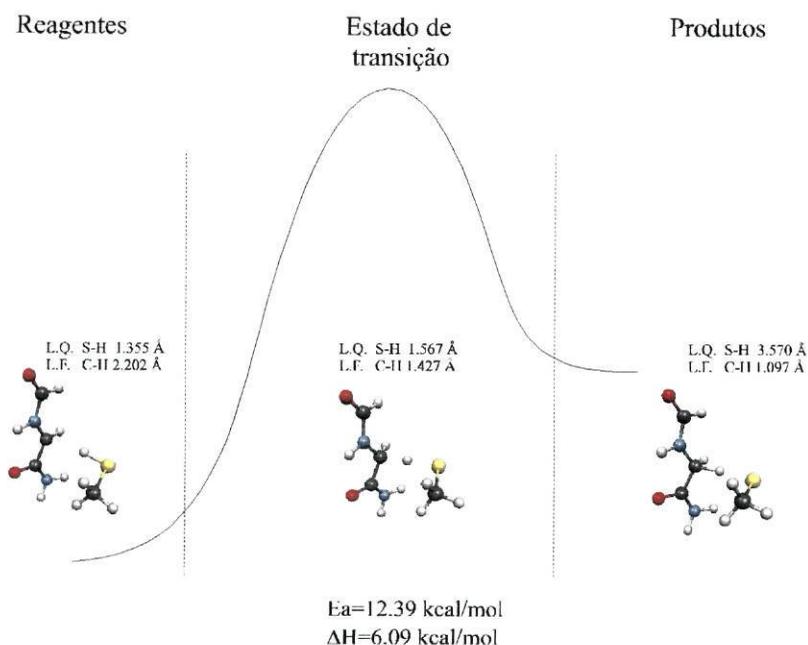
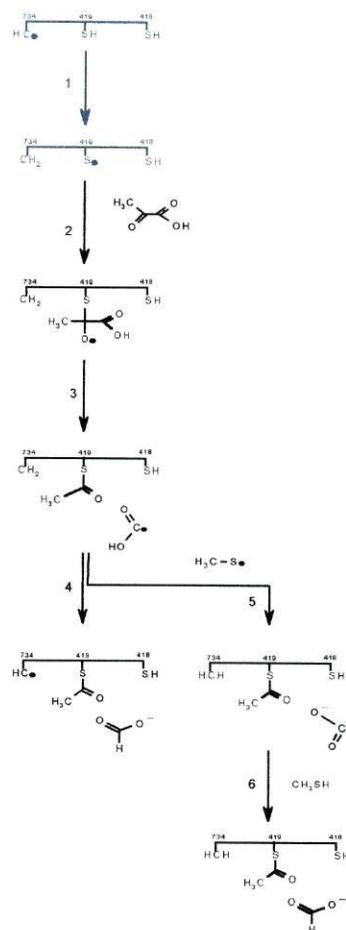


Figura 11- Representação da variação de energia correspondente à transição de um átomo de hidrogénio entre a cisteína 419 e a glicina 734. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição e produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma. Ea designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.



É importante notar que a curva da figura 11 não é na realidade um gráfico de energia potencial, mas sim uma representação esquemática da tendência observada para o passo em questão<sup>§</sup>. Os cálculos realizados incluem otimização da estrutura dos reagentes, estado de transição e produtos. Uma vez otimizado o estado de transição, a simples observação da animação do modo normal de vibração associado à coordenada interna maximizada, revela da forma inequívoca que se trata do estado de transição pretendido. Para além desta evidência realizou-se também um cálculo de coordenada de reacção intrínseca seguida de optimização. O processo completo é essencial quando não existe certeza perante o estado de transição encontrado. No caso das estruturas presentes neste trabalho, a presença de isómeros conformacionais não é fonte de preocupação dada a natureza simples dos modelos.

#### 4.6 Adição de uma cisteína ao ácido pirúvico (passos 2 e 3).

Embora não existam quaisquer evidências experimentais que prevejam que o piruvato se possa encontrar na forma ácida, o trabalho realizado por Himo e Eriksson utiliza sempre o substrato nessa forma. As razões apresentadas para tal procedimento não estão relacionadas com a possibilidade física da espécie se encontrar nessa forma mas, sim, com questões técnicas. A presença de espécies carregadas traduz-se em dificuldades na convergência de cálculos, tornando-se mais difícil a optimização de estruturas. Neste trabalho não excluimos, porém, a possibilidade da espécie poder, de alguma forma, encontrar-se na forma ácida. Por observação da estrutura cristalográfica da PFL verificamos que o resíduo em posição mais favorável para fornecer um átomo de hidrogénio ao piruvato é a cisteína 419<sup>11</sup>.



Figura 12- Formação de ácido pirúvico a partir da cisteína 419

Podemos ver na figura 13 que a permuta de hidrogénio ocorre sem transposição de uma barreira energética. Há, no entanto, um incremento progressivo de energia, de onde se conclui que esta reacção não tem tendência para ocorrer.

<sup>§</sup> O mesmo se aplica aos restantes diagramas presentes neste capítulo que não apresentem escala de energia.

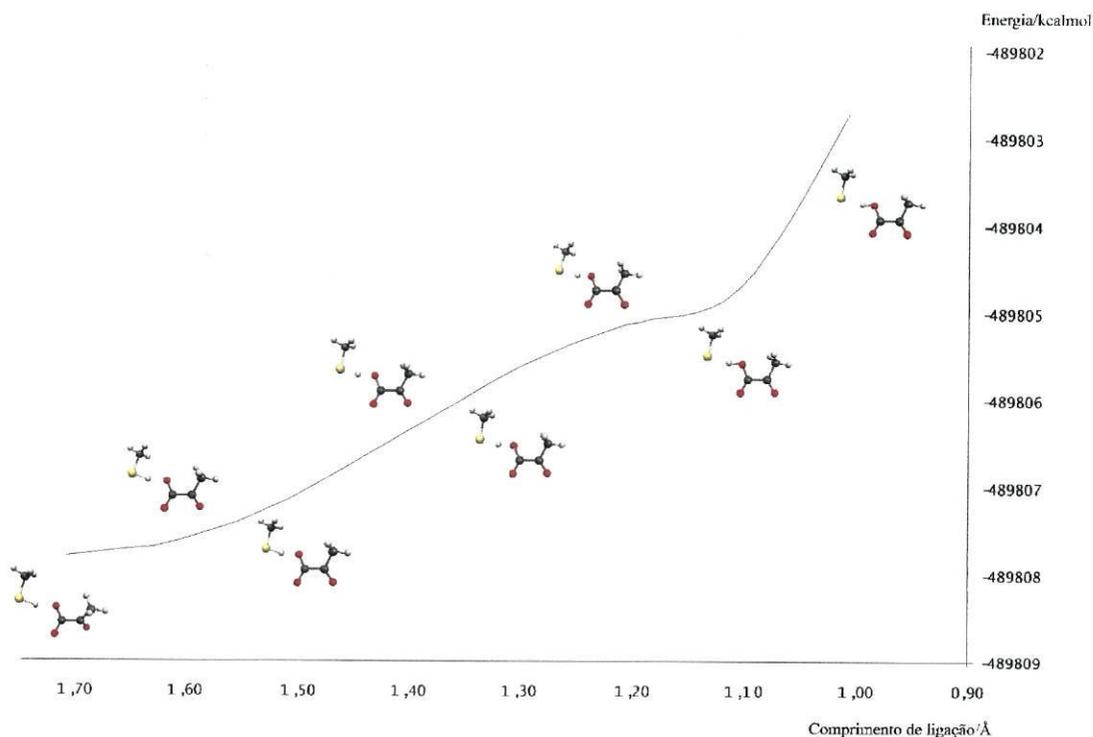
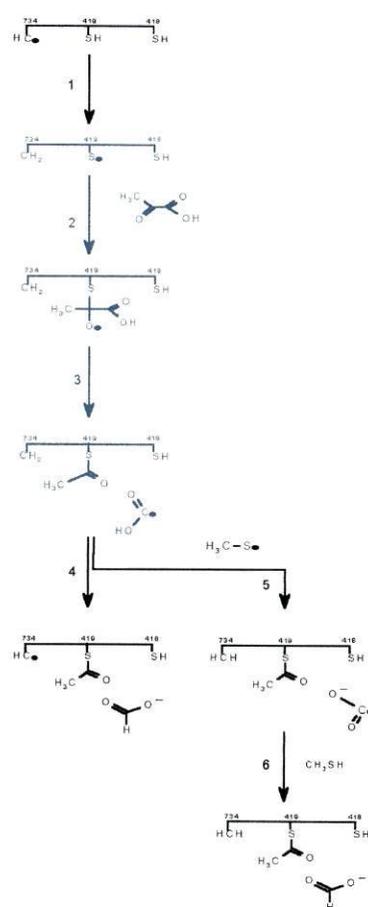


Figura 13- Diagrama que representa a curva de energia correspondente à transição de um átomo de hidrogénio entre a cisteína 418 e o piruvato. O cálculo foi efectuado por aproximação progressiva do átomo de hidrogénio a um oxigénio carbonilo do piruvato. Os valores de energia foram calculados para cada geometria apresentada. Todas as distâncias no eixo das abcissas referem-se à distância hidrogénio-oxigénio para a estrutura representada.

Apesar do passo anterior revelar que a forma ácida do piruvato é desfavorável e o pKa de 2.5 em meio aquoso sustentar esta preferência, achou-se interessante efectuar um estudo com o ácido pirúvico admitindo que se possa desconhecer algum processo de protonação. Neste contexto, o estudo foi realizado fazendo uso de uma cisteína na forma  $\cdot\text{SCH}_3$  não atribuindo a qualquer cisteína o papel preferencial. A adição da cisteína radicalar ao ácido pirúvico ocorre em dois passos: uma primeira aproximação da cisteína ao carbono  $\alpha$ , originando um intermediário tetraédrico seguida da saída do grupo  $\text{HCOO}^\bullet$ , acompanhada por uma segunda barreira de activação. Podemos observar na figura 14 que a reacção global é ligeiramente endotérmica.

O primeiro estado de transição é muito semelhante aos reagentes, apenas se observa uma aproximação do átomo de enxofre radicalar ao ácido pirúvico. O facto de



também no intermediário tetraédrico esta ligação se manter num comprimento fixo torna evidente que ocorre, primeiro, formação da ligação C-S e, só então, se quebra a ligação C-C. No segundo estado de transição a ligação C-C começa a distender-se aumentando o comprimento de ligação até que os produtos se formem. Simultaneamente a ligação em formação atinge o comprimento típico de uma ligação C-S.

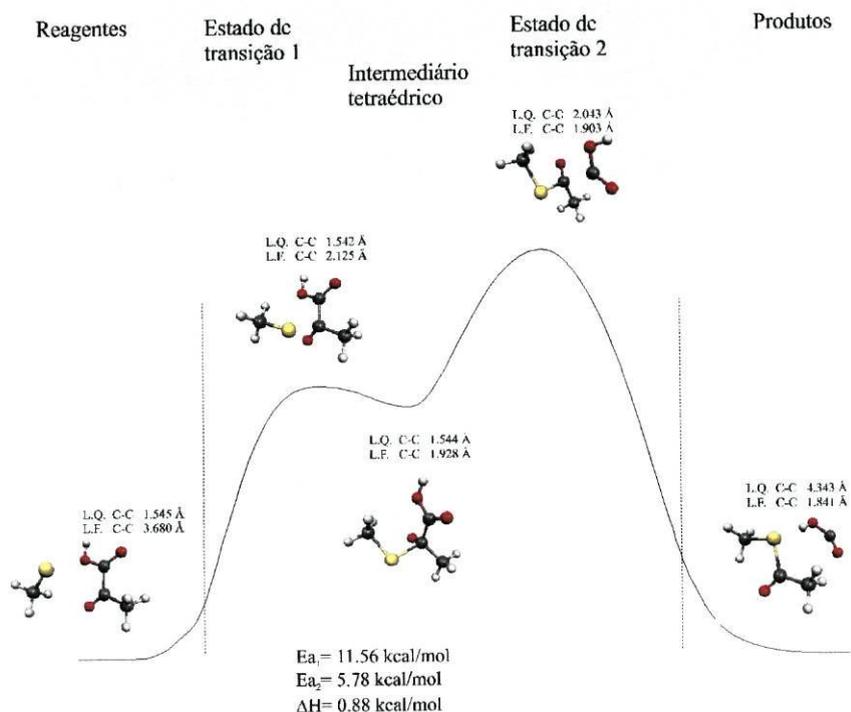
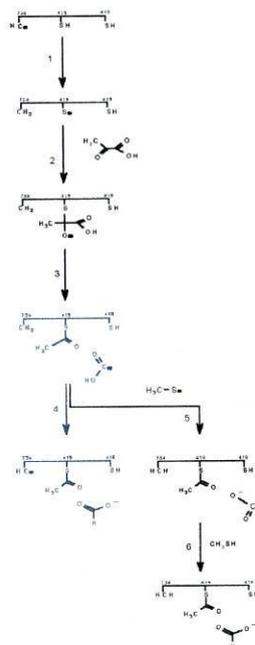


Figura 14- Diagrama que representa a variação de energia correspondente à permuta do grupo acetilo do ácido pirúvico para uma cisteína. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes; primeiro estado de transição, intermediário tetraédrico e segundo estado de transição; produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma.  $E_a$  designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

#### 4.7 Rearranjo do grupo $\text{HCOO}^\bullet$ (passo 4).

O produto da reacção descrito no passo anterior é o ácido fórmico. Sabe-se, contudo, que o produto real da reacção é o formato. A transformação poderá ocorrer por duas vias. O passo 4 propõe um rearranjo do átomo de hidrogénio.

Podemos observar, na figura 15, que o processo é bastante exotérmico porém a barreira de activação é demasiado elevada, dada a velocidade específica da reacção determinada experimentalmente<sup>3</sup> (13.5 kcal/mol).



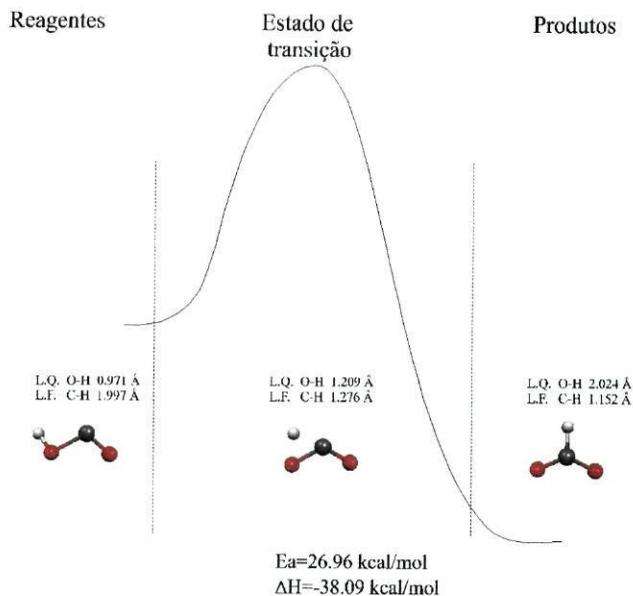
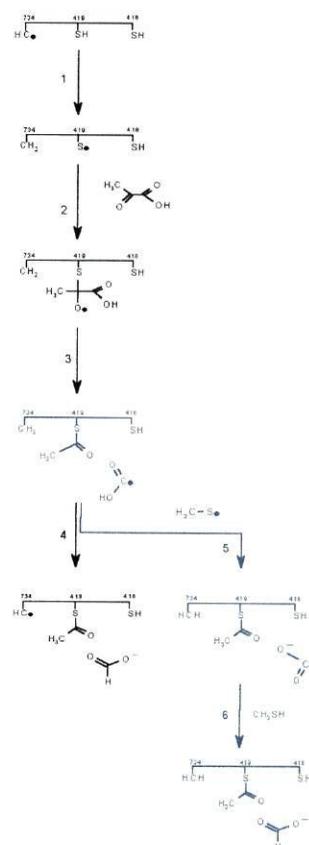


Figura 15- Representação da variação de energia correspondente à transição do átomo de hidrogénio ácido para o carbono adjacente. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição, produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma.  $E_a$  designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

Confrontados com este resultado podemos excluir desde já esta alternativa de mecanismo.

#### 4.8 Saída do átomo de H para uma cisteína e formação do produto (passos 5, 6).

Verificámos já que uma transferência interna do átomo de hidrogénio no grupo de saída é desfavorável. Se pensarmos noutra alternativa para obtermos o produto podemos averiguar a possibilidade de devolver o átomo de hidrogénio a uma cisteína vizinha. Admitindo que possa na realidade existir uma cisteína disponível, o processo ocorre na ausência de barreira de activação. Mais uma vez não sendo possível isolar um estado de transição efectuou-se um varrimento na coordenada que liga o átomo de hidrogénio ácido a uma cisteína radicalar. Podemos ver na figura 16 que o processo é espontâneo e a transferência do protão do grupo  $\text{HOCO}^\bullet$  para a cisteína é de facto possível. Assim sendo passamos a averiguar se o radical formilo pode remover um átomo de hidrogénio à mesma cisteína.



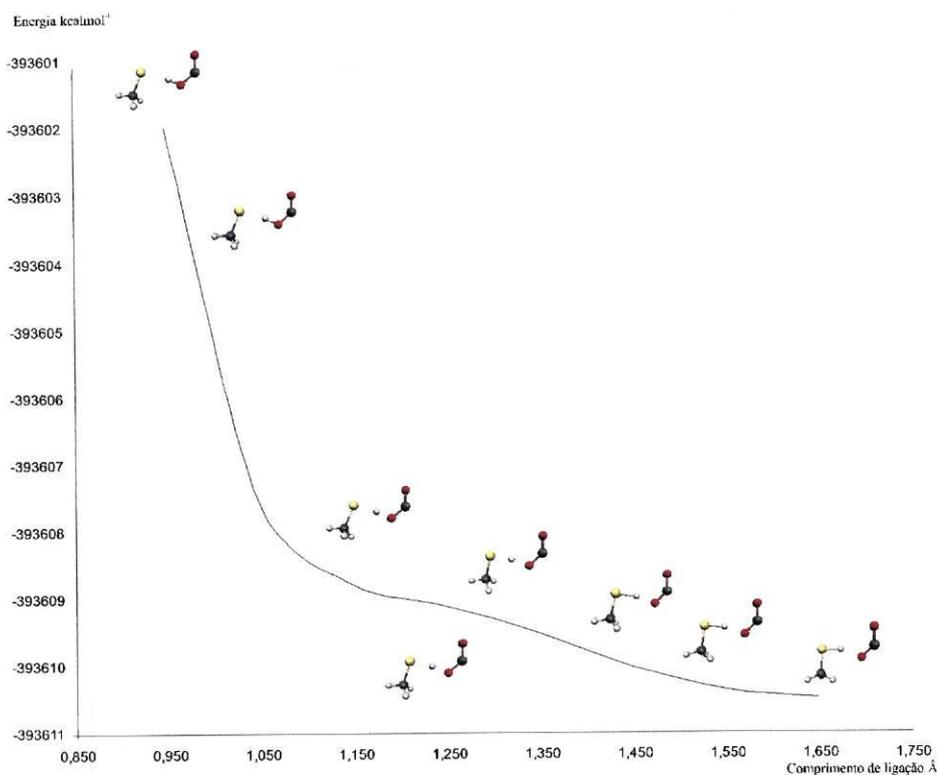


Figura 16- Diagrama que representa a curva de energia correspondente à transição de um átomo de hidrogênio entre o ácido fórmico e uma cisteína. O cálculo foi efectuado por aproximação progressiva do átomo de hidrogênio ao átomo de enxofre de cisteína. Os valores de energia foram calculados para cada geometria apresentada. Todas as distâncias referem-se às geometrias em causa.

A devolução do átomo de hidrogênio a partir de uma cisteína é também espontânea.

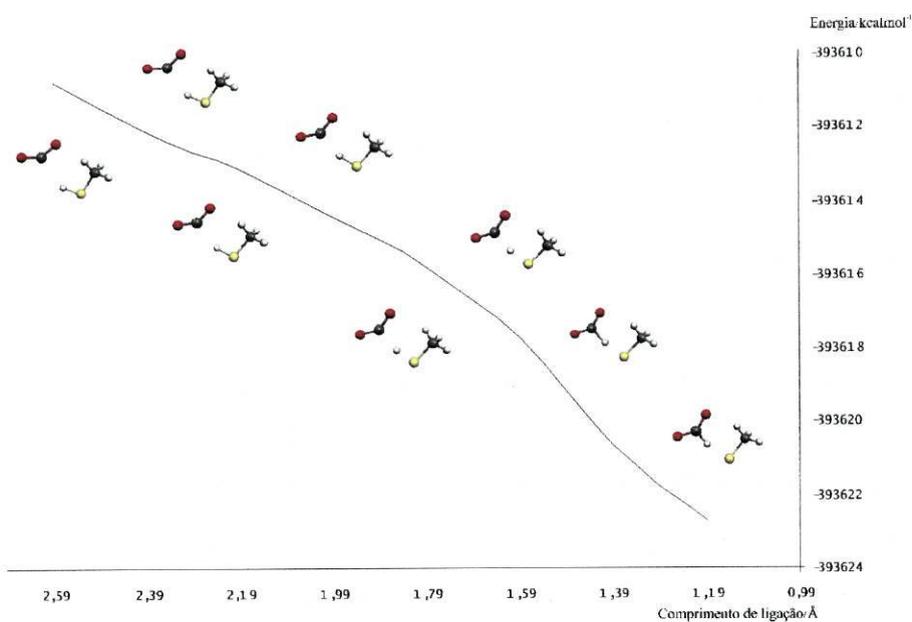


Figura 17- Representação da variação de energia correspondente á remoção de um átomo de hidrogênio por parte do grupo formilo a uma cisteína. Os valores em abcissas corresponde à distância carbono hidrogênio que é reduzida progressivamente.

A observação da estrutura cristalográfica indica-nos que não existem outras cisteínas próximas do centro activo além das duas já conhecidas (418 e 419) nem, tão pouco, outros resíduos já que os mais próximos são duas argininas que se encontram a cerca de 5 Å. As cisteínas que constituem o centro activo não se encontram disponíveis pois, nesta altura, uma encontra-se acetilada e outra contém já um átomo de hidrogénio. É pouco provável que este mecanismo possa apresentar-se como uma alternativa viável pois são muitas as condições que têm de ser satisfeitas. Se o sistema puder escolher outra alternativa simples de reacção esta possivelmente será posta de parte, porém não existem garantias que este não possa ser, na realidade, o percurso seguido.

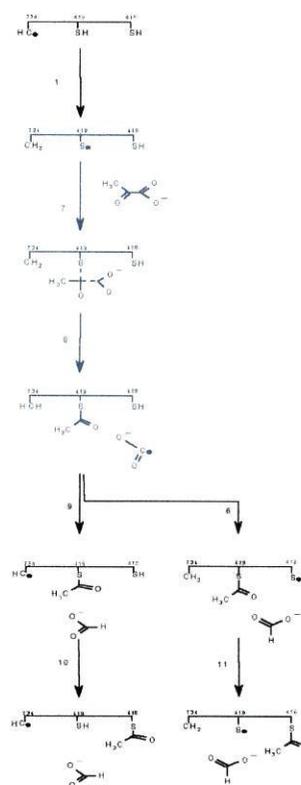
Quando Himo e Eriksson usaram o modelo neutro para representar o substrato essa escolha estava relacionado com problemas de cálculo. Neste trabalho o estudo com ácido pirúvico é sustentado pela eventualidade desta espécie poder ocorrer ao longo da reacção. No entanto todas as evidências apontam em sentido contrário e, embora se pudesse estabelecer um mecanismo para a conversão de ácido pirúvico em formato, os condicionalismos são tão numerosos que pomos de parte esta alternativa.

#### 4.9 Adição de uma cisteína ao piruvato (passos 7 e 8).

Pondo de parte a hipótese de a reacção ocorrer com o ácido pirúvico o estudo seguinte foi efectuado com o modelo mais próximo da realidade. O primeiro passo comum a todos os mecanismos é seguido pelo ataque da cisteína radicalar ao piruvato. Neste caso as cisteínas são indistinguíveis já que o modelo adoptado é o  $\cdot\text{SCH}_3$ .

Ao contrário do que sucedia com o ácido pirúvico, o sistema aniónico apresentou muitas dificuldades de convergência. Apesar disso os problemas foram ultrapassados.

No sistema neutro a reacção ocorria em duas etapas com formação de um intermediário tetraédrico. Surpreendentemente a “simples” ausência de um átomo de hidrogénio altera por completo este comportamento. A adição do radical tiolo ao piruvato ocorre num único passo



com formação da ligação S-H e quebra simultânea da ligação C-C. É observada uma única barreira de activação com a reacção ligeiramente exotérmica.

Podemos observar, na figura 18, que o estado de transição é semelhante aos reagentes. A ligação carbono-carbono encontra-se parcialmente distendida, cindindo por completo somente após a formação da ligação carbono-enxofre. A transferência de acetilo ocorre por transposição de uma barreira de activação de cerca de 6 kcal/mol barreira esta, significativamente inferior à observada para o sistema ácido. A redução da barreira e o facto do processo se dar num único passo são indícios duma maior tendência para formação de produtos para o caso da molécula aniónica. Em ambos os casos a estabilidade dos reagentes é comparável à dos produtos.

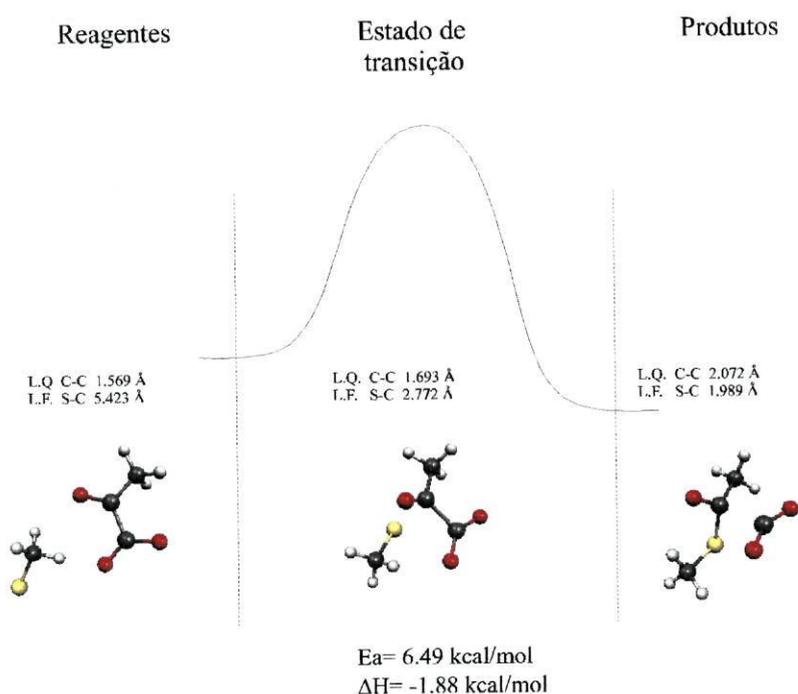


Figura 18- Diagrama que representa a variação de energia correspondente ao ataque da cisteína radical ao piruvato. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição, produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma. Ea designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

É interessante notar que a saída do grupo formilo, ao contrário do que sucedia com o grupo de saída do ácido pirúvico, se mantém fortemente ligado ao grupo de onde provém. Embora ele se afaste do carbono  $\alpha$  o distanciamento, de cerca de 2 Å, não é muito elevado mantendo-se complexado e o grupo fortemente carregado permanece muito estável.

#### 4.10 Formação do formato (passos 6 e 9).

Himo e Eriksson<sup>21</sup> reportaram um processo exotérmico com uma barreira de activação de 4.9 para a remoção de H à glicina 734 por parte do grupo de saída HCOO<sup>•</sup>. Quando, em vez da espécie neutra, se efectuou a simulação com o grupo aniónico o processo mantém-se exotérmico mas a barreira de activação decresce.

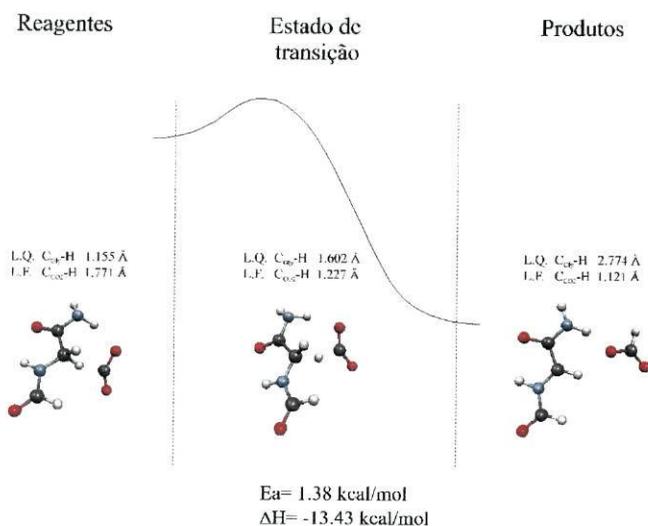
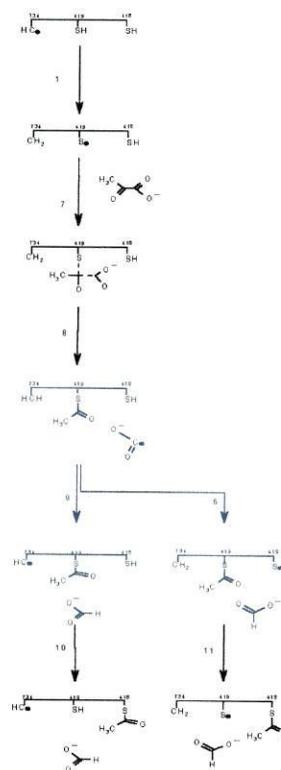


Figura 19- Representação da variação de energia correspondente à remoção de um átomo de hidrogénio por parte do grupo formilo a uma glicina. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição, produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma. Ea designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

Em vez de 4.9 regista-se agora uma barreira com uma energia pouco superior a uma kcal/mol. A ausência de um átomo de hidrogénio ácido torna a espécie aniónica mais reactiva conduzindo a uma redução da barreira de activação.

Para além da glicina, a abstracção de hidrogénio pode também ocorrer numa cisteína. Tal como já foi mencionado, anteriormente, dado o modelo (HSCH<sub>3</sub>) utilizado na representação da cisteína ser muito limitado não é possível distinguir qual a cisteína em causa. No entanto, no seguimento deste trabalho começa-se por admitir que a acetilação ocorre na cisteína 419. Assim sendo resta a cisteína 418 livre para qualquer processo de remoção de hidrogénio. A reacção de remoção de hidrogénio à cisteína pelo radical formilo, em

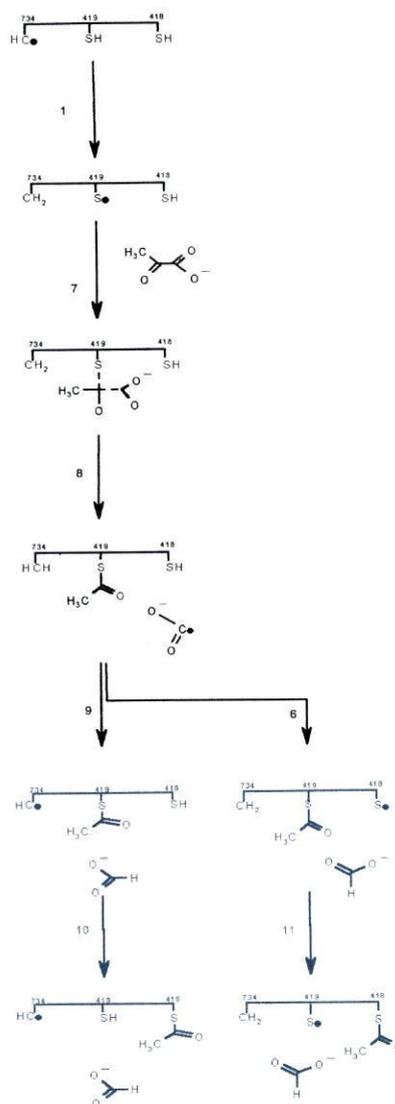


oposição ao observado pelo modelo neutro <sup>21</sup>, decorre sem barreira de activação (figura 17). Este resultado, em conjunto com o já observado para a glicina, evidencia a elevada reactividade do grupo formilo.

#### 4.11 Transesterificação (passos 10 e 11).

Vimos já que a reacção catalisada pela PFL ocorre em dois passos. O primeiro envolve a ligação covalente entre a enzima e o piruvato originando um produto da reacção, o formato, e também um intermediário estável acetil-PFL <sup>3</sup>. Este intermediário foi já isolado e sabe-se que a enzima encontra-se acetilada na cisteína 418. De acordo com os mecanismos apresentados anteriormente a adição ao piruvato é feita pela cisteína 419. Atendendo a isto Kozarich <sup>10, 17</sup> propõe uma transesterificação obtendo-se assim o intermediário acetilado na cisteína 418. Este estudo não foi feito no âmbito deste Mestrado, uma vez que apresentado num trabalho publicado <sup>21</sup>, não se encontra na linha de pensamento para o mecanismo proposto aqui e em nada contribuiria para o nosso conhecimento mais aprofundado do sistema<sup>‡</sup>.

Kozarich apresenta duas alternativas para esta transesterificação: homolítica e heterolítica. De acordo com os resultados teóricos publicados é interessante notar que o processo homolítico ocorre num único passo (tal como acontece com a adição da cisteína ao piruvato). É também relatado que foram realizadas várias tentativas para encontrar um intermediário tetraédrico sem êxito.



<sup>‡</sup> Os estudos repetidos anteriormente eram importantes dado que permitia uma primeira abordagem ao sistema. Era ainda importante a observação em detalhe de cargas, spin, distancias de ligação, etc. para melhor compreender as diferenças observada nas transições de sistemas neutros para carregados.

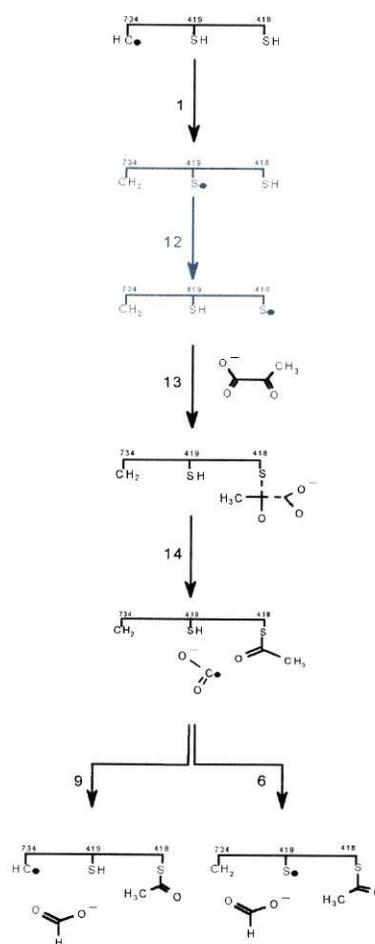
Em alternativa é também reportado um ataque directo pelo enxofre não radical ao carbono carbonilo da cisteína acetilada. Este passo tem uma elevada barreira de activação (41.2 kcal/mol) excluindo-se esta possibilidade.

Podemos neste momento confirmar que o mecanismo que envolve a adição da  $C^{419}$  ao piruvato, com saída do grupo formilo seguida da remoção de um átomo de H da cisteína 418 e posterior transesterificação homolítica é compatível como os resultados teóricos (passos 1, 7, 8, 6, 11). A introdução do modelo carregado não altera a sequência de passos previsto com os modelos neutros porém observam-se diferenças nas barreiras de activação podendo em alguns casos até desaparecer (passo 6). A principal diferença registada está relacionada com a adição ao piruvato. A introdução da carga adequada no piruvato traduz-se por uma maior afinidade do radical para o substrato. Assim, ao contrário do registado no passo 2, os dois passos elementares convertem-se num único passo concertado onde a quebra da ligação C-C ocorre simultaneamente com a formação da ligação C-S.

#### 4.12 Permuta de hidrogénio entre as duas cisteínas (passo 12).

A presença de duas cisteínas, próximas, no centro activo levanta dúvidas quanto ao papel de ambas. As primeiras abordagens apresentadas para o mecanismo catalítico da enzima PFL atribuíram sempre o protagonismo à cisteína 419. Evidências mais recentes <sup>11, 16</sup> relegam este resíduo para segundo plano concedendo-lhe, apenas, a função de precursor para a transferência de hidrogénio. Admitindo, então, a possibilidade da cisteína 418 se encontrar na forma radical o átomo de hidrogénio é transferido para a  $C^{419}$ .

Começou-se por efectuar este cálculo com o modelo mais pequeno ( $\bullet\text{SCH}_3$ ). Na figura 20 podemos observar todas as estruturas optimizadas associadas a esta transferência. Tal como seria de esperar o processo é atérmico uma vez que não é possível distinguir os



reagentes dos produtos. É observada uma pequena barreira de activação de 3.52 kcal/mol.

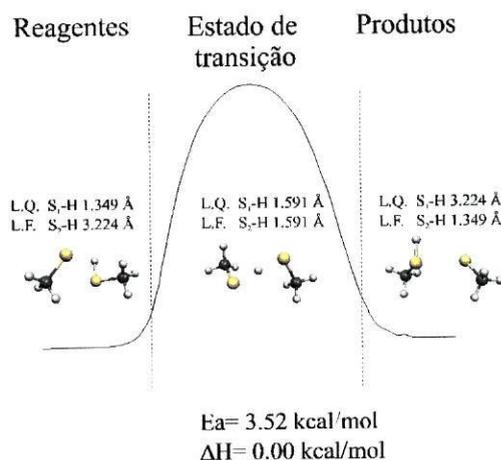


Figura 20- Representação da variação de energia correspondente à transição de um átomo de hidrogénio entre a cisteína 418 e a cisteína 419. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição e produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma.  $E_a$  designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

Além deste sistema, a experiência foi também realizada com o modelo incrementado das duas cisteínas (figura 9). A utilização de parte da cadeia principal da enzima, contendo as duas cisteínas, presentes no centro activo, permite a sua diferenciação e deste modo observar efectivamente a transferência de H da  $C^{418}$  para a  $C^{419}$ . Para além disto, a observação de um passo concertado para a adição da cisteína ao piruvato justifica o uso de um modelo melhorado e, assim, tal como a transferência de H entre ambas, podemos também proceder ao estudo do ataque da  $C^{418}$  ao piruvato.

Na figura 21 podemos observar que a transição para o modelo maior não se traduz em diferenças significativas na quebra e formação de ligações para o estado de transição.

De acordo com este modelo o processo é praticamente atérmico, tal como sucedia com o anterior. Observa-se um aumento acentuado da energia de activação, que pode estar relacionado com os acrescidos impedimentos esteroquímicos deste modelo. É necessário que ocorram rearranjos conformacionais da cadeia principal da proteína para que a necessária geometria do estado de transição seja adoptada. Pensa-se que inclusão de toda a enzima pode nestas circunstâncias alterar este valor, assim como a energia global do processo.

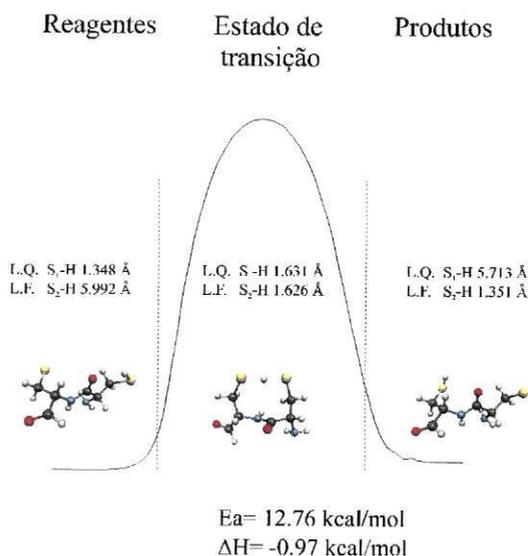


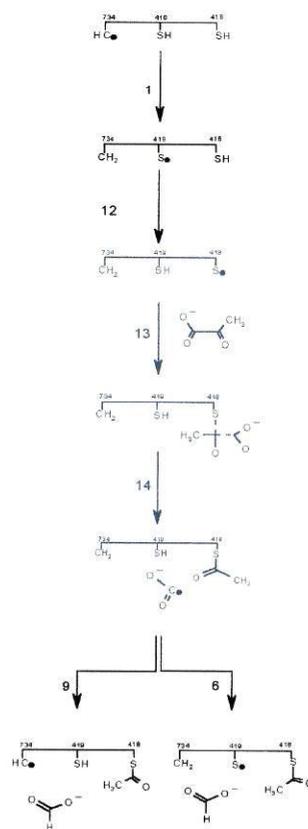
Figura 21- Diagrama que representa a variação de energia correspondente à transição de um átomo de hidrogénio entre a cisteína 418 e a cisteína 419 para o modelo que inclui ambas as cisteínas ligadas tal como se encontram na proteína. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição e produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma. Ea designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

#### 4.13 Ataque da cisteína 418 ao piruvato (passos 13).

A observação da estrutura cristalográfica do centro activo levou Knappe a sugerir uma adição directa da C<sup>418</sup>, em vez da C<sup>419</sup>, ao piruvato. O uso do modelo HSCH<sub>3</sub> para as duas cisteínas não permite distinguir em qual ocorre a adição. Atendendo a isto e à constatação que a adição ocorre num passo concertado (passo 7) pensou-se utilizar parte da cadeia principal da PFL que contém as duas cisteínas em causa.

Como seria de esperar o resultado manteve-se, encontrando-se um estado de transição muito semelhante ao do passo 7.

A inclusão de uma parte da proteína não afectou significativamente a estrutura do estado de transição, havendo apenas um pequeno encurtamento da ligação em formação carbono-enzofre. Nos reagentes e produtos as ligações mantêm-se praticamente inalteradas. Esta



observação leva-nos a ter esperança que o modelo seja bastante rigoroso e reproduza de forma conveniente o comportamento real do sistema.

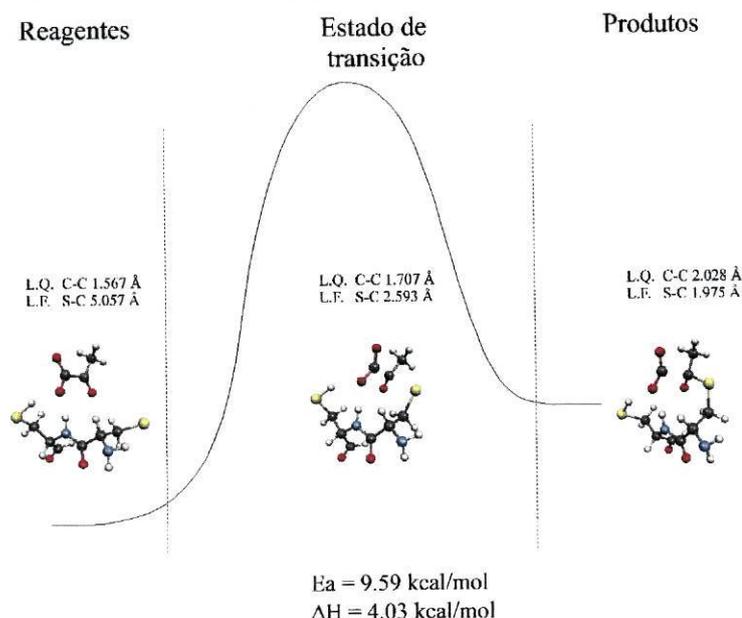


Figura 22- Representação da variação de energia correspondente ao ataque da cisteína 418 radical ao piruvato. O esquema encontra-se dividido em três blocos: reagentes, estado de transição e produtos. A abreviação L.Q. refere-se ao comprimento da ligação que se quebra e L.F. à que se forma.  $E_a$  designa a energia de activação associada ao processo e  $\Delta H$  a entalpia do processo global.

Na figura 22 é possível observar a geometria das estruturas optimizadas dos reagentes, estado de transição e produtos.

Uma alteração observada com algum realce, relativamente ao sistema menor (figura 18), refere-se às energias relativas das várias espécies. O processo com o modelo menor era praticamente atérmico e o aumento do sistema conduziu a um desnível. Verifica-se agora que o processo é claramente endotérmico. Também a barreira de activação sofreu uma translação, aumentando de 6.49 para 9.59 kcal/mol. Este aspecto poderá estar relacionado com uma possível estabilidade acrescida dos reagentes no modelo maior relativamente às restantes espécies. Isto pode ser justificado pela deslocalização do spin ocorrer em maior extensão nos reagentes. Dado que no início da reacção o radical se encontra no péptido é natural que o aumento da cadeia produza um efeito mais pronunciado na estabilidade dos reagentes.

É possível observar, na figura 22, que o piruvato se encontra rodeado por vários átomos de hidrogénio, que mantêm a molécula numa posição rígida. O oxigénio do grupo carbonilo, do piruvato, mais próximo da proteína, é estabilizado por pontes de hidrogénio. Estas mantêm-se ao longo de todo o processo.

Tal como acontecia no modelo com uma única cisteína também, neste caso, o radical formilo se encontra fortemente complexado. As pontes de hidrogénio mantêm-se e o grupo formilo permanece, muito estável, próximo do conjunto das duas cisteínas. A estabilidade observada leva-nos a sugerir que a formação do produto tenha uma sequência bem definida. Atendendo aos resultados dos passos 6 e 9 e, dado que se tornaria computacionalmente impraticável o acréscimo de uma glicina a este sistema, a afirmação que se segue é feita mediante os resultados obtidos com estes modelos mais reduzidos.

Verificámos já que a formação do formato a partir de uma cisteína é espontânea (figura 17). Sugere-se então que após a saída do radical formilo, este com uma pequena aproximação à cisteína vizinha remove o átomo de hidrogénio formando-se assim o produto da reacção de uma forma sequencial.

Havíamos já verificado que o mecanismo promovido pela cisteína 419 que envolvia uma transesterificação homolítica era compatível com os resultados teóricos. No entanto o mecanismo mais simples proposto por Knappe também não levanta contestação do ponto de vista teórico. Assim sendo e, apoiados na observação da estrutura cristalográfica da enzima que revela o posicionamento favorável da C<sup>418</sup>, pensamos que este será de facto o mecanismo mais provável para a PFL. Assim, o mecanismo passa pela transferência de hidrogénio da cisteína 418 para a glicina 734 via C419. Segue-se a adição do radical tiilo ao piruvato. Liberta-se finalmente o radical formilo que, com uma pequena aproximação à cisteína 419 vizinha, remove o átomo de hidrogénio regenerando-se assim o radical na cadeia principal da enzima. Este mecanismo é compatível não só com todos os dados teóricos reunidos, até ao momento, mas também, com toda a informação experimental documentada.

#### **4.14 Modelos neutros vs modelos carregados.**

Verificamos já diversas evidências da importância da escolha dos modelos. O acréscimo de um átomo, tão pequeno quanto o hidrogénio, deve ser feito com muito cuidado pois, por vezes, em vez de simplificar o cálculo alteramos por completo o comportamento químico real do sistema. A introdução do átomo de hidrogénio produz alterações na distribuição de densidade electrónica. Podemos ver na tabela 2 as cargas de Mulliken calculadas para os sistemas cisteína + ácido pirúvico e cisteína + piruvato. A numeração indicada encontra-se de acordo com a estabelecida na figura 23.

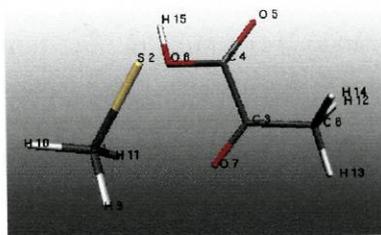


Figura 23- Numeração dos átomos no sistema.

Tabela 2- Cargas de Mulliken calculadas para os sistemas ácido e básico.

Átomo	Cisteína + piruvato	Cisteína + ácido pirúvico
1 C	-0.064461	-0.167069
2 S	-0.357558	-0.083764
3 C	0.353008	0.573322
4 C	1.041156	0.972205
5 O	-0.785372	-0.700023
6 C	-0.213011	-0.100339
7 O	-0.679190	-0.666823
8 O	-0.759391	-0.703789
9 H	0.026930	0.048754
10 H	0.027257	0.044030
11 H	0.306830	0.145541
12 H	0.062693	0.060494
13 H	-0.017783	0.011478
14 H	0.058891	0.073828
15 H	-----	0.492156

Em termos de densidade de carga, o hidrogénio extra não provoca alterações muito pronunciadas do sistema. Verificamos que o átomo de carbono 3, onde se faz a adição da cisteína, no piruvato, apresenta um ligeiro aumento de densidade de carga. À parte esta pequena diferença, o restante sistema mantém-se praticamente inalterado.

Não sendo, aparentemente, a densidade de carga a responsável pelas diferenças registadas resta a distribuição de spin já que ambos os sistemas são de natureza radicalar.

Podemos observar na figura 25 a distribuição da densidade de spin para os sistemas apresentados na figura 24. As moléculas correspondem, por esta ordem, aos reagentes, primeiro estado de transição, intermediário tetraédrico, segundo estado de transição e produtos para a adição da cisteína radicalar ao ácido pirúvico (passo 2, figura 14). Podemos confirmar, na figura 25-A, que a densidade de spin se encontra localizada quase na totalidade no átomo de enxofre da cisteína. Apenas uma pequena porção foi distribuída para o oxigénio ácido do substrato. O primeiro estado de transição

apresenta já uma elevada deslocalização do spin por todo o sistema e o intermediário tetraédrico concentra uma grande percentagem da densidade de spin no oxigénio carbonilo tal como era previsto experimentalmente. O segundo estado de transição assemelha-se aos produtos e começa-se a observar uma concentração de spin no fragmento que se separa para originar os produtos.

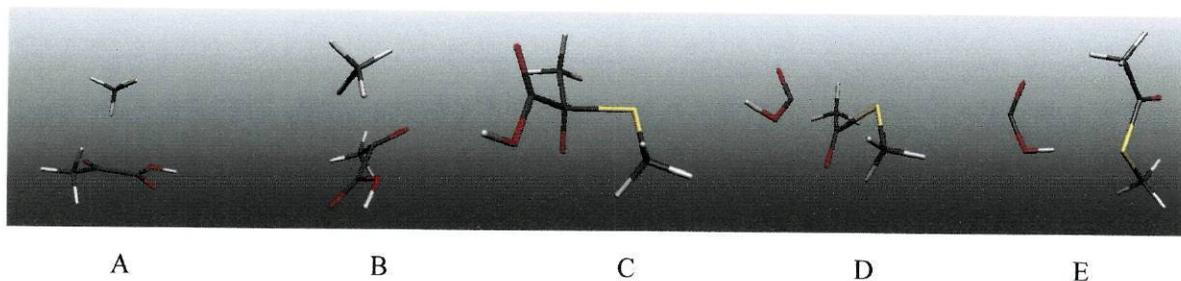


Figura 24- Estruturas optimizadas para o processo de adição da cisteína radicalar ao ácido pirúvico. (A) reagentes; (B) estado de transição 1; (C) intermediário tetraédrico; (D) estado de transição 2; (E) produtos.

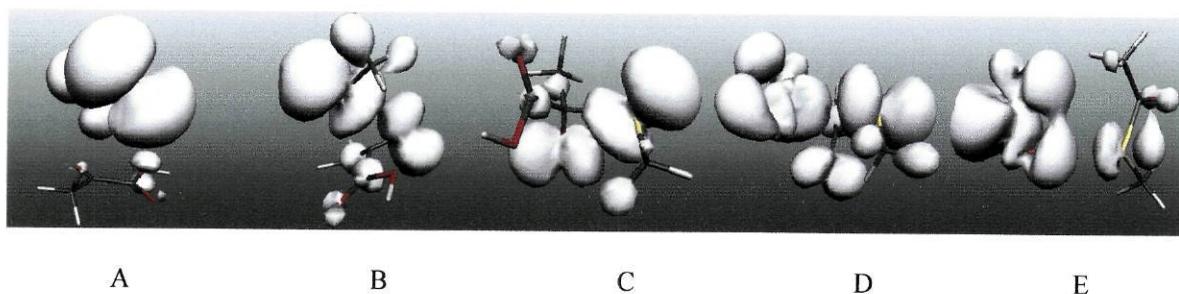


Figura 25- Densidade de spin para as estruturas referentes aos passos 2 e 3. (A) reagentes; (B) estado de transição 1; (C) intermediário tetraédrico; (D) estado de transição 2; (E) produtos.

O mesmo estudo para a adição da cisteína ao piruvato revela aspectos interessantes que nos podem ajudar a compreender as diferenças de comportamento observadas.

Na figura 26 verificamos que, ao contrário do que sucedia com os reagentes do sistema neutro, há uma deslocalização muito acentuada do spin. Este não se encontra apenas no enxofre mas também em todos os átomos electronegativos do substrato.

O estado de transição apresenta a ligação C-C bastante distendida e a ligação C-S encontra-se já em formação. É possível observar que neste ponto a densidade de spin encontra-se distribuída por todo o sistema. O sistema equivalente neutro só na parte final do processo apresenta uma distribuição tão nítida. O produto apresenta uma ligação carbono-enxofre um pouco superior ao valor habitual para uma ligação C-S.

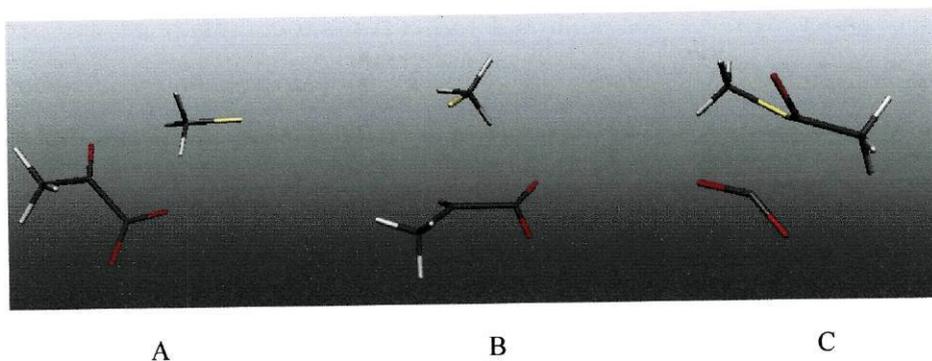


Figura 26- Estruturas otimizadas para o processo de adição de uma cisteína ao piruvato. (A) reagentes; (B) estado de transição; (C) produtos.

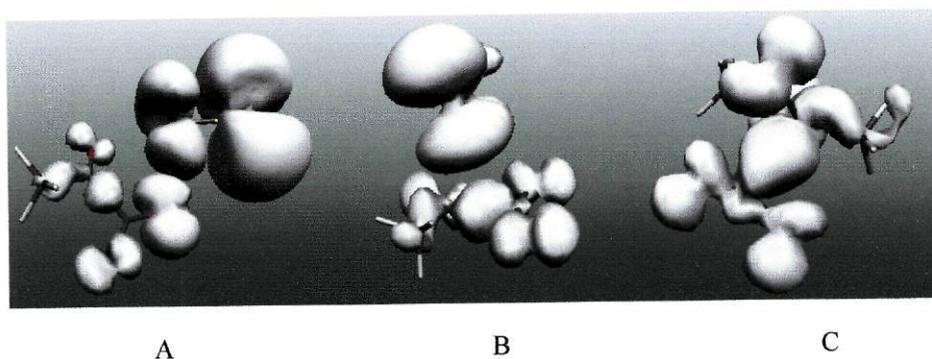


Figura 27- Distribuição de spin registada para o sistema relativo ao passo 7. (A) reagentes; (B) estado de transição; (C) produtos.

Todavia se observarmos a figura 27-A podemos comparar a densidade de spin do produto na ausência do restante sistema. É evidente que o produto formado é sem qualquer dúvida o pretendido. Se observarmos novamente o produto formado no sistema neutro é possível mais uma vez registar as diferenças.

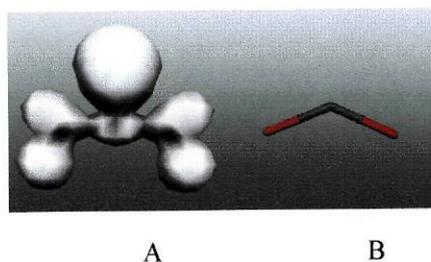


Figura 28- (A) Densidade de spin do grupo formilo na ausência da cisteína acetilada. (B) Estrutura otimizada para o grupo  $^*COO$ .

A razão pela qual a ligação se encontra ligeiramente distendida pode ser explicada pela elevada reactividade do grupo de saída, que por isso, se mantém fortemente complexado, de forma a estabilizar a sua elevada densidade.

Por último podemos ainda analisar a forma como a densidade de spin se distribui no sistema com ambas as cisteínas. Na figura 30 podemos encontrar a razão para as diferenças de energia registadas quando passamos do sistema com uma única cisteína modelada como  $\cdot\text{SCH}_3$  para o sistema com o péptido. Prevíamos que a presença do braço da proteína tivesse um efeito estabilizador superior nos reagentes que nas restantes espécies. De facto verificamos que, ao contrário do que sucedia com o sistema menor, aqui o spin da cisteína é fundamentalmente distribuído pela própria enzima e não pelo substrato. Já nos restantes estados a distribuição ocorre principalmente no piruvato. Isto pode explicar a descida na energia dos reagentes que conduziu ao aumento da barreira de activação e a endotermicidade da reacção.

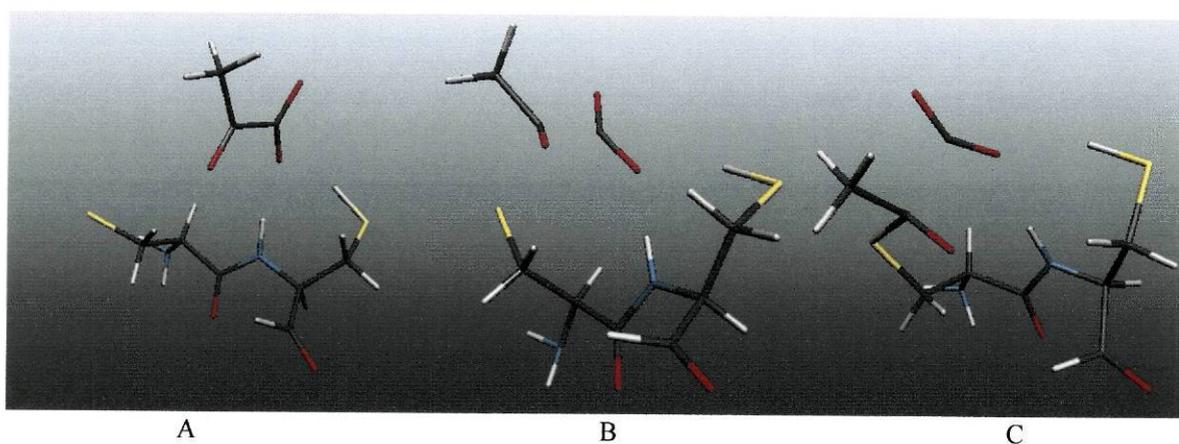


Figura 29- Estruturas optimizadas para o processo de adição de uma cisteína ao piruvato. (A) reagentes; (B) estado de transição; (C) produtos.

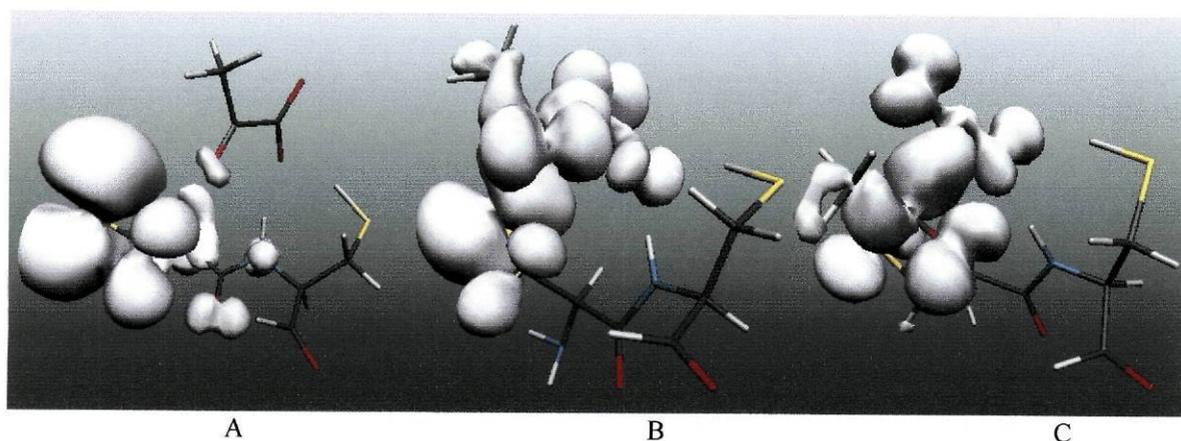


Figura 30- Distribuição de spin registada para o sistema relativo ao passo 13. (A) reagentes; (B) estado de transição; (C) produtos.

Também neste caso podemos confirmar que embora a ligação C-S seja um pouco superior ao esperado a distribuição de spin revela que se trata do produto pretendido.

Tal como já foi mencionado anteriormente, não há dúvida que existem sistemas em que os modelos neutros são preferíveis, mas parecem existir provas suficientes que, neste caso particular, o modelo carregado reproduz de forma mais conveniente o comportamento do substrato face à enzima. Em acréscimo não existem dados experimentais em que tenha sido isolado um intermediário estável, e a existência do mesmo no modelo neutro é apenas reflexo de uma adição menos favorável à espécie ácida por parte do radical tiolo. O ácido pirúvico contém um átomo de carbono carbonilo mais electrodeficiente o que desfavorece o ataque pelo radical. Isto acoplado com a distribuição de spin menos eficiente, conduz a uma adição mais lenta processada em duas etapas.

#### **4.15 Proposta de mecanismo para a enzima piruvato formato liase.**

Quando em 1999 é publicado um trabalho apresentando a estrutura tridimensional da enzima piruvato formato liase, na presença de um homólogo estrutural do piruvato, algo de importante é revelado: há, na realidade, a possibilidade do substrato se encontrar mais próximo da cisteína 418 do que o previsto. O posicionamento, aparentemente inacessível, deste resíduo tornava-o menos apelativo para a adição directa ao piruvato. Com esta descoberta é proposto um mecanismo, que transforma esta cisteína de observador a parte integrante do mecanismo (pelo menos nesta primeira parte do mecanismo já que na segunda é esperada uma participação fulcral). O mecanismo proposto por Knappe é estudado neste trabalho e não existe qualquer evidência que o contrarie. Apenas alguns pequenos detalhes podem ser acrescentados. O intermediário, desde há muito tido como certo, pode ser substituído por um estado de transição e assim justificar o facto de tal intermediário nunca ter sido detectado. A remoção de um átomo de hidrogénio pelo radical formilo por simples aproximação da cisteína 419 vizinha acontece sem necessitar de transpor uma barreira energética compensando, assim, a ruptura do complexo formado por esta espécie muito reactiva com o grupo de onde provém. Podemos ainda colocar algumas incertezas quanto ao passo limitante de velocidade já que, de acordo com os resultados obtido aqui, o passo de transferência do hidrogénio da cisteína para a glicina, assim como a permuta de hidrogénio entre as duas cisteínas e o ataque da cisteína ao piruvato apresentam valores elevados. Não se põe de parte que o passo de quebra de ligação C-C seja o passo mais lento pois, tal como se observou o decréscimo de energia do sistema com uma única cisteína para o modelo

maior, também a inclusão de toda a proteína pode introduzir uma estabilidade acrescida ao radical e assim incrementar a barreira de activação. De momento podemos apenas manter a dúvida quanto à possibilidade de outro processo limitar a velocidade da reacção. Um estudo com toda a proteína pode ajudar a responder a algumas das questões que ficam por resolver.

## ***Conclusões***

## 5. Capítulo 5

### 5.1 Breves considerações finais

O estudo teórico, realizado com DFT, para a reacção, de conversão de piruvato em formato, catalisada pela PFL revela um mecanismo consistente com os dados experimentais conhecidos para esta enzima. Os resultados obtidos permitem-nos propor que, após activação, a enzima transfere o átomo de hidrogénio, da cisteína 418 para a glicina 734, via a cisteína 419. O radical tiilo formado adiciona ao piruvato, libertando-se o radical formilo. Este radical com uma pequena aproximação à cisteína 419 remove, finalmente, o átomo de hidrogénio sem transposição de uma barreira de activação, obtendo-se o produto da primeira parte da reacção.

Na figura 31 podemos ver de forma resumida todos os passos do mecanismo proposto neste trabalho assim como a variação de energia de todo o processo.

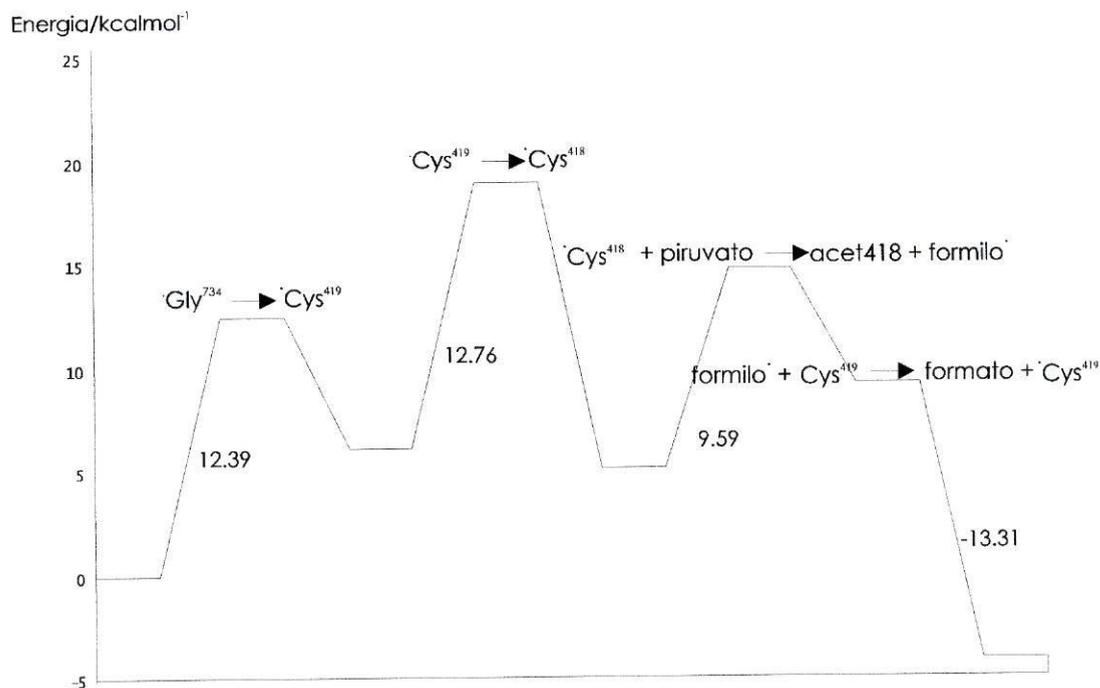


Figura 31- Variação de energia para todos os passos do mecanismo da enzima piruvato formato liase. Os valores presentes no gráfico são as energias relativas aos passos.

A reacção global apresenta uma exotermicidade de 4.16 kcal/mol. Surpreendentemente pudemos ver que, ao contrário do que era esperado, o passo com a maior barreira de activação não é a quebra da ligação C-C, mas sim, a transferência de hidrogénio entre as duas cisteínas. Devemos, porém, ter em atenção que os três processos:



têm energias de activação muito semelhante. Este facto leva-nos a pensar que, apenas com estes dados, não é possível estabelecer de forma inequívoca qual é o processo que governa a cinética deste mecanismo. Para além do próprio erro associado ao cálculo, verificámos também que, o uso de um modelo com parte da proteína, para a transferência de hidrogénio entre as duas cisteínas, alterou significativamente o valor da energia de activação associado ao processo relativamente ao modelo HSCH<sub>3</sub>. Assim sendo, pensamos que só com a introdução de toda a enzima poderemos discriminar o passo limitante de velocidade.

O trabalho realizado neste mestrado permite ainda verificar que o intermediário tetraédrico previsto em todos os trabalhos experimentais não ocorre. O estudo realizado com o ácido pirúvico apoiava a existência deste intermediário. Por comparação do sistema neutro e carregado (ácido pirúvico - piruvato) verificamos que a distribuição de spin confirma que a introdução de um átomo de hidrogénio, extra, no substrato, promove alterações que conduzem a um comportamento diferente relativamente à sua base. O intermediário tetraédrico presente no sistema neutro deve-se, possivelmente, a uma adição mais difícil por parte do ácido. O átomo de carbono 2, do ácido pirúvico, mais electrodeficiente, do que no caso da base, assim como uma deslocalização de spin menos eficaz, desfavorece o ataque pelo radical conduzindo a uma reacção em dois passos. O piruvato, por outro lado, apresenta uma deslocalização de spin elevada, estabilizando o radical da cisteína. O processo ocorre num único passo concertado, permitindo assim que a energia necessária à quebra da ligação C-C seja compensada formação da ligação S-C. O facto deste intermediário nunca ter sido detectado sustenta esta hipótese de mecanismo.

Num trabalho futuro pensamos concluir o estudo do mecanismo da PFL por inclusão de toda a enzima ou, pelo menos, uma grande parte da mesma.

## *Referências*

## Referências

1. Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*, **1995**, 2ª edição, John Wiley & Sons, Inc.
2. Atkins, P. W., *Physical Chemistry*, **1994**, 5ª edição, Oxford University Press.
3. Knappe, J., Blaschkowski, H. P., Gröbner, P., Schmitt, T., *Eur. J. Biochemistry*, **1974**, 50, 253.
4. Knappe, J., Elbert, S., Frey, M., Wagner, F. V., *Biochemical Soc. Transactions*, **1993**, 21, 731.
5. Wagner, F. V., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schäfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 996.
6. Wong, K. K., Murray, B. W., Lewisch, S. A., Baxter, M. K., Ridky, T. W., Ulissi-DeMario, L., Kozarich, J. W., *Biochemistry*, **1993**, 32, 14102.
7. Broderick, J. B., Duderstadt, R. E., Fernandez, D., Wojtuszewski, K., Henshaw, T., Johnson, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7396.
8. Henshaw, T., Cheek, J., Broderick, J. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 8331
9. Krebs, C., Henshaw, T., Cheek, J., Huynh, B., Broderick, J. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12497.
10. Leppänen, V., Merckel, M., Ollis, D., Wong, K., Kozarich, J. W., Goldman, A., **1999**, *Structure*, 7, 733.
11. Becker, A., Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S., Wagner, A., *Nature Structural Biology*, **1999**, 6, 969.

12. Unkrig, V., Neugebauer, F. A., Knappe, J., *Eur. J. Biochemistry*, **1989**, 184, 723.
13. Brush, E., Lipsett, K., Kozarich, J. W., *Biochemistry*, **1988**, 27, 2217.
14. Ulissi-DeMario, L., Brush, E., Kozarich, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 4341.
15. Parast, C., Wong, K., Kozarich, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10602.
16. Plaga, W., Vielhaber, G., Wallach, J., Knappe, J., *FEBS Letters*, **2000**, 466, 45.
17. Parast, C., Wong, K., Lewisch, S. A., Kozarich, J. W., *Biochemistry*, **1995**, 34, 2393.
18. Reddy, S., Wong, K., Parast, C., Peisach, J., Magliozzo, R., Kozarich, J. W., *Biochemistry*, **1998**, 37, 558.
19. Plaga, W., Frank, R., Knappe, J., *Eur. J. Biochemistry*, **1988**, 178, 445.
20. Eriksson, L. A., *Theoretical Biochemistry – Processes and Properties of Biological Systems*, **2000**, Theoretical and Computational Chemistry, vol 9, Elsevier Science B. V..
21. Himo, F., Eriksson, L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11449.
22. Siegbahn, P. E. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8417.
23. Jensen, F., *Introduction to Computational Chemistry*, **1999**, John Wiley & Sons, Inc.
24. Born, M., Oppenheimer, J. R., *Ann. Phys.*, **1927**, 87, 457.
25. Hartree, D. R., *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **1928**, 24, 89.
26. Fock, V., *Z. Phys.*, **1930**, 61, 126.
27. Roothaan, C. C. J., *Rev. Mod. Phys.*, **1951**, 23, 69.

28. Boys, S. F., *Proc. Roy. Soc.*, **1950**, 200, 542.
29. Thomas, L. H., *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **1927**, 23, 542.
30. Fermi, E., *Acad. Naz. Linzei.*, **1927**, 6, 602.
31. Slater, J. C., *Phys. Rev.*, **1951**, 81, 385.
32. Hohenberg, P., Kohn, W., *Phys. Rev.*, **1964**, 136, 864.
33. Kohn, W., Sham, L. J., *Phys. Rev. A*, **1965**, 140, 1133.
34. Vosko, S. H., Wilk, L., Nusair, M., *Canadian J. Phys.*, **1980**, 58, 1200.
35. Perdew, J. P., Zunger, A., *Phys. Rev. B*, **1981**, 23, 5048.
36. Lee, C., Yang, W., Parr, R.G., *Phys. Rev. B*, **1980**, 37, 785.
37. Parr, R. G., *J. Chem. Phys.*, **1952**, 20, 239.
38. Pople, J. A., Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, **1965**, 43, S136.
39. Pople, J. A., Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, **1966**, 44, 3289.
40. Pople, J. A., Beveridge, D. L., Dobosh, A. P., *J. Chem. Phys.*, **1967**, 47, 2026.
41. Pople, J. A., Santry, D. P., Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, **1965**, 43, S129.
42. Baird, N. C., Dewar, M. J. S., Sustmann, R., *J. Chem. Phys.*, **1969**, 50, 1275.
43. Dewar, M. J. S., Haselbach, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 590.
44. Bingham, R. C. Dewar, M. J. S., Lo, D. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1285.
45. Dewar, M. J. S., Thiel, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 4899.
46. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healey, E. F., Stewart, S. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3902.

47. Stewart, J. J. P., *J. Comput. Chem.*, **1989**, 10,221.
48. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakreswki, V. G.; Montgomery Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuk, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowki, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98* , **1998**, Revision A.3; Gaussian Inc.; Pittsburgh, PA.
49. A. Warshel e M Levitt, *J. Mol. Biol.*, 103, **1976**, 687.
50. U.C. Singh e P.A. Kollman, *J. Comp. Chem.*, 7, **1986**, 718.
51. F. Maseras e K. Morokuma, *J. Comp. Chem.*, 16, **1995**, 1170.
52. S. Humbel, S. Sieber e K. Morokuma, *J. Phys Chem.*, 105, **1996**, 1959.
53. Siegbahn, P. E. M., *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 14672.

# Errata

Página	linha/ equação/ figura	Onde se lê:	Deveria ler-se:
64	28	electrónicas	nucleares
70	12	HCOO•	•COOH
71	fig. 14	L.F. C-C	L.F. C-S
71	6	HCOO•	•COOH
71	8	ácido fórmico	ácido fórmico radicalar
71	15	(13.5 kcal/mol)	(770 s <sup>-1</sup> )
76	3	HCOO•	•COOH
85	1	27-A	28-A
87	28	resultados obtido	resultados obtidos

  
19/7/2002