

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

Júlio Anderson Fonseca Arvellos

**INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DA INHHQ COMO ATENUANTE DA
INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA NA PROTEÍNA BETA AMILOIDE**

Juiz de Fora

2019

Júlio Anderson Fonseca Arvellos

**INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DA INHHQ COMO ATENUANTE DA
INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA NA PROTEÍNA BETA AMILOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, área de concentração: Físico-Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção título de Mestre em Química.

Orientador: Luiz Antônio Sodré Costa

Juiz de Fora

2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu irmão, Vinícius Arvellos, e minha mãe, Natividade Plácido, pela paciência e apoio dado em todos esses anos de pesquisa, tanto durante a graduação quanto durante o Mestrado.

Agradeço a minha grande amiga e companheira Tatiana C. P. Antunes, por todo o suporte, ajuda e confiança em todos esses anos.

Agradeço aos meus amigos do NEQC, Nathália M. P. Rosa, G. Yuliana S. Delgado, Eduardo R. Almeida, Rodrigo A. Fraga, Jhonnatan Carvalho e Frederico H. do Carmo Ferreira, pelos bons momentos de trabalho em conjunto, conversas, lazer e pelos momentos fora do laboratório. Agradeço aos ex-colegas de laboratório, Arthur B. Porto, Willian T. G. Novato e Lucas Fagundes, que durante meus anos de graduação deram sugestões e orientações importantes para minha formação. Também agradeço ao professor Hélio Ferreira dos Santos pela ajuda durante todo o trabalho e constante disponibilidade no laboratório, o que com certeza auxiliou no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao meu orientador Luiz Antônio Sodré Costa pela paciência e pelos anos de trabalho em conjunto.

Agradeço aos amigos e colegas de fora do NEQC, Karine B. Enes, Camille C. Mendonça, Rafaela de S. Martins, Pedro Pôssa, Fillipe Caitano, Letícia Sant'Anna, Ana Clara Branco, Juliana Vicini e todos que indiretamente fizeram parte deste trabalho.

Agradeço a todos que em algum momento fizeram parte do meu aprendizado durante todos esses anos.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora, à CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela estrutura disponível e fomento à pesquisa.

“Não subestime a sua ignorância.”

J. A. F. Arvellos

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva da capacidade cognitiva, afetando a memória, a linguagem, o raciocínio lógico e outras capacidades associadas ao cérebro. Do ponto de vista molecular são observados no cérebro depósitos de placas senis extracelulares formados pelo peptídeo beta amiloide (Ab) e emaranhados neurofibrilares intracelulares formados pela proteína tau. Além da Ab, são observadas altas concentrações dos metais ferro, cobre e zinco nas placas senis. A hipótese metálica se baseia no papel desses metais no aumento significativo da precipitação e agregação do peptídeo Ab *in vitro*, além do papel redox dos íons de ferro e cobre na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Uma forma de reduzir a concentração desses metais pode ser feita com compostos atenuantes da interação metal-proteína (do inglês MPAC). Esse grupo de compostos seria capaz de atingir o sítio metálico nas proteínas/peptídeos e, ao se coordenarem, deslocariam o metal para outras regiões do cérebro reestabelecendo a homeostase. O INHHQ (8-hidroxiquinol-2-carboxaldeído isonicotinoil-hidrazona) foi primeiramente descrito por Hauser-Davis et al. (2015) como potencial candidato a MPAC com base em sua capacidade de competir pelos íons zinco(II) e cobre(II) frente ao peptídeo Ab. O INHHQ também foi testado frente à proteína α -sinucleína, envolvida na doença de Parkinson, se mostrando bastante efetivo na remoção dos íons cobre(I) e cobre(II), o que despertou maior interesse em estudar melhor sua função como MPAC. Nesse contexto, o presente trabalho buscou propor um mecanismo de ação do INHHQ como MPAC capturando o íon zinco(II) na estrutura do peptídeo Ab. Foram realizados cálculos quânticos com dois modelos miméticos para obtenção das energias envolvidas no mecanismo proposto, além de cálculos de dinâmica molecular do peptídeo em diferentes etapas do mecanismo. O INHHQ apresentou estrutura bastante flexível nas simulações de dinâmica, dando indicativos da sua capacidade de ancoragem na estrutura do peptídeo. A formação do complexo $[\text{Zn}(\text{INHHQ})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ também foi estudada, sendo bastante espontânea com energia de formação $\Delta G = -14,335 \text{ kcal mol}^{-1}$ considerando o íon zinco(II) livre. As interações hidrofóbicas e π -stacking se mostraram dominantes na interação entre INHHQ e o peptídeo, havendo formação de poucas ligações de hidrogênio entre essas espécies. Da proposta de mecanismo, a formação do aduto se mostrou a etapa termodinamicamente menos favorável, chegando a atingir valores de $\Delta G = +23,87 \text{ kcal mol}^{-1}$ para um dos modelos utilizados. Nesse mesmo modelo a reação global teve $\Delta G = +11,73 \text{ kcal mol}^{-1}$, um valor bastante interessante e possível de ser observado em meio biológico.

Palavras-chave: INHHQ. MPAC. Zinco. Doença de Alzheimer. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive loss of cognitive abilities affecting memory, language, logical thinking and other capacities related to the brain. On the molecular view, it is observed large deposits of extracellular senile plaques formed by amyloid beta peptide (Ab) and intracellular neurofibrillary tangles formed by tau protein. The metals iron, zinc and copper are also found in high concentrations in the plaques. The metallic hypothesis is based on the role of these metals, which enhance Ab precipitation in *in vitro* experiments and on the redox activity of iron and copper, which can form reactive oxygen species (ROS). The metal-protein attenuating compounds (MPAC) emerged as a class of compounds able to reduce metal concentration, where they could act reaching the metallic site in the peptide and redistribute the metals after coordination through the brain, reestablishing the metallic homeostasis. Hauser-Davis et al. (2015) firstly described the ligand INHHQ (isonicotinoyl hydrazone of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde) as a potential MPAC candidate, as it showed great ability to bind to zinc(II) and copper(II) compared to Ab. INHHQ was also tested with α -synuclein, a protein associated with Parkinson's disease, and showed great results removing copper(I) and copper(II) ions from the protein structure. These results contribute to increase the interest in a better description of its function as a MPAC. The present work aimed to propose and evaluate a mechanism of action of INHHQ as an MPAC for zinc coordinated to Ab. Two mimetic models were created for the quantum calculations (QM) to obtain the energies involved in each step of the mechanism. Molecular dynamics simulations were also used and the whole peptide was simulated in different steps of the mechanism. The INHHQ structure is very flexible on the dynamics simulation, what indicates its ability to dock on the Ab structure. The formation of the zinc complex $[\text{Zn}(\text{INHHQ})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ was also studied and its free energy of formation showed a very spontaneous reaction with $\Delta G = -14,335 \text{ kcal mol}^{-1}$. The simulations with INHHQ and the peptide clearly point towards weak interactions between the species, which maintain both interacting through hydrophobic and π -stacking interactions. Only few hydrogen bonds were formed between the ligand and Ab. For both QM models the adduct formation is the thermodynamically less favorable step with $\Delta G = +23,87 \text{ kcal mol}^{-1}$ obtained for one of the models. This same model showed a global energy of $\Delta G = +11,73 \text{ kcal mol}^{-1}$, what makes it a feasible process to occur in the biological environment.

Keywords: INHHQ. MPAC. Zinc. Alzheimer's disease. Molecular Dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Com o avanço da DA ocorre morte neuronal e consequente atrofia do cérebro (esquerda). O início da doença ocorre na região do hipocampo (direita), se espalhando por todo o cérebro no estágio avançado.....	18
Figura 2 – Representação das vias metabólicas da proteína APP. α , β e γ representam as enzimas que metabolizam a APP.....	20
Figura 3 – Representação esquemática das fases de agregação da Ab.....	21
Figura 4. Alguns compostos derivados da 8-hidroxiquinolina, com exceção da Deferiprona e do HPICH.	25
Figura 5 – Estrutura dos ligantes INHHQ e seu análogo HPCIH.	30
Figura 6 – A) Estrutura cristalográfica determinada por Li et al. (2016) e B) representação do complexo de zinco utilizado no cálculo quântico.....	32
Figura 7 – A) Estrutura cristalográfica determinada por Cukierman et al. (2018) e B) representação do complexo de zinco utilizado no cálculo quântico.....	33
Figura 8 – Representações da estrutura de ZnAb ₁₋₁₆ com os aminoácidos coordenados e o Zn em destaque.	37
Figura 9 – Aproximação de N4 para formação da ligação multidentada.	38
Figura 10 – Desprotonação do H2L auxiliada pelo Glu11 e uma molécula de água.....	39
Figura 11 – Diedros considerados na construção dos seis confôrmeros (C1-C6) do INHHQ.....	44
Figura 12 – Confôrmeros construídos a partir da estrutura do INHHQ.....	44
Figura 13 – Estrutura dos peptídeos ZnAb ₁₋₁₆ (1ZE9) e Ab ₄₂ (1Z0Q) utilizados na modelagem do peptídeo ZnAb ₁₋₄₂	45
Figura 14 – Representação do modelo mimético utilizado para obtenção dos parâmetros para montagem do sítio metálico no peptídeo.....	47
Figura 15 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos e ao zinco. Os substituintes R indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada em relação ao campo de força usado para o peptídeo.	47
Figura 16 – Orientação do INHHQ em relação ao peptídeo. A) Posição do ligante no modelo 1:1 (md_02); B) Posição do segundo ligante no modelo 1:2 (md_03). Aminoácidos da esfera de coordenação e o metal estão indicados na estrutura do peptídeo.	50
Figura 17 – Representações dos peptídeos formando o dímero na simulação em solvente implícito. O sítio metálico de ZnAb ₄₀ está indicado no peptídeo de vermelho.....	51

Figura 18 – Modelos construídos para observar a interação dímero-ligante. A) Posição de um ligante no sistema MD_02 . B) Posição do segundo ligante em MD_03 . O sítio metálico de ZnAb ₄₀ está indicado no peptídeo em vermelho.	52
Figura 19 – Modelo mimético utilizado para representar o sítio metálico após a coordenação do ligante INHHQ via O2.....	53
Figura 20 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos, ao INHHQ e Zn. Os substituintes R indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada em relação ao campo de força FF14SB.	54
Figura 21 – Modelo mimético usado para o cálculo de constantes de força e cargas.	55
Figura 22 – Cargas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos His13 e His14, ao INHHQ e ao Zn. Os substituintes R indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada.	56
Figura 23 – Complexo livre [Zn(H ₂ L)(H ₂ O) ₂] ²⁺ usado na simulação.	57
Figura 24 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos do INHHQ, H ₂ O e ao Zn.	58
Figura 25 – Gráficos dos diedros δ1, δ2 e δ3 para as seis espécies avaliadas.	61
Figura 26 – Estrutura média de 5.000 <i>frames</i> analisadas ao longo da simulação de 50 ns.	62
Figura 27 – Estrutura otimizada dos complexos de zinco após coordenação do INHHQ. Os átomos ligados ao metal estão indicados por uma linha preenchida e a interação com o metal pela linha pontilhada, ambos baseados nas distâncias de ligação.	63
Figura 28 – A) Peptídeo Ab ₄₀ em 5 instantes da simulação; B) Gráfico RMSD; C) Raio de giro; D) Flutuações médias RMSF.....	67
Figura 29 – Representação da região de alfa hélice e <i>turn</i> na estrutura final de md_00 . Aminoácidos da região Ab ₁₇₋₂₁ e Ab ₃₀₋₃₅ em representação de bastão e bola.....	68
Figura 30 – A) Sítio metálico no peptídeo; B) Estrutura do peptídeo em três instantes da simulação; C) RMSD – Zn: sítio metálico e ZnAb: peptídeo; D) Raio de giro; E) Flutuações médias.....	69
Figura 31 – A) Sobreposição de 8 estruturas do H ₂ L ao longo da simulação; B) Região Ab ₂₁₋₄₀ indicando o ligante e alguns aminoácidos interagentes; C) RMSD; D) Raio de Giro; E) Flutuações médias.	71
Figura 32 – A) Número de contatos entre os ligantes e ZnAb. Em destaque é mostrado a docagem dos dois ligantes no peptídeo após 175 ns; B) RMSD; C) Raio de giro; D) Flutuações médias.....	72
Figura 33 – A) Estrutura do dímero MD_01 ; B) RMSD – Ab: peptídeo, ZnAb: peptídeo com metal, Zn: sítio metálico; C) Raio de giro; D) Flutuações médias de cada monômero.....	74

Figura 34 – A) Representação do dímero com INHHQ próximo ao peptídeo ZnAb; B) RMSD; C) Raio de giro; D) Flutuações médias para cada peptídeo.	75
Figura 35 – A) Estrutura do dímero com a região N-ter de Ab ₁₋₄₀ afastada; B) RMSD; C) Raio de giro; D) Flutuações médias por peptídeo.	76
Figura 36 – A) Modelo mimético minimalista zm com aminoácidos indicados. B) Modelo mimético maior ZM . C) Modelo MD_01 representando o sistema “real” usado na DM.	78
Figura 37 – Caminho de reação proposto com modelo zm . O destaque é feito para os fragmentos mais importantes do sistema.	81
Figura 38 – A) O Grupo piridil volumoso promove o rearranjo da cadeia peptídica em destaque. B) Molécula de água considerada na transferência de próton entre H ₂ L e Glu	82
Figura 39 – A) Ligante coordenado ao zinco; B) Cadeia peptídica protegendo o sítio metálico com estrutura do H ₂ L; C) RMSD; D) Raio de giro; E) Flutuação média por peptídeo.	85
Figura 40 – MD_05 em três instantes diferentes mostrando a orientação da região N-terminal em ZnAb com: A) ligante preso; B) ligante exposto e C) interação π -stacking formada com Phe4; D) RMSD; E) Raio de giro; F) Flutuações médias por peptídeo.	86
Figura 41 – Quatro representações de MD_06 com A) Complexo no início da produção; B) Próximo à região entre os peptídeos; C) Interagindo com resíduos carregados Asp e Glu; D) Formando ligações de hidrogênio entre peptídeos; E) RMSD; F) Raio de giro; G) Flutuações médias por peptídeo.	88
Gráfico 1 – Perfil energia ΔG^{SP} ao longo do caminho de reação para ambos os modelos.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doenças de proteínas desenoveladas associadas à formação de depósitos amiloide extra ou intracelular.	19
Tabela 2 – Níveis de concentração relativa de metais Cu, Zn e Fe em portadores de DA vs. não portadores de mesma idade (↓ concentrações menores, ↑ concentrações maiores, ~ concentrações parecidas, - não determinado).	23
Tabela 3 – Metodologias encontradas na literatura entre 2007 e 2018 para tratar sistemas envolvendo zinco.	29
Tabela 4 – Funções de base ECP e <i>all-electron</i> de acordo com o número de funções de cada tipo para o Zn.	31
Tabela 5 – Diferença absoluta entre os dados estruturais calculados e do complexo descrito por Li et al. (2016). Comprimento de ligação em Å e ângulos em graus.	32
Tabela 6 – Diferença absoluta entre os dados estruturais calculados e do complexo descrito por Cukierman et al. (2018). Comprimento de ligação em Å e ângulos em graus.	33
Tabela 7 – Estruturas da Ab em que o peptídeo está coordenado ao zinco. Também está indicado a sequência completa da Ab de humanos e ratos para comparação.	36
Tabela 8 – Alguns dos modos de coordenação propostos na literatura para o íon Zn^{2+} coordenado ao peptídeo Ab. Dados da Tabela 7 também estão incluídos.	36
Tabela 9 – Parâmetros estruturais do complexo $\{[Zn(H_2L)(His)_3] \cdots H_2O \cdots Glu\}^+$ nos modos monodentado e bidentado ($N^{\wedge}N$). Ângulos usados no cálculo de τ_4 e τ_5 estão sublinhados. .	41
Tabela 10 – Parâmetros inseridos no campo de força do metal. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $kcal\ mol^{-1}\text{Å}^{-2}$ e $kcal\ mol^{-1}\ rad^{-2}$, respectivamente, com ligações em Å e ângulos em graus.	49
Tabela 11 – Parâmetros inseridos no campo de força do metal. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $kcal\ mol^{-1}\text{Å}^{-2}$ e $kcal\ mol^{-1}\ rad^{-2}$, respectivamente, com ligações em Å e ângulos em graus.	53
Tabela 12 – Parâmetros inseridos no campo de força do Zn. Constantes k_b , k_θ e V_n são dadas em $kcal\ mol^{-1}\text{Å}^{-2}$ e $kcal\ mol^{-1}\ rad^{-2}$, respectivamente, com ligações em Å e ângulos em graus. ...	56
Tabela 13 – Parâmetros obtidos para o complexo. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $kcal\ mol^{-1}\text{Å}^{-2}$ e $kcal\ mol^{-1}\ rad^{-2}$, respectivamente, com ligações em Å e ângulos em graus. ...	58

Tabela 14 – Conformações C1-C6 e sua estrutura otimizada em nível B3LYP/6-31+G(d,p) com MPE em escala relativa – azul: menor densidade eletrônica; vermelho: maior densidade eletrônica – e energias em kcal mol ⁻¹	60
Tabela 15 – Energias calculadas para as reações 1-4 sobre a estrutura otimizada em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD/SMD. Todos os valores estão em kcal mol ⁻¹	64
Tabela 16 – Parâmetros estruturais dos complexos 1-4 otimizados em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD/SMD. Comprimentos de ligação em Å com ligações mais curtas sublinhadas e ângulos em graus.	66
Tabela 17 – Valores de energia para cada etapa da reação proposta empregando os modelos zm e ZM . Energias em kcal mol ⁻¹	79
Tabela 18 – Parâmetros estruturais da espécie zm_d nos modos monodentado e bidentado (N^N). Ângulos usados no cálculo de τ_4 e τ_5 estão sublinhados.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%SS	Percentual de formação de estrutura secundária
3-10	Estrutura secundária de hélice 3-10
Ab	Peptídeo beta amiloide
Ac	Acetato
Alfa	Estrutura secundária de α hélice
Anti	Estrutura secundária de folha β antiparalela
APP	do inglês <i>Amyloid protein precursor</i>
ChelpG	do inglês <i>Charges from Electrostatic Potentials using a Grid-based method</i>
DA	Doença de Alzheimer
DFT	do inglês <i>Density Functional Theory</i>
DM	Dinâmica Molecular
ECP	do inglês <i>Effective Core Potential</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GAFF	Campo de força <i>General Amber Force Field</i>
Glu / E	Glutamato
HAc	Ácido acético
HCQ	Clioquinol
HGlu	Ácido glutâmico
His / H	Histidina
HPCIH	Piridina-2-carboxaldeido isonicotinoil-hidrazona
INHHQ	8-hidroxiquinol-2-carboxaldeido isonicotinoil-hidrazona
MPAC	do inglês <i>Metal-Protein Attenuating Compound</i>
MPE	Mapa de Potencial Eletrostático
MPMP / MP	Método de Perturbação de Møller-Plesset
NPT	Número de partículas, volume e pressão constante
NVT	Número de partículas, volume e temperatura constante
Para	Estrutura secundária de folha β paralela
Pi	Estrutura secundária de hélice π

Rg	do inglês <i>Radius of gyration</i>
RMSD	do inglês <i>Root mean squared deviation</i>
RMSF	do inglês <i>Root mean squared fluctuation</i>
SDD	Potencial efetivo de caroço de Stuttgart/Dresden
SMD	Modelo de implícito de solvatação <i>Solvent Model based on Density</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

k_b	Constante de força de ligação
k_θ	Constante de força angular
V_n	Constante de força de torsão (diedro)
ε	Energia potencial no fundo do poço potencial
σ	Distância interatômica em que a energia potencial vale zero
τ_4	Índice geométrico para número de coordenação 4
τ_5	Índice geométrico (índice de trigonalidade) para número de coordenação 5

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	DEMÊNCIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	16
1.2	PATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	18
1.3	ATENUANTES DA INTERAÇÃO METAL PROTEÍNA (MPACS)	23
1.4	DERIVADOS DO HQ E INHHQ	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
3	MECÂNICA QUÂNTICA E NÍVEL TEÓRICO	29
4	PROPOSTA DE MECANISMO	35
5	DINÂMICA MOLECULAR E CONSTRUÇÃO DO SISTEMA.....	43
5.1	SIMULAÇÃO DO LIGANTE INHHQ	44
5.2	CONSTRUÇÃO DO MONÔMERO: SISTEMA MD_00 E MD_01.....	45
5.3	INCLUSÃO DO LIGANTE: SISTEMA MD_02 E MD_03.....	49
5.4	CONSTRUÇÃO DO DÍMERO: SISTEMA MD_01.....	51
5.5	INCLUSÃO DO LIGANTE: SISTEMAS MD_02 E MD_03.....	52
5.6	INHHQ COORDENADO AO ZN: SISTEMA MD_04.....	52
5.7	INHHQ COORDENADO AO ZN: SISTEMA MD_05.....	54
5.8	COMPLEXO LIVRE $[Zn(H_2L)(H_2O)_2]^{2+}$: SISTEMA MD_06.....	57
6	ESTUDO DO LIGANTE INHHQ.....	59
7	FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ZINCO COM INHHQ.....	63
8	ANÁLISES DAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR	67
8.1	SIMULAÇÕES COM MONÔMERO ZNAB – (ZNAB ₁₋₄₀):	70
8.2	SIMULAÇÕES COM DÍMERO [ZNAB.AB] – (AB ₁₋₄₀ ; ZNAB ₄₁₋₈₀):	73
9	MECANISMO DE REAÇÃO – MODELO QUÂNTICO E CLÁSSICO	78
10	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DAS ANÁLISES..	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEMÊNCIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER

Demência não é especificamente uma doença, mas uma classificação que envolve um conjunto de sintomas em que há comprometimento cognitivo prejudicando a qualidade de vida do indivíduo. Alguns dos sintomas mais comuns associados à demência envolvem comprometimento da memória, dificuldades de comunicação e linguagem, da habilidade de manter o foco, de realizar julgamento racionalmente e na percepção visual-espacial. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa classificada como um tipo de demência, sendo responsável por cerca de 50-75% dos casos de demência. Com a evolução da doença ocorre morte dos neurônios e atrofia do cérebro, sendo a DA uma doença progressiva, irreversível e ainda sem cura (INSTITUTO ALZHEIMER BRASIL, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019).

Historicamente a doença de Alzheimer foi inicialmente observada pelo psiquiatra Alois Alzheimer em 1906, na cidade de Tübingen, Alemanha (VIEGAS et al., 2011). Sua descrição da doença surge com o acompanhamento da paciente Auguste Deter, que apresentava déficit de memória, alterações comportamentais e incapacidade em realizar atividades básicas. Após seu falecimento, Alzheimer examinou o cérebro de Auguste com microscópio, descrevendo a presença de aglomerados extracelulares chamados de placas senis e intracelulares chamados emaranhados neurofibrilares. Ambos aglomerados se tornaram características principais de portadores da DA e são formados principalmente por proteínas (VIEGAS et al., 2011; FALCO et al., 2015; BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017). As placas senis são constituídas pelo peptídeo beta amiloide (Ab) enquanto os emaranhados neurofibrilares pela proteína tau. O acúmulo dessas proteínas é um processo longo que leva anos até que os danos aos neurônios e os sintomas da doença sejam notados.

A DA é uma doença complexa em que vários mecanismos foram descritos como envolvidos na sua manifestação. Alguns deles são fatores genéticos, epigenéticos, metabólicos, reações inflamatórias, estresse oxidativo, envolvimento de proteínas plasmáticas e cerebrais, fatores ambientais dentre outros (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2019). Apesar dos agravantes citados, a idade continua sendo o fator determinante no desenvolvimento da doença.

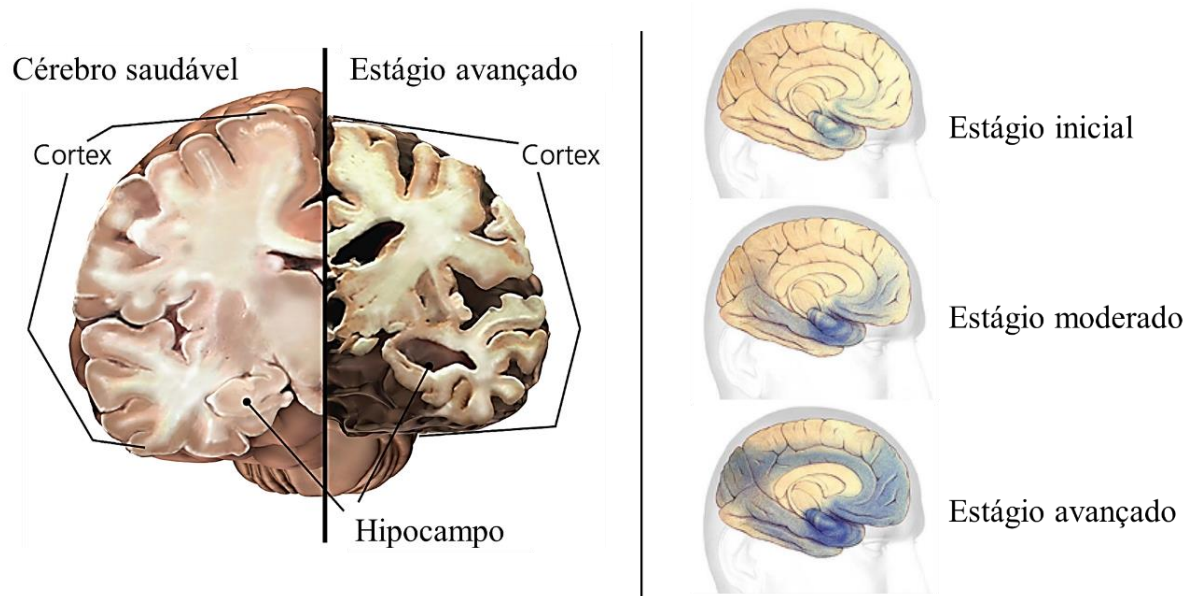
Em seu estágio inicial, é observado um leve comprometimento cognitivo do indivíduo, como problemas de memória, de concentração, de julgamento e na realização de cálculos. Com

o avanço da doença, os sintomas ficam bem evidentes e o portador apresenta problemas de reconhecimento de familiares, incapacidade de aprendizado, dificuldades de se vestir, alucinações, delírio e mesmo comportamento impulsivo. No estágio mais avançado, o portador se torna totalmente dependente de cuidadores, sua comunicação se resume a gemidos e grunhidos e ocorre um aumento da sonolência (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). A Figura 1 mostra de modo simplificado o espalhamento da doença pelo cérebro e a atrofia cortical causada pela morte dos neurônios no estágio avançado da DA. Ao atingir o estágio mais severo da doença, o portador se torna vulnerável a infecções, principalmente a pneumonia (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019).

Como já mencionado, a DA é uma doença irreversível, não havendo atualmente uma cura, mas somente tratamentos que procuram minimizar os sintomas da doença e melhorar a qualidade de vida do portador (INSTITUTO ALZHEIMER BRASIL, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). Somente nos Estados Unidos o número de pessoas com DA chega a 5,8 milhões (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019), com uma estimativa de que em 2050 esse número ultrapasse 16 milhões. Em relação ao Brasil, a estimativa em 2015 estava em torno de 1 milhão de casos, sendo o valor real subestimado por falta de dados mais precisos (FALCO et al., 2015). Segundo o relatório mundial do Alzheimer de 2018 publicado pela Alzheimer's Disease International – “World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers” (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2019) – estimavam-se cerca de 50 milhões de pessoas com demência no mundo, dos quais dois terços ou mais são portadores de DA.

Na época do relatório, o custo envolvido nos cuidados relacionados à demência estava em torno 1 trilhão de dólares. Não otimista, o relatório reporta também a perspectiva de crescimento do número de portadores de demência para os próximos 30 anos, atingindo mais de 150 milhões de pessoas em todo o mundo. Esses números são reflexo do aumento da expectativa de vida da população, que gradualmente atinge a faixa etária mais suscetível ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Apesar dos indicativos de crescimento no número de pessoas com DA, algumas associações e agentes têm trabalhado dando suporte aos portadores da doença, aos familiares e pesquisadores ao redor do mundo. A citar, no exterior: Alzheimer's Association e Alzheimer's Disease International, e no Brasil: Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAz) e Instituto Alzheimer Brasil (IAB).

Figura 1 – Com o avanço da DA ocorre morte neuronal e consequente atrofia do cérebro (esquerda). O início da doença ocorre na região do hipocampo (direita), se espalhando por todo o cérebro no estágio avançado.



Fonte: Adaptado de Brain Facts Book e Alzheimer's Association

1.2 PATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Chiti e Dobson (2006) descrevem como uma classe de doenças aquelas em que ocorre conversão de peptídeos específicos ou mesmo proteínas de sua forma funcional solúvel à agregados fibrilares bastante ordenados. Essas doenças fazem parte do que eles chamam de 'doenças de proteínas desenoveladas' (do inglês *protein misfolding diseases*), em que os peptídeos ou proteínas falham em manter sua estrutura nativa funcional. Dentro dessa classe de doenças, podem ser citadas a DA, a doença de Parkinson (DP), a esclerose amiotrófica lateral, dentre outras que são apresentadas na Tabela 1. É observado uma correlação entre o grau de deficiência cognitiva na DA e a quantidade de peptídeo beta amiloide de pequena massa (do inglês *low-molecular-weight*), incluindo pequenos oligômeros. Um dos pontos defendidos pelos autores estaria na alta proporção de resíduos expostos na superfície de pequenos agregados em relação a agregados maiores, o que seria responsável por sua maior reatividade, logo maior toxicidade (CHITI; DOBSON, 2006).

Na doença de Alzheimer também é observado um aumento do desequilíbrio homeostático dos metais zinco, ferro e cobre, o que prejudica o funcionamento adequado do cérebro podendo

afetar o funcionamento de proteínas, seu enovelamento adequado e propiciar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no caso dos metais ferro e cobre. A perda da capacidade de regulação desses íons está relacionada ao envelhecimento natural, mas se apresenta de forma agravada nos portadores da DA (MIGLIORINI et al., 2012). Essa desregulação acentuada ainda não foi estabelecida como se causada pela doença ou se responsável por agravar os sintomas da doença. De qualquer forma, ainda o papel desses íons é relevante no que diz respeito à doença.

Tabela 1 – Doenças de proteínas desenoveladas associadas à formação de depósitos amiloide extra ou intracelular.

Doença	Proteína ou peptídeo	Núm. de resíduos	Estrutura nativa da proteína ou peptídeo
Doença de Alzheimer	Peptídeo beta amiloide	40 ou 42	Nativamente desenovelada
Encefalopatia espongiforme	Proteína príon ou seus fragmentos	253	Nativamente desenovelada (1-120) e α -hélice (121-230)
Doença de Parkinson	α -sinucleína	140	Nativamente desenovelada
Demência com corpos de Lewi	α -sinucleína	140	Nativamente desenovelada
Esclerose Amiotrófica Lateral	Superóxido dismutase 1	153	Toda-beta, Ig like
Doença de Huntington	Huntingtin com expansão polyQ	3144	Amplamente desenovelada

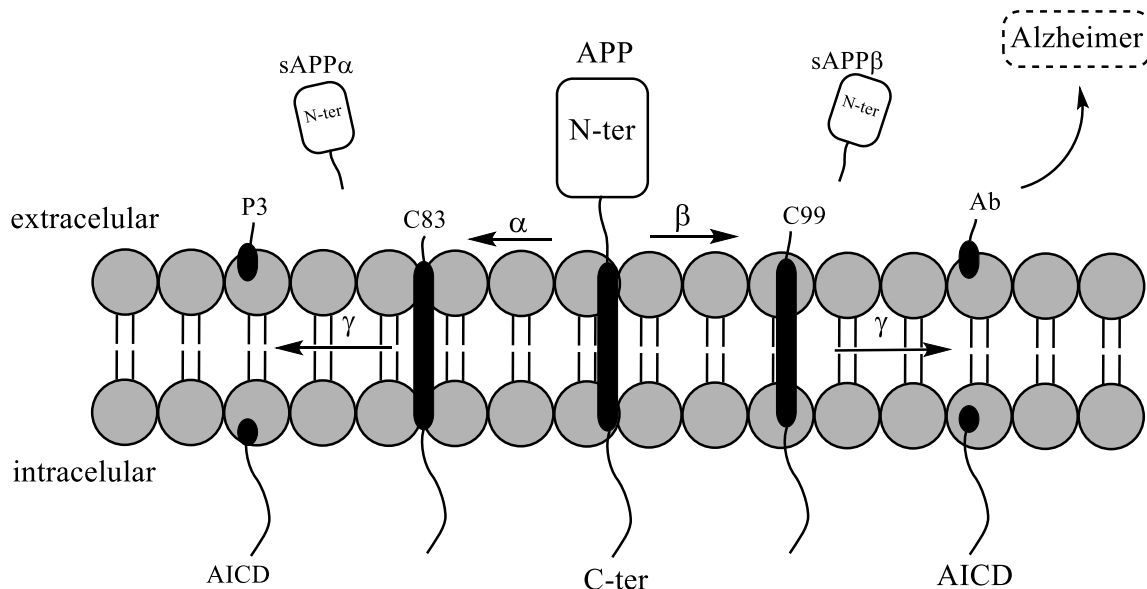
Fonte: Adaptado de Chiti e Dobson (2006).

Do ponto de vista molecular, algumas hipóteses foram estabelecidas procurando entender a origem da DA, tendo sido modificadas ao longo do tempo à medida que novas descobertas foram (e estão sendo) feitas. A primeira hipótese postulada foi chamada hipótese colinérgica, enunciada no início dos anos 80 (FALCO et al., 2015). A função colinérgica é conhecida pela sua importância na formação de novas memórias e no aprendizado, havendo papel importante do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Uma medida tomada para promover a maior disponibilidade da acetilcolina é utilizar os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por metabolizar a ACh. Uma vez que a AChE é inibida, a maior disponibilidade de seu substrato no cérebro permite maior ativação dos neurônios e promove relativo ganho de cognição. Nos Estados Unidos a *Food and Drug Administration* (FDA) já autoriza o uso de alguns medicamentos que atuam como inibidores da AChE como Donezepil, Rivastagmina e Galantamina (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). Apesar do uso dos inibidores, o

tratamento é focado nos sintomas (cognitivos), não tendo sido observado retrocesso ou estagnação da doença.

Como já mencionado, uma das principais características da DA é a presença de agregados extracelulares formados pelo peptídeo beta amiloide (Ab). Mesmo a Ab sendo encontrado em pacientes saudáveis e na corrente sanguínea, sua produção tem um papel central no desenvolvimento e agravamento da DA. Com origem nos anos 90 a hipótese amiloide ou hipótese da cascata amiloide foi postulada, em que a Ab e/ou os produtos do metabolismo da proteína precursora amiloide (APP) seriam neurotóxicos e poderiam levar à morte celular (FALCO et al., 2015). A APP é uma proteína transmembrana com o segmento N-terminal extracelular, um fragmento intramembrana e a região C-terminal intracelular. Essa proteína pode ser metabolizada por duas vias antagônicas, a principal delas via α -secretase e outra pela β -secretase (Figura 2) (CHASSEIGNEAUX; ALLINQUANT, 2011). O caminho via α -secretase é seguido de clivagem pela γ -secretase liberando os fragmentos sAPP α , AICD e P3, não citotóxicos. A rota antagônica via β -secretase leva à formação dos fragmentos sAPP β , AICD e da Ab, a principal constituinte das placas senis.

Figura 2 – Representação das vias metabólicas da proteína APP. α , β e γ representam as enzimas que metabolizam a APP.

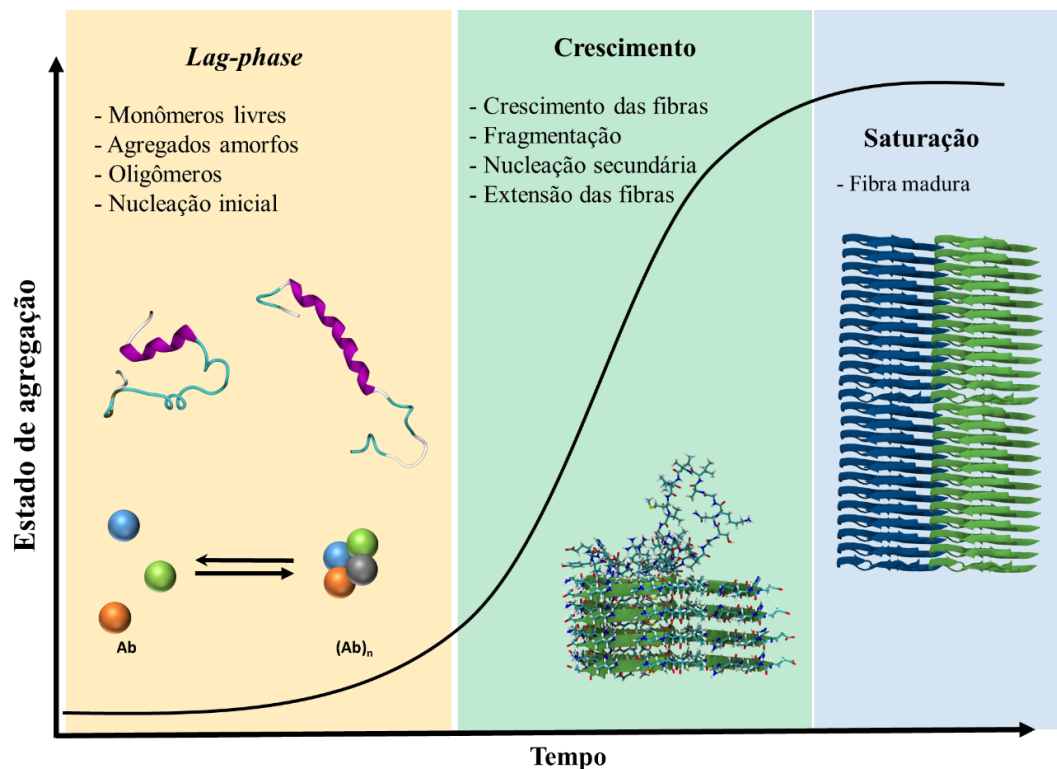


Ab - D₁AEFR₅HDSGY₁₀EVHHQ₁₅KLVFF₂₀AEDVG₂₅SNKGA₃₀IIGLM₃₅VGGVV₄₀IA

Fonte: Adaptado de Chen et al. (2017).

A Ab é produzida principalmente nas formas com 40 e 42 resíduos de aminoácido (Ab_{40} e Ab_{42}), sendo Ab_{40} a mais abundante e mais solúvel. Além disso, a Ab_{42} é encontrada em maior concentração nas placas senis, sendo considerada mais citotóxica (FALCO et al., 2015). A partir da produção da Ab, a formação das fibras é conhecida por ocorrer em três etapas: (i) nucleação ou *lag-phase*, (ii) crescimento e (iii) maturação ou saturação (Figura 3). Durante a etapa (i), pequenos agregados oligoméricos não estruturados são formados. Sua estrutura desordenada mantém os peptídeos em equilíbrio com a forma monomérica solúvel. Com a formação de agregados maiores, ocorre a mudança conformacional e os oligômeros começam a apresentar estrutura secundária de folhas beta. Na etapa (ii) ocorre rápido crescimento (exponencial) das proto-fibras com estrutura ordenada, em que monômeros e oligômeros vão se acoplando continuamente promovendo seu crescimento. Na fase (iii), etapa final de maturação, as fibras são formadas e se combinam formando as placas amiloides, observadas nos portadores da doença de Alzheimer. Diferentes artigos de revisão descrevem de forma esquemática a formação das fibras amiloides. A citar alguns trabalhos: Hamley (2012), Alies, Hureau e Faller (2013), Falco et al. (2015), Lee et al. (2017), Ke et al. (2017), Rajasekhar e Govindaraju (2018) e Ilie e Cafilisch (2019).

Figura 3 – Representação esquemática das fases de agregação da Ab.



Fonte: Adaptado de Ilie e Cafilisch (2019).

Com o avanço dos estudos sobre a beta amiloide acompanhada de nenhum sucesso no tratamento da DA ao longo das últimas décadas, alguns autores têm questionado seu papel no desenvolvimento da doença. Doig et al. (2017) apresentam 16 possíveis motivos de as pesquisas acerca do papel da Ab estarem falhando na formulação de um fármaco em potencial para o tratamento da DA. A reprodutibilidade de experimentos biofísicos *in vitro*, o caráter heterogêneo dos agregados não fibrilares (dependentes do modo de *seeding* para sua formação) e o envolvimento de outras proteínas na DA além da Ab, são alguns dos processos que precisam ser considerados nos estudos. Segundo os autores, ensaios clínicos deveriam focar principalmente na combinação de compostos que atuem em diferentes alvos buscando um efeito sinérgico, mais do que nos compostos individualmente. Kametani e Hasegawa (2018) também argumentam sobre o papel da proteína tau, não a Ab, como responsável pelo desenvolvimento e progressão da DA.

Apesar da discussão acerca do tema, ainda não é conhecida a origem da DA, e discutir a predominância da hipótese amiloide seria o mais adequado (MARCO-CONTELLES, 2019). Mesmo com alguns resultados controversos e que poderiam ser usados como provas da falha da hipótese amiloide, o papel da Ab é central na DA e precisa ser verificada com maior rigor (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018; FISH et al., 2019).

Uma outra hipótese que surge relacionada à Ab é a chamada hipótese metálica. Essa nova hipótese é sustentada pela presença de altas concentrações dos íons Fe, Zn e Cu encontradas nas placas amiloides e o pela desregulação homeostática desses íons agravada nos portadores da DA (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018). A literatura descreve as concentrações de Zn entre 150 e 200 μM na região do neocórtex, Cu entre 60-110 μM na massa cinzenta e Fe sendo encontrado no cérebro em concentrações uma ou duas ordens de grandeza maiores que no sangue (STRODEL; COSKUNER-WEBER, 2019). Em cérebros *post-mortem* de portadores da DA foram encontradas elevadas concentrações desses metais no núcleo e periferia das placas amiloides (~400 μM de Cu, ~950 μM de Fe e 1.100 μM de Zn) (MOT et al., 2011; RANA; SHARMA, 2019). Na Tabela 2 são apresentados dados qualitativos de concentração relativa em diferentes partes do cérebro para esses metais. Zinco e cobre são conhecidos por acelerarem o processo de agregação da Ab se ligando na região hidrofílica Ab₁₋₁₆ principalmente aos aminoácidos carregados Asp, Glu e à His (WINEMAN-FISHER; BLOCH; MILLER, 2016; RANA; SHARMA, 2019). Já o cobre e ferro são espécies redox ativas e, como já mencionado, podem promover a formação de EROs (H_2O_2 e $\text{HO}\cdot$) via reações de Fenton. A produção desses

radicais é danosa ao organismo, além de disparar sinais neuroinflamatórios, causando danos neuronais.

Um aspecto interessante dos dados referentes à coordenação desses íons à Ab está no envolvimento predominante de pelo menos duas das histidinas His6, His13 e His14 presentes na estrutura do peptídeo (MIGLIORINI et al., 2012; WINEMAN-FISHER; BLOCH; MILLER, 2016). O segmento ${}_{11}\text{EVHH}_{14}$ parece ter papel importante na retenção do zinco na estrutura do peptídeo, uma vez que apresenta três grupos quelantes possíveis de se coordenar aos metais (ZIRAH et al., 2005; ISTRATE et al., 2016). Além disso, é observado que ratos não desenvolvem a DA, sendo que o peptídeo difere somente em três aminoácidos em relação ao Ab₄₂ humano: R5G, Y10F e H13R. Uma vez que o segmento ${}_{11}\text{EVRH}_{14}$ em ratos só possui dois grupos quelantes, a formação de espécies oligoméricas de Ab citotóxicas seria reduzida (ISTRATE et al., 2012).

Visto que a caracterização do sítio de coordenação dos metais na Ab pode facilitar o entendimento do seu papel, muitos estudos computacionais têm sido realizados buscando determinar os modos de coordenação mais prováveis do zinco, cobre e ferro, assim como seu efeito na estrutura do peptídeo (LI et al., 2007; MARINO et al., 2010; ALÍ-TORRES et al., 2011; ALÍ-TORRES et al., 2014; SHI; KANG; LEE, 2014; COSKUNER, 2016).

Tabela 2 – Níveis de concentração relativa de metais Cu, Zn e Fe em portadores de DA vs. não portadores de mesma idade (↓ concentrações menores, ↑ concentrações maiores, ~ concentrações parecidas, - não determinado).

Parte do encéfalo	Cu	Zn	Fe
Hipocampo	↓	↑	↑
Amígdala	↓	↑	↑
Putâmen	↑	↑	-
Placas senis	↑	↑	~
Córtex geral	~	↑	~
Líquido cefalorraquidiano	↑	↑	~
Sangue	~	~	↑
Cabelo	~	~	~

Fonte: Adaptado de Kepp (2017).

1.3 ATENUANTES DA INTERAÇÃO METAL PROTEÍNA (MPACS)

Uma forma de mitigar o efeito deletério atribuído aos metais envolve reduzir sua concentração e reestabelecer a homeostase. Empregar moléculas com caráter quelante e que

possuam alta afinidade por esses íons é uma das medidas envolvidas no que é chamado terapia quelante. Entretanto, a simples captura desses íons pode não ser a alternativa mais eficiente, visto que se tratam de metais fundamentais para o funcionamento adequado do organismo. Uma melhor alternativa envolve capturar e redistribuir os metais, facilitando a restauração da homeostase. SVELIEFF et al., 2018 citam Ashley I. Bush como primeiro autor a indicar o papel do íon Zn(II) na agregação da Ab. Além disso, A. I. Bush chama a atenção para uma nova classe de compostos chamados atenuantes da interação metal-proteína (do inglês *Metal-Protein Attenuating Compounds*, MPACs) (RITCHIE; BUSH; MASTERS, 2004). Esses compostos teriam como função capturar e redistribuir íons de modo a reestabelecer sua homeostase no meio biológico.

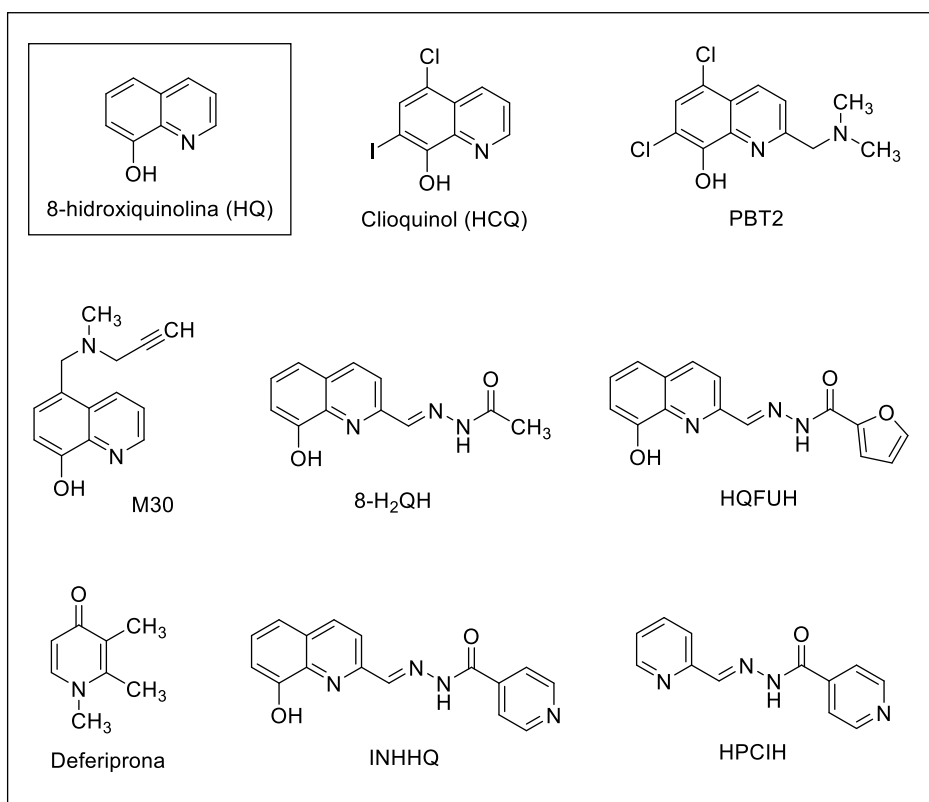
Como mencionado, a coordenação do MPAC ao metal deve ser seletiva, de modo que reduza as interações anormais entre metal-proteína, fracamente ligados, mas não afete o funcionamento de enzimas e outras proteínas fundamentais. Para isso, a constante de formação Metal-MPAC deve ser intermediária, de modo que o ligante não permanecerá coordenado ao metal. Sua função é reestabelecer o equilíbrio nas regiões afetadas pelo excesso dos íons metálicos, fazendo seu transporte para regiões de baixa concentração, restaurando então a homeostase. Dentro dessa classe, o primeiro composto estudado como potencial MPAC para o tratamento da DA foi um derivado quinolínico chamado clioquinol (HCQ) (Figura 4).

O HCQ foi primeiramente produzido em 1934 e comercializado como amebicida intestinal, porém por volta dos anos 70 ele foi retirado de circulação por ter sido correlacionado com casos da síndrome de SMON (do inglês *subacute myelo-optic neuropathy*) ocorridos no Japão, causando cegueira e uma paralisia debilitante. Sua capacidade de formar complexos quelantes com zinco e cobre despertou o interesse de pesquisadores em seu uso como MPAC no tratamento da DA, doença de Parkinson e doença de Huntington. Em testes com ratos transgênicos com sintomas de DA e altos níveis de acúmulo de Ab, o tratamento oral com HCQ promoveu redução em quase 50% dos depósitos do peptídeo e resultou em melhora dos sintomas da doença. Um dos motivos para seu funcionamento é sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (barreira que protege o sistema nervoso central) e atingir as regiões afetadas pelo acúmulo de proteínas (BAREGGI; CORNELLI, 2010; MOT et al., 2011).

Apesar dos resultados, o HCQ não chegou a passar da fase 2 de testes clínicos, por não demonstrar melhora cognitiva estatisticamente significativa. Um possível teste clínico em fase 3 para o HCQ foi abandonado (SAMPSON; JENAGARATNAM; MCSHANE, 2014). Uma segunda geração do HCQ foi elaborada com PBT2 (Figura 4), que apresentou maior afinidade

pelos íons zinco(II) e cobre(II) em relação ao seu antecessor e promoveu redução da formação de placas. O PBT2 parece ser seguro e bem tolerado em portadores de DA em estágio inicial, sendo necessário novos testes clínicos para verificação de melhora cognitiva (SAMPSON; JENAGARATNAM; MCSHANE, 2014).

Figura 4. Alguns compostos derivados da 8-hidroxiquinolina, com exceção da Deferiprona e do HPICH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4 DERIVADOS DO HQ E INHHQ

Dentro do grupo de derivados da HQ, Gomes et al. (2014) apresentaram três derivados quinolínicos com aplicação como possíveis MPACs, dentre os quais o 8-H₂QH (Figura 4). Os estudos demonstraram a capacidade desses compostos de se ligar ao cobre(II) em condições fisiológicas, além de apresentar redução estatisticamente significativa na agregação de Ab₄₀ em relação ao controle negativo na presença de metal. Os autores também reportaram uma proposta de coordenação do 8-H₂QH ao cobre como complexo [Cu(8-HQH)₂] a partir de dados teóricos, em que o ligante estaria desprotonado no oxigênio quinolínico e coordenado de forma bidentada.

Hauser-Davis et al. (2015) descreveram a atividade *in vitro* do INHHQ (Figura 4) frente aos metais cobre e zinco na presença da Ab₄₀ e reportaram dados farmacológicos e farmacocinéticos obtidos *in silico* desse potencial MPAC. Após a formação dos agregados metal-proteína, a adição de até 5 equivalentes do INHHQ removeu completamente os efeitos observados no espectro de RMN da proteína provocados pela sua coordenação do metal. Além disso, não foram observadas mudanças no perfil do espectro de RMN da proteína na presença do INHHQ, indicando que sua interação direta com a Ab₄₀ não deve ocorrer. Em estudos realizados com ratos, não foram observados efeitos colaterais na administração do INHHQ em concentrações de até 300 mg kg⁻¹, o que reforça sua potencial aplicação como MPAC.

Cukierman et al. (2017) também estudaram o INHHQ atuando frente à proteína α -sinucleína (α -Syn) na presença do cobre em ambos estados de oxidação. Essa proteína é conhecida por estar envolvida na doença de Parkinson. Os autores reportam a capacidade do ligante em atravessar a barreira hematoencefálica em ratos, sendo completamente eliminados do cérebro após 48h da injeção intraperitoneal. Assim como foi observado para o estudo com a Ab, o INHHQ foi capaz de remover as interações cobre-(α -Syn) através de um mecanismo suposto pelos autores como possivelmente via quelatação. Buscando explorar mais sobre a estrutura e função do INHHQ, Cukierman et al. (2018) avaliaram seu análogo HPCIH (Figura 4) como membro de uma classe promissora de derivados da aroilhidrazona. O HPCIH difere do INHHQ pela ausência do grupo fenol na 8-hidroxinolina, podendo ser considerado seu modelo simplificado. Os autores realizaram uma série de análises espectroscópicas, caracterizando seu composto de coordenação formado com zinco(II) em estequiometria 1:1. Nos testes realizados frente ao sistema metal-proteína, o HPICH foi capaz de remover completamente as perturbações induzidas pelo zinco na estrutura da Ab₄₀ em adições de até 10 equivalentes do composto. Os autores concluem dando destaque às similaridades entre INHHQ e HPICH, sugerindo que a presença do grupo fenol pode não ser mandatória na sua função como MPAC.

Outras hipóteses também foram elaboradas abordando diferentes aspectos que envolvem a doença de Alzheimer (FALCO et al., 2015). O leitor interessado em buscar na literatura alguns autores como referência para estudos envolvendo a doença de Alzheimer, a Ab e o papel de biometais nesse contexto pode buscar por: Peter Faller, Ashley I. Bush, Kasper P. Kepp, Mariona Sodupe, Mi Hee Lim, Heloisa Beraldo, Nicolás A. Rey, dentre outros citados ao longo do texto.

Com base no que foi apresentado, o presente trabalho teve como principal enfoque avaliar e propor um mecanismo de atuação da molécula INHHQ (8-hidroxiquinol-2-carboxaldeido isonicotinoil-hidrazona) como MPAC. Como foi mostrado, a hipótese metálica permitiu o surgimento de uma nova classe de compostos quelantes derivados quinolínicos. Estudar o funcionamento dos MPACs em modelos biológicos *in silico* tem papel relevante na proposição e elucidação de mecanismos que possam estar envolvidos na sua atividade.

2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo principal propor um mecanismo de atuação do INHHQ como complexante do íon Zn(II) na estrutura do peptídeo beta amiloide (ZnAb), elucidando seu modo de atuação como atenuante da interação metal-proteína, através de metodologias computacionais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Estabelecer uma proposta de mecanismo de atuação do INHHQ que será estudada ao longo do trabalho;

2) Obter parâmetros necessários para as simulações de dinâmica molecular (DM) da Ab na presença do Zn(II).

3) Realizar simulações de DM de ZnAb com solvente explícito de modo a estabelecer parâmetros de referência para as análises com INHHQ.

4) Incorporar o INHHQ às DMs, considerando diferentes etapas do processo de coordenação, de modo a determinar sua influência na estrutura do peptídeo;

5) Avaliar a mobilidade do INHHQ em regiões hidrofóbicas/hidrofílicas e determinar mudanças conformacionais importantes que possam contribuir para a avaliação do mecanismo estabelecido.

3 MECÂNICA QUÂNTICA E NÍVEL TEÓRICO

Foi feito uma busca na literatura para identificar as metodologias empregadas na descrição e estudo de complexos de zinco para sistemas similares ao projeto. Alguns trabalhos se tratam de estudos de diferentes metodologias com fins de verificação de funcionais e funções de base mais adequados para metais de transição. A Tabela 3 resume as informações de alguns trabalhos realizados entre 2007 e 2018. Considerando o grande número de funcionais disponíveis na literatura (MARDIROSSIAN; HEAD-GORDON, 2017; SOUSA et al., 2009), a principal preocupação nesta etapa do projeto não foi verificar qual funcional melhor reproduz as geometrias dos compostos estudados, visto que essa propriedade é facilmente alcançada por diversos métodos (Tabela 3) (SOUSA et al., 2009).

Tabela 3 – Metodologias encontradas na literatura entre 2007 e 2018 para tratar sistemas envolvendo zinco.

Informação adicional	Funcional	Base para o Zn	Referência
Mais adequados ¹	BP86 (opt) / PBE (opt)	-	J. Chem. Phys. 2007, 126, 014103
Funcionais de 1° escolha ^{1,2}	BB1K, MPWB1K	-	J. Comput. Chem. 2009, 30, 2752
Funcionais de 2° escolha ^{1,2}	MPW1K, B97-2, TPSS	-	
Mais adequados ^{1,3}	M05-2X (opt, SP)	6-311+G(d,p)	J. Chem. Theory Comput. 2009, 5, 1254
-	B3LYP (opt, RMN)	6-31G(d)	J. Coord. Chem. 2010, 63, 2879
⁴	B3LYP (opt)	SDD	Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. 2010, 2, 57
⁵	B3LYP (opt)	(15s11p6d1f)→[10s7p4d1f]	J. Comput. Aided. Mol. Des. 2011, 25, 21
Parâmetros DM ⁶	B3LYP (opt, scan, resp)	SDD e 6-311++G(3df,2pd)	J. Phys. Chem. B, 2012, 116, 13644
Parâmetros DM ⁷	B3LYP (opt)	6-31+G*	Plos One 2013, 8 (9), e70681
⁸	PBE (opt) / M06-2X (SP)	DEF2-SVP	Chem. Eur. J. 2013, 19, 16634
⁹	B3LYP (opt)	6-31+G*	ACS Chem. Neurosci. 2013, 4, 1458
¹⁰	MPW1PW91 (opt)	MBS5 → 6-311G(3fg)	Metallomics, 2014, 6, 2230
-	B3LYP (opt, tddft)	LANL2DZ	Spectrochim. Acta, Part A, 2014, 133, 348
Parâmetros DM ⁷	M06	6-31+G*	J. Phys. Chem. B, 2014, 118, 10355–10361
⁵	B3LYP (opt) e BLYP (opt)	(15s11p6d1f)→[10s7p4d1f]	Phys. Chem. Chem. Phys. 2015, 17, 13582
¹¹	M05-2X (opt)	cc-pVTZ	J. Phys. Chem. B 2015, 119, 12182
¹²	CAM-B3LYP (tddft)	6-311++G(d,p)	J. Mol. Struct. 2016, 1107, 278
¹³	B3LYP (opt)	6-311+G(d,p)	J. Phys. Chem. A 2018, 122, 2906–2914

Cálculos de: (opt) otimização de estrutura; (SP) *single point*; (tddft) *Time-Dependent DFT*; (resp) cargas derivadas do potencial eletrostático; (scan) cálculo de *scan*. ¹ Recomendação dos autores para uso em complexos biológicos. ² Autores sugerem SDD e CEP-121G como boas alternativas para Zn em cálculos de otimização, não recomendando ECP de Los Alamos *large-core formulation* (LANL2DZ). ³ Também foram avaliados B3LYP, M06 e M06-2X. ⁴ ECP em J. Chem. Phys., 86 (1987) 866-72. A função de base para metal foi ampliada com funções difusas e de polarização. Ver referência. ⁵ Base de Watcher com total de funções descontraídas em parênteses e contraídas em colchetes. ⁶ Constantes de força para dinâmicas obtidas por *fit* polinomial de segunda ordem do potencial calculado no scan. ⁷ Parâmetros de dinâmica molecular (k_b , k_θ e cargas). ⁸ SP também calculado com B3LYP, M06-2X, TPSS e PBE com

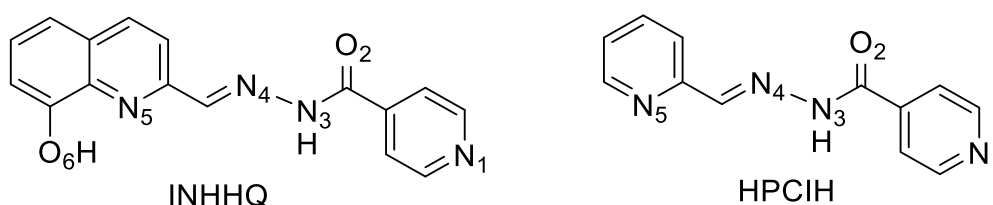
bases TZVP, def2-TZVP e def2-QZVP. ⁹ Modelo de solvatação CPCM e contribuições rotacional e translacional para entropia foram calculadas. Ver referência. ¹⁰ *Benchmarking* com funcionais B3LYP, G96LYP, MPWLYP1M, B3PW91, MPW1PW91, PBE e PBE1. Base MBS5: C, H: 6-311G(d,p); N: 6-311G(3df); Zn: 6-311G(3fg); S: 6-311+G(3df); Cl: 6-311+G(d); Pt: LALN2DZ. ¹¹ Cálculos de energia também feitos com métodos CCSD(T) e MP2. ¹² Estruturas de estado fundamental e estado de transição também otimizadas com B3LYP e WB97XD. ¹³ Cálculos na estrutura de estado fundamental simpleto e tripleto.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Desse modo, neste trabalho foi empregada a DFT, em que a otimização das geometrias dos modelos estudados foi realizada utilizando o funcional híbrido B3LYP (BECKE, 1993; LEE; YANG; PARR, 1988) com as funções de base de Pople 6-31+G(d,p) para os átomos de C, N, O, H e Cl, que inclui um conjunto de funções difusas para os átomos pesados e um conjunto de funções de polarização para todos átomos. Para representar o metal foi feita uma análise de algumas funções de base que tratam todos os elétrons do metal explicitamente (*all-electron*) e potenciais efetivos de caroço (do inglês ECP) que tratam explicitamente somente os elétrons de valência do metal. Com isso, foi feita uma avaliação de algumas funções de base de diferentes famílias para o zinco, resumidas de acordo com o número de funções de cada tipo (*s, p, d, f, ...*) na Tabela 4.

Com base no número de funções contraídas, foram selecionadas as bases *all-electron* Def2-TZVP e Def2-TZVPPD de Ahlrich, o ECP de Los Alamos LANL2DZ e o ECP de Stuttgart-Dresden SDD (Tabela 4). Para a escolha da função de base foram utilizadas duas estruturas de complexos de zinco formados com o HPCIH, que possui estrutura análoga ao INHHQ (Figura 5), o que sugere que ambos ligantes possuem modos de coordenação similares (CUKIERMAN et al., 2018). Ambos complexos se referem ao mesmo composto de coordenação em arranjos cristalográficos diferentes (Figura 6 Figura 7)(LI et al., 2016; CUKIERMAN et al., 2018).

Figura 5 – Estrutura dos ligantes INHHQ e seu análogo HPCIH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Funções de base ECP e *all-electron* de acordo com o número de funções de cada tipo para o Zn.

Função de Base	Núm. de funções contraídas	Família	Referência
Base mínima	4s2p1d	-	-
6-31G	5s4p2d		J. Chem. Phys. 1972, 56, 2257
6-31+G	6s6p3d	Pople's	J. Chem. Phys. 1972, 56, 2257
6-31+G(2df)	6s6p3d2f1g		J. Chem. Phys. 1972, 56, 2257
cc-pVDZ	6s5p3d1f		J. Chem. Phys. 2005, 123, 064107
cc-pVTZ	7s6p4d2f1g	Dunning's	J. Chem. Phys. 2006, 125, 074110
cc-pVQZ	8s7p5d3f2g1h		J. Chem. Phys. 2005, 123, 064107
LANL2MB (STO's)	[18e] 1s1p1d		-
LANL2DZ (GTO's)	[18e] 2s2p2d	Los Alamos'	J. Chem. Phys. 1985, 82, 270
LANL2TZ (GTO's)	[18e] 3s2p3d		J. Chem. Phys. 1985, 82, 299
SDD	[10e] 6s5p3d	Stuttgart-Dresden's	Stuttgart RSC 1997 ECP
Ahlrich's <i>Coulomb Fitting</i>	7s4p2d3f2g		J. Chem. 70, 560 (1992)
Def2-SV(P)	5s3d2p	Ahlrich's	PCCP, 2005,7, 3297-3305
Def2-TZVP	6s5p4d1f		PCCP, 2005,7, 3297-3305
Def2-TZVPPD	6s6p4d2f1g		J. Chem. Phys. 133, 134105 (2010).
pcSseg-1	5s6p3d1f		J. Chem. Theory Comput. 2015, 11, 132
pcSseg-2	6s8p4d2f1g	Frank Jensen's	J. Chem. Theory Comput. 2015, 11, 132
pcSseg-3	7s10p6d3f2g1h		J. Chem. Theory Comput. 2015, 11, 132

A notação [] indica número de elétrons tratados como caroço nos ECPs. As bases foram retiradas do banco de dados EMSL *Basis Set Exchange*. O esquema de contração das bases não é apresentado.

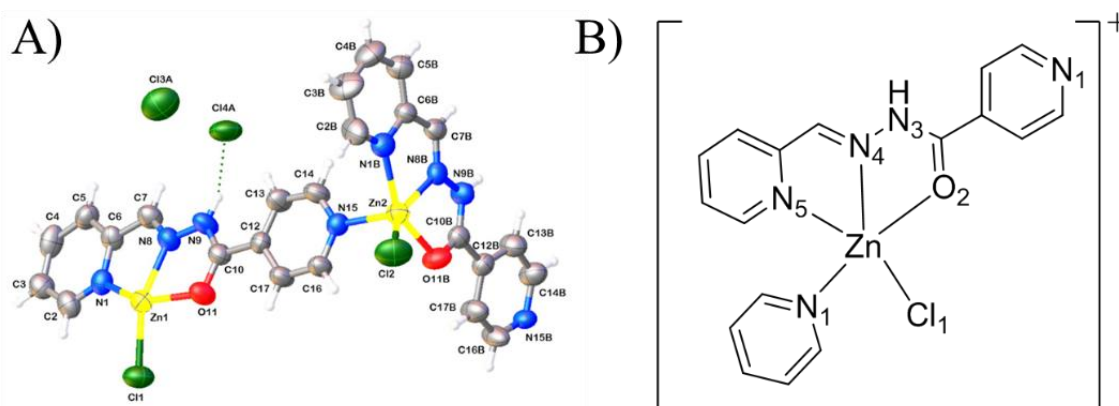
Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultados encontrados são mostrados nas Tabelas 5 e 6 como valores absolutos de diferenças entre dados da estrutura cristalográfica e calculados em nível B3LYP/6-31+G(d,p) em fase gasosa para cada conjunto de base utilizada. Nos cálculos do complexo mostrado na Figura 6B o modelo possui carga líquida +1 e não foi utilizado contra-íon. As Figura 6 e Figura 7 mostram as estruturas dos compostos de coordenação com HCPIH determinados por Li et al. (2016) e Cukierman et al. (2018), respectivamente, com seu modelo mimético utilizado nos cálculos.

A diferença média dos parâmetros estruturais para ambas estruturas indica que qualquer das bases ou ECPs utilizados consegue reproduzir a geometria de ambos complexos de referência com pequena margem de erro, mesmo se considerando a diferença entre fases sólida (experimento) e gasosa (cálculos). Com isso, foi decidido utilizar a função de base e ECP SDD, que além de tratar o caroço do Zn como configuração [Ne] (10 elétrons), traz resultados satisfatórios dentre as bases avaliadas. Além disso, Sousa et al. (2009) realizaram uma análise

de diferentes métodos DFT para avaliar a estrutura de complexos de Zn e concluíram que, dos ECPs avaliados, o SDD seria uma boa escolha em relação às bases *all-electron*, sendo o uso de LANL2DZ de Los Alamos não recomendado (SOUSA et al., 2009).

Figura 6 – **A)** Estrutura cristalográfica determinada por Li et al. (2016) e **B)** representação do complexo de zinco utilizado no cálculo quântico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Diferença absoluta entre os dados estruturais calculados e do complexo descrito por Li et al. (2016). Comprimento de ligação em Å e ângulos em graus.

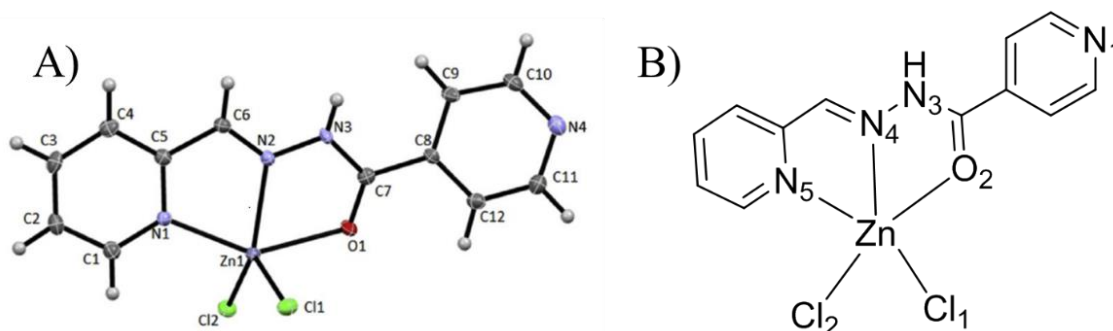
Átomos	LANL2DZ	SDD	DEF2-TZVP	DEF2-TZVPPD
Zn – N5	0,195	0,150	0,154	0,152
Zn – N4	0,188	0,159	0,156	0,156
Zn – Cl1	0,046	0,027	0,012	0,014
Zn – Cl2	0,039	0,023	0,010	0,011
Zn – O2	0,096	0,243	0,198	0,202
N4 – C	0,003	0,002	0,002	0,002
N4 – N3	0,014	0,015	0,015	0,015
N3 – C2	0,027	0,031	0,030	0,030
C2 – O2	0,005	0,011	0,010	0,010
<Média>	0,068	0,073	0,065	0,066
\angle N5 – Zn – N4	5,38	3,55	3,77	3,77
\angle N5 – Zn – O2	8,87	7,04	6,87	6,89
\angle N5 – Zn – Cl1	5,92	5,57	5,77	5,65
\angle N5 – Zn – Cl2	4,68	2,51	2,93	2,85
<Média>	6,21	4,67	4,84	4,79

Fonte: Elaborador pelo autor.

A partir deste ponto foi selecionada uma metodologia para otimização das estruturas e sua caracterização como mínimo da superfície de energia potencial. Os cálculos envolvendo a formação do complexo de zinco com INHHQ, foram realizados com nível B3LYP/6-

31+G(d,p)/SDD, em que o modelo implícito de solvatação empregado foi o SMD (MARENICH; CRAMER; TRUHLAR, 2009).

Figura 7 – **A)** Estrutura cristalográfica determinada por Cukierman et al. (2018) e **B)** representação do complexo de zinco utilizado no cálculo quântico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Diferença absoluta entre os dados estruturais calculados e do complexo descrito por Cukierman et al. (2018). Comprimento de ligação em Å e ângulos em graus.

Átomos	LANL2DZ	SDD	DEF2-TZVP	DEF2-TZVPPD
Zn – N5	0,117	0,053	0,063	0,061
Zn – N4	0,188	0,128	0,135	0,132
Zn – Cl1	0,032	0,023	0,012	0,013
Zn – N1	0,067	0,003	0,010	0,008
Zn – O2	0,128	0,203	0,176	0,177
N4 – C	0,011	0,010	0,011	0,011
N4 – N3	-	-	-	-
N3 – C2	-	-	-	-
C2 – O2	0,031	0,036	0,035	0,035
<Média>	0,082	0,065	0,063	0,062
∠N5 – Zn – N4	4,20	1,96	2,34	2,27
∠N5 – Zn – O2	9,39	6,94	7,04	6,95
∠N5 – Zn – N1	5,06	6,11	5,84	5,87
∠N5 – Zn – Cl1	1,01	3,13	2,44	2,44
<Média>	4,92	4,54	4,42	4,38

Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram feitos cálculos de energia eletrônica em nível MP2/cc-pVTZ/SMD sobre as geometrias otimizadas, em que a base de Dunning foi usada para todos os átomos e é utilizada para recuperar parte da correlação eletrônica e reduzir o efeito de truncamento das funções base. Este nível teórico será indicado como MP2/CBS ao longo do texto.

As estruturas utilizadas para obtenção de parâmetros para dinâmica molecular (capítulo 5) foram otimizadas e caracterizadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD em fase gasosa, em que as cargas ChelpG (BRENEMAN; WIBERG, 1990), derivadas do potencial eletrostático, foram obtidas em mesmo nível. Os casos não abordados por essa metodologia estarão indicados.

Em todos os cálculos foi utilizado o software Gaussian09® revisão D.01 (GAUSSIAN 09, J. FRISCH) com as funções canônicas 5d e 7f. A energia livre de Gibbs (ΔG) apresentada ao longo do trabalho é calculada segundo a (1):

$$\Delta G = \Delta E_{el,sol} + \Delta H_c - T\Delta S \quad (1)$$

Sendo $\Delta E_{el,sol}$ a energia eletrônica calculada em solução aquosa com modelo SMD e $\Delta H_c - T\Delta S$ as correções térmicas calculadas a 1 atm e 298,15 K. A energia de solvatação do íon H^+ (1 mol L^{-1}), quando utilizada, vale $\Delta G_{sol} = -265,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ (CAMAIONI; SCHWERDTFEGGER, 2005).

Uma correção da energia que foi realizada envolve a mudança de estado padrão de 1 atm para 1 mol L^{-1} . Com essa correção, pode ser mostrado (SHIELDS; SEYBOLD, 2009) que a energia $\Delta G^{o \rightarrow *}$ de mudança de estado padrão vale:

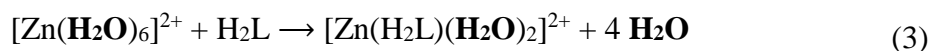
$$\Delta G^{o \rightarrow *} = (\Delta n)RT \ln(24,466) \quad (2)$$

$$\Delta G^{o \rightarrow *} = (\Delta n) * 1,89 \text{ kcal mol}^{-1}$$

em que Δn é a diferença entre o número de mols de produtos e reagentes. Essa correção da energia é, portanto, dependente do número de espécies consideradas numa reação, que pode variar em cada etapa de um mecanismo avaliado.

4 PROPOSTA DE MECANISMO

A reação inicial mais simples de complexação ocorre para o íon livre Eq.3:



Essa reação será melhor discutida no capítulo 7. Nesta condição, o ligante H_2L exerce sua função formando o complexo com zinco e deslocando os íons Zn^{2+} , por exemplo, da fenda sináptica durante a sinapse. Apesar da Ab não estar envolvida nesse processo, o resultado dessa reação é similar, prevenindo biomoléculas de capturarem o excesso de íons disponíveis.

Outra possibilidade de atuação do INHHQ que pode ser considerada envolve a participação da Ab, em que o ligante atuaria ativamente atacando o sítio metálico de zinco no peptídeo, formando um complexo ternário intermediário (BRAYMER et al., 2011) anterior à remoção do metal. Dessa forma, a hipótese considerada neste trabalho como a mais importante baseado nessa proposta envolveria o ataque nucleofílico do ligante INHHQ ao zinco coordenado à Ab. Assim, com a formação da ligação INHHQ-Zn, pode-se pensar em um processo de remoção do metal da estrutura do peptídeo via quelação.

Em relação à Ab, a esfera de coordenação do sítio metálico é descrita pela literatura como bem definida, em que ao menos duas das três histidinas (His6, His13 e His14) estão coordenadas ao zinco, com envolvimento dos aminoácidos O-doadores Asp ou Glu. Na Tabela 7 estão apresentadas algumas estruturas de fragmentos da Ab ligada ao zinco em que a estrutura foi determinada experimentalmente e depositada no banco de dados *Protein Data Bank*. Na Tabela 8 são mostrados alguns dos modos de coordenação do zinco à Ab observados experimentalmente segundo a literatura (dados experimentais não apresentados). Outros trabalhos indicando ou discutindo o modo de coordenação do Zn podem ser encontrados em Rezaei-ghaleh et al. (2011), Migliorini et al. (2012) e Istrate et al. (2016).

Ao que pode ser visto, as histidinas estão presentes na esfera de coordenação do metal com um ligante oxigenado variável (Migliorini et al., 2012), podendo este ser o aminoácido Asp, Glu, um oxigênio de carbonila da cadeia peptídica ou mesmo uma molécula de água (Tabela 8). Das estruturas mostradas na Tabela 7, a de código PDB **1ZE9** foi utilizada como modelo para o desenvolvimento deste projeto. Na Figura 8 é apresentada sua estrutura, em que o peptídeo Ab_{1-16} está coordenado ao Zn^{2+} (ZIRAH et al., 2005) pelos aminoácidos His6, Glu11, His13 e His14. Esse modelo do peptídeo (ZnAb_{1-16}) foi utilizado no trabalho para a construção dos modelos miméticos envolvendo as etapas descritas no capítulo 5 e 9.

Tabela 7 – Estruturas da Ab em que o peptídeo está coordenado ao zinco. Também está indicado a sequência completa da Ab de humanos e ratos para comparação.

Código PDB	Peptídeo	Sequência	Experimento ³	Referência
1ZE9	Zn(Ab ₁₋₁₆)	DAEFR H DSGY EVHH QK	pH 6,5; 278 K	Zirah et al. (2005)
2LI9 ¹	Zn(Ab ₁₋₁₆) ₂	DAEFG H DSGF EVRRH QK	pH 7,1; 278 K	Istrate et al. (2012)
2MGT	Zn(H6R-Ab ₁₋₁₆) ₂	DAEFR R DSGY EVHH QK	pH 6,8; 274 K	Istrate et al. (2016)
5LFY ²	(Zn-D7H-Ab ₁₋₁₀) ₂	DAEFRHH SGY	pH 7,0; 278 K	Polshakov et al. (2017)
Ab ₄₂ (humano)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA			
Ab ₄₂ (rato)	DAEFG H DSGF EVRRH QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA			

¹ Fragmento da Ab de rato. ² Mutação D7H em que cada peptídeo se liga aos dois íons Zn²⁺. ³ F.I. força iônica. Vermelho: aminoácidos ligados ao zinco; Azul: aminoácidos que diferem a Ab humana da de rato.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Alguns dos modos de coordenação propostos na literatura para o íon Zn²⁺ coordenado ao peptídeo Ab. Dados da Tabela 7 também estão incluídos.

Peptídeo	Modo ¹	Aminoácidos ligados ²	Referência
Ab ₁₆	3N	His6, His13, His14, ?	Mekmouche et al. (2005)
Ac-Ab ₁₆	3N1O	His6, Glu11, His13, His14	Zirah et al. (2006)
Ab ₁₆ , Ab ₂₈	4N	NH2 (Asp1), His6, His13, His14	Syme e Viles (2006)
Ab ₄₀	4N	NH2 (Asp1), His6, His13, His14	Danielsson et al. (2006)
Ab ₂₈	4N1O	NH2 (Asp1), His6, Glu11, His13, His14	Gaggelli et al. (2008)
Ab ₁₆ -PEG	4N	NH2 (Asp1), His6, His13, His14	Damante et al. (2009)
Ab	3N1O	His6, His13, His14, (Asp1, Glu11 ou H2O)	Faller e Hureau (2009)
Ab ₁₆	4N	His6(a), His14(a), His6(b), His14(b)	Istrate et al. (2012)
Ab ₄₂	3N1O	His6, Glu11, His13, His14	Pietropaolo et al. (2015)
Ab ₁₆	2N2O	His6, His13 ou His14, Glu11, COO ⁻ _{N-Ter}	Alies et al. (2016)
H6R-Ab ₁₆	2N2O	Glu11(a), His14(a), Glu11(b), His14(b)	Istrate et al. (2016)
D7H-Ab ₁₀	2N2O	Asp1(a), His6(a), Glu3(b), His7(b)	Polshakov et al. (2017)

¹ Número e tipos de átomos diretamente ligados ao zinco. ² (a) e (b) indicam cadeias peptídicas diferentes do dímero.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base no que é observado na esfera de coordenação do metal pelos dados experimentais mostrados acima, a primeira etapa considerada nesse projeto envolve a saída do ligante oxigenado variável da estrutura do complexo Zinco-Ab. Para tanto, foi considerado o **Glu11**, em que uma molécula de água do meio formaria um complexo intermediário, logo após

a saída de **Glu11** e anterior ao ataque nucleofílico do INHHQ. Com a entrada da molécula de água ao sítio de coordenação do metal, a formação da ligação Zn-INHHQ pode ser facilitada, uma vez que a água é um melhor ligante de saída, se comparado ao **Glu11** carregado, e pode promover aumento entrópico após sua liberação. A reação que descreve esse processo é mostrada na Eq. 4:

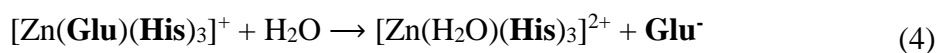
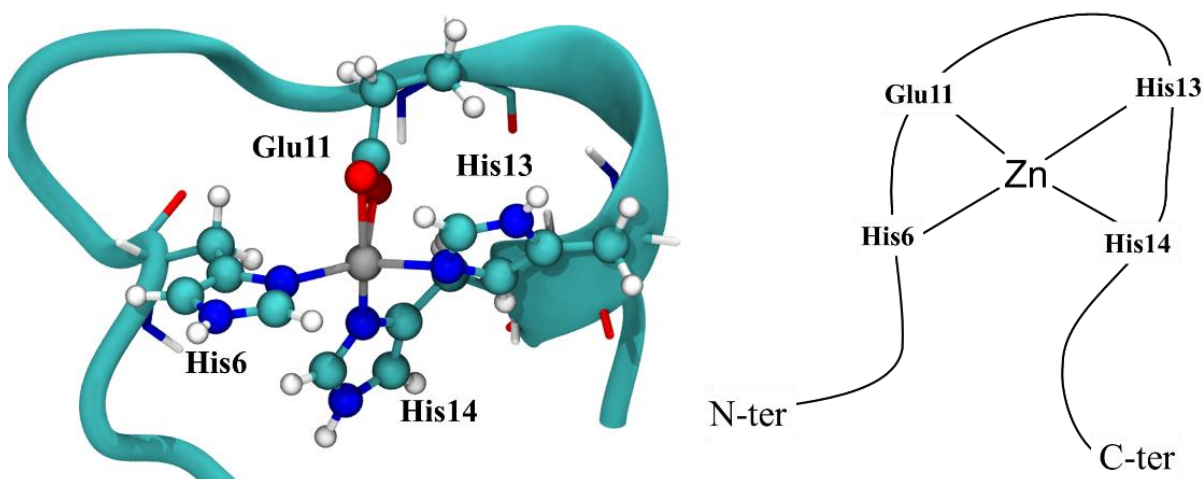


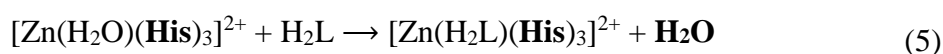
Figura 8 – Representações da estrutura de ZnAb₁₋₁₆ com os aminoácidos coordenados e o Zn em destaque.



* Na estrutura do peptídeo o aminoácido Glu11 aparece coordenado ao zinco com ligação bidentada (comprimento de ligação $\text{Zn-O}_{\text{Glu11}} = 2,10 \text{ \AA}$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

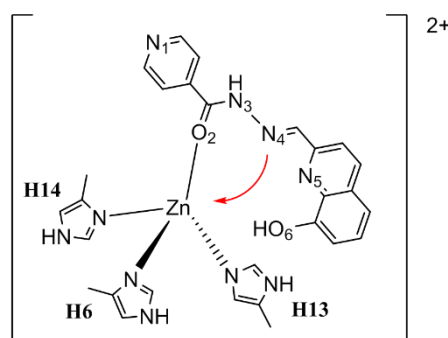
Em seguida, com a formação da espécie $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{His})_3]^{2+}$, o ligante INHHQ (H_2L) se aproxima do sítio de coordenação, promovendo ataque nucleofílico e substituição da molécula de água. Com a entrada do INHHQ, é possível que ocorra um aumento da energia do sistema causado por impedimento estérico, uma vez que se trata de um ligante volumoso e relativamente rígido, principalmente no anel quinolínico. Assim, a reação ocorreria como mostra a Eq. 5 (considerando somente a esfera de coordenação do metal):



Na sequência da reação, uma vez formado o complexo com H_2L coordenado, o efeito quelante tem um papel importante para remoção do metal. Uma ligação bidentada poderia ser

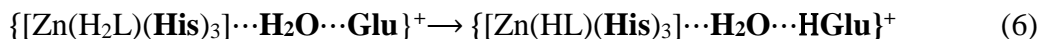
formada pelos átomos O2 e N4 (modo $O^{\wedge}N$) (Figura 9), o que requer expansão da esfera de coordenação do Zn. Nos cálculos envolvendo o modelo mimético com H₂L já coordenado, após a otimização da estrutura, o modo $O^{\wedge}N$ não foi obtido como estrutura de mínimo, e nenhuma estrutura foi encontrada nos cálculos com esse modo de coordenação ainda na presença das três histidinas. Para que essa ligação seja possível uma das histidinas precisaria sair da esfera de coordenação.

Figura 9 – Aproximação de N4 para formação da ligação multidentada.



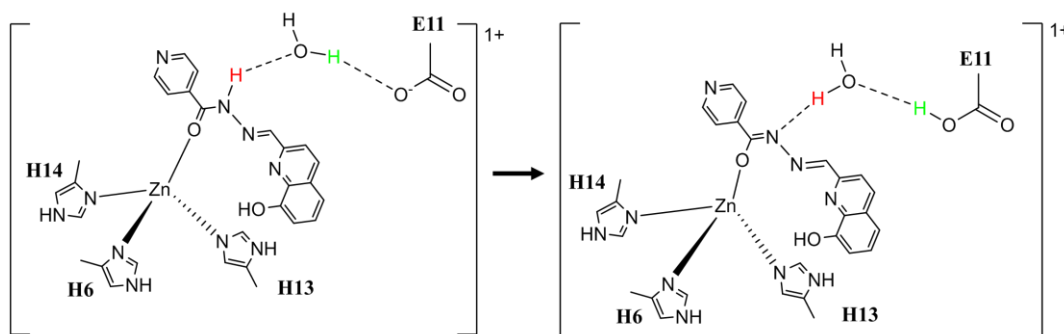
Fonte: Elaborado pelo autor.

A saída de uma histidina pode ser favorecida pela desprotonação do ligante em N3 (NH), o que aumenta a força da ligação Zn-O2 e facilita a aproximação de N4 *trans* à His14. A desprotonação do ligante seria auxiliada pelo **Glu11** do peptídeo, e também por uma molécula de água (Eq. 6), uma vez que a aproximação do **Glu11** ao hidrogênio de N3 poderia ser dificultado por conta da distância entre esses dois grupos. Nesse caso, a representação do modelo mimético é melhor feita considerando a formação de complexos moleculares (indicados pelas chaves { }):



em que ‘ \cdots ’ indica a interação entre as moléculas em um complexo molecular. A energia de transferência do próton foi encontrada $\Delta G = +4,32 \text{ kcal mol}^{-1}$ no modelo mimético. Os valores de energia livre de Gibbs de reação serão melhor discutidos no capítulo 9. Em relação ao uso das espécies como complexos moleculares, ao longo de toda a proposta o **Glu11** foi mantido no sistema, visto ele faz parte da região de coordenação principal do peptídeo (**E₁₁VHH₁₄**) e deve permanecer interagindo na segunda esfera de coordenação do zinco. Como pode ser visto na Figura 10, também foi considerada a presença de uma molécula de água, tendo sido considerada no processo de transferência do próton entre H₂L e **Glu11** (Eq. 6).

Figura 10 – Desprotonação do H2L auxiliada pelo **Glu11** e uma molécula de água.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação ao INHHQ, há também a possibilidade de a ionização ocorrer no oxigênio O6 do grupo quinolínico. Nos derivados da HQ em que o oxigênio fenólico está envolvido na primeira esfera de coordenação ocorre a desprotonação da hidroxila (VAIRA et al., 2004; DERA EVE et al., 2008; RIMOLA et al., 2011; RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2015). Por outro lado, Freitas et al. (2018) mostraram com a estrutura cristalográfica do análogo HQFUH (Figura 4, Introdução) coordenado ao zinco que a ionização do grupo fenólico não ocorre (distância de ligação Zn-O_{qui} = 2,706(6) Å). De modo similar, é de se esperar que o INHHQ também não sofra ionização após sua coordenação, ao menos não na forma complexada [Zn(Cl)₂(INHHQ)] no cristal. Cukierman et al. (2018) observaram um equilíbrio entre duas formas tautoméricas do ligante HPCIH (enamina-cetoamina) no complexo em solução de DMSO-d₆: [Zn(Cl)₂(HPCIH)] → [Zn(Cl)₂(PCIH)]⁻ + H⁺, sendo a forma do ligante desprotonada na posição N3 (NH) predominante. Como mencionado na introdução, os autores concluem reforçando a similaridade nas propriedades entre o HPICH e o INHHQ, e que a presença do grupo fenil pode não ser mandatória na sua atividade. Um outro ponto importante a se observar está nos valores de pK_a do INHHQ, principalmente o que envolve N3 da cadeia alifática: pK_a = 10,94 ± 0,01. Nas duas estruturas cristalográficas já apresentadas, Figura 6 e 7 com HPCIH, e no trabalho de Freitas et al. (2018) com HQFUH, esse grupo aparece protonado.

Ao longo do trabalho foram avaliadas estruturas do complexo de zinco com o INHHQ coordenado via oxigênio fenólico (O6, monodentado) na presença das histidinas. Esse complexo intermediário seria formado logo após a troca **Glu11** pelo INHHQ. Também foi avaliada a forma tautomérica do INHHQ em que o tautômero enol estaria coordenado via oxigênio O2 (como hidroxila). Em ambos os casos o ligante se afasta da esfera de coordenação e não é formado uma ligação química; comprimentos de ligação Zn-O > 2,7 Å. No caso da

ionização no grupo fenólico, a ligação química é observada, mas esse caminho não foi avaliado no estudo.

Segundo os resultados relativos à formação dos complexos $[\text{Zn}(\text{H}_n\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{n+}$ (discutidos no capítulo 7), a participação do oxigênio de H_2L na esfera de coordenação é evidente quando ocorre a primeira ionização do ligante. Por outro lado, o envolvimento dos átomos de nitrogênio N4 e N5 (modo de coordenação $\text{N}^{\wedge}\text{N}$) nos complexos do análogo HPCIH (Figura 6 e 7) também é observada, mas na estrutura cristalográfica. Ainda no modelo mimético em que as histidinas estão ligadas ao zinco, foi avaliado o modo de coordenação $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ considerando o ligante neutro (H_2L). A diferença de energia calculada foi $\Delta G = [G_{(\text{N}^{\wedge}\text{N})} - G_{(\text{O}_2)}] = +14,041 \text{ kcal mol}^{-1}$. A mudança de geometria do complexo também é alterada, em que a geometria tetraédrica formada com o ligante monodentado está bem evidente e está representada pelo valor do índice τ_4 (ADDISON et al., 1984). Valores próximos de $\tau_4 = 1$ indicam uma geometria tetraédrica perfeita, enquanto $\tau_4 = 0$ indica geometria quadrática plana. De modo similar, com a formação da ligação bidentada $\text{N}^{\wedge}\text{N}$, o índice de trigonalidade τ_5 , análogo ao τ_4 , indica para $\tau_5 = 1$ geometria bipirâmide trigonal e $\tau_5 = 0$ uma pirâmide de base quadrada. Com a ligação $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ o caráter de pirâmide de base quadrada fica mais evidenciado, em que os nitrogênios N4 e N5 aparecem mais próximos ao plano do ligante (Figura A.7).

Quando ocorre a ionização $\text{H}_2\text{L} \rightarrow \text{HL} + \text{H}^+$, a coordenação ao metal ocorre com um dos oxigênios (O2 ou O6) e a estrutura se direciona para o modo monodentado, na presença das três histidinas. Como a energia envolvida na transferência do próton é muito menor que a formação da ligação bidentada $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ($+4,32 \text{ kcal mol}^{-1}$ contra $+14,041 \text{ kcal mol}^{-1}$), a formação do complexo molecular $\{[\text{Zn}(\text{HL})(\text{His})_3] \cdots \text{H}_2\text{O} \cdots \text{HGlu}\}^+$ previamente à formação da ligação bidentada parece mais razoável. Com a desprotonação, a ligação Zn-O se torna mais forte levando à aproximação de N4 (Figura 10). Assim, a proposta aqui é de a saída de uma histidina promover a formação da ligação bidentada do INHHQ, mas como modo de coordenação $\text{O}^{\wedge}\text{N}$, após o ataque de N4. Com base na estrutura dos modelos com a ligação monodentada e na estrutura do peptídeo, a saída da His6 parece ser favorecida por conta da mobilidade da região N-terminal e consequente aumento entrópico ao ser liberada (XU; WANG; WANG, 2013). Além disso, a região N-terminal possui os resíduos hidrofílicos do peptídeo, o que aumenta sua solubilidade. A Eq. 7 indica a reação que ocorreria:



Tabela 9 – Parâmetros estruturais do complexo $\{[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})(\text{His})_3]\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots\text{Glu}\}^+$ nos modos monodentado e bidentado ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$). Ângulos usados no cálculo de τ_4 e τ_5 estão sublinhados.

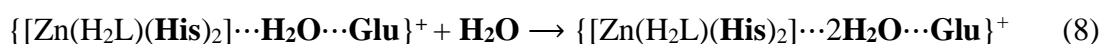
Ligação / Å	Monodentado	Bidentado ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$)
Zn – H6	2,094	2,176
Zn – H13	2,048	2,117
Zn – H14	2,103	2,157
Zn – E11	-	-
Zn – O2	2,152	-
Zn – N3	3,805	-
Zn – N4	3,469	2,335
Zn – N5	4,564	2,430
Zn – O6	4,576	-
Ângulo / graus	Monodentado	Bidentado ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$)
$\angle\text{H6} - \text{Zn} - \text{H13}$	<u>125,42</u>	<u>171,82</u>
$\angle\text{H6} - \text{Zn} - \text{H14}$	101,88	91,22
$\angle\text{H13} - \text{Zn} - \text{H14}$	106,83	96,03
$\angle\text{H6} - \text{Zn} - \text{E11}$	-	-
$\angle\text{H6} - \text{Zn} - \text{O2}$	<u>107,84</u>	-
$\angle\text{Zn} - \text{O2} - \text{C}$	145,24	-
$\angle\text{H14} - \text{Zn} - \text{N4}$	-	<u>148,84</u>
$\angle\text{H14} - \text{Zn} - \text{N5}$	-	<u>140,08</u>
τ_4	0,902	-
τ_5	-	0,383

Fonte: Elaborado pelo autor.

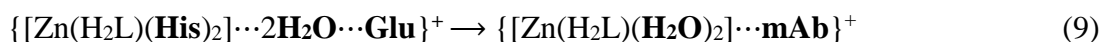
Apesar de ser considerada a participação do próprio **Glu11** na reação com formação de **HGlu11**, os valores reportados de pKa para o peptídeo (Ab_{1-28}) mostram que nenhum dos aminoácidos Glu ou Asp deve permanecer protonado em solução em pH ~7,4 (MA et al., 1999). Logo na sequência o ligante deve retornar ao estado de protonação inicial H_2L restaurando o **Glu11**.

Seguindo o caminho de reação, com base no modelo do peptídeo a saída da segunda histidina poderia ser realizada por uma molécula de água do meio via hidrólise. Nessa etapa, como não parece haver diferenciação entre as duas histidinas (His13 e His14), a proposta de uma saída preferencial a outra foi deixada em aberto. Novato et al. (2017) reportam dados termodinâmicos e cinéticos envolvendo a reação de ataque nucleofílico da His à platina segundo a reação: $[\text{Pt}(\text{open})(\text{Cl})_2] + \text{His}(\delta/\epsilon) \rightarrow [\text{Pt}(\text{open})(\text{Cl})(\text{His}(\delta/\epsilon))] + \text{Cl}^-$, com open = ortofenantrolina. A reação é favorecida para **His(N δ)** (ligação via N δ) com $\Delta G_R = -8,511 \text{ kcal mol}^{-1}$ contra $\Delta G_R = -7,706 \text{ kcal mol}^{-1}$ para **His(N ϵ)**. Apesar de a diferença ser pequena, pode haver alguma preferência por dessa coordenação, por exemplo, impedimento estérico que favoreça His14 à His13. No caso citado, o caminho de reação se direciona à formação do aduto com a ligação Pt-**His** e liberação de um bom ligante abandonador, o íon cloreto. A remoção do

zinco, entretanto, se daria por possível hidrólise, com saída de uma **His** da esfera de coordenação, formando um intermediário $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{His})(\text{H}_2\text{L})]^{2+}$. Como se tratam de aminoácidos estruturalmente adjacentes no peptídeo e já coordenados, a preferência por um ou outro aminoácido ainda não me parece clara. Em termos de exploração do mecanismo, foi decidido considerar o caminho de reação em uma única etapa, com a substituição de ambas histidinas levando então à formação do complexo livre $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{H}_2\text{L})]^{2+}$. Dessa forma, duas últimas etapas foram então definidas: inicialmente foi inserido uma segunda molécula de água ao sistema (Eq. 8):



E então a remoção do metal e formação do complexo seria concluída (Eq. 9):



Sendo **mAb** o modelo mimético remanescente.

5 DINÂMICA MOLECULAR E CONSTRUÇÃO DO SISTEMA

Todas as simulações de dinâmica molecular apresentadas neste trabalho foram realizadas utilizando o software Amber16® (D. A. CASE et al., 2016). Cada sistema que será apresentado foi submetido a uma única etapa de minimização (soluto e solvente) com 5.000 passos utilizando o algoritmo *steepest descent* (ARFKEN; WEBER, 1985) e mais 5.000 passos de *conjugated gradient* (HESTENES; STIEFEL, 1952), a fim de reduzir contato repulsivo entre os átomos minimizando a energia do sistema.

Após a minimização, cada sistema foi aquecido de 9 K a 109 K em uma primeira etapa empregando *ensemble* canônico NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes), seguido de uma etapa de equilíbrio a NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) a 109 K e pressão 1 bar. Em seguida uma nova etapa de aquecimento foi realizada de 109 K a 309 K a NVT, também acompanhada de uma etapa de equilíbrio NPT a 309 K e 1 bar. O termostato de Langevin (UBERUAGA; ANGHEL; VOTER, 2004) foi utilizado em todas as etapas (aquecimento, equilíbrio e produção) com o valor de $\gamma = 1,0 \text{ ps}^{-1}$ (número de colisões por ps) e nas etapas de equilíbrio e produção (NPT) foi empregado o barostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984). Para o cálculo das interações não ligadas (interações de van der Waals e eletrostática) foi definido um raio de corte (*cutoff*) de 10 Å e foi empregado o procedimento *Particle-Mesh Ewald* (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). O algoritmo SHAKE (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) foi utilizado para restringir o movimento de estiramento envolvendo os átomos de hidrogênio, o que permitiu o uso do fator de integração igual a 2 fs. O modelo explícito de solvente utilizado foi o TIP3P (JORGENSEN et al., 1983).

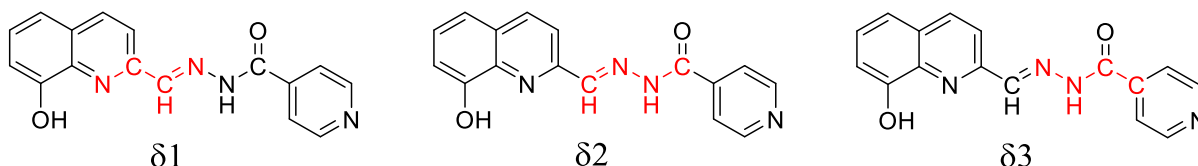
Foram realizadas 5 etapas de produção cada uma de 50 ns (um total de 250 ns de simulação) para cada sistema, cada etapa resultando em uma coleção de 5.000 *frames* (1 *frame* = 10 ps, 25.000 *frames* no total) analisados. Algumas simulações foram realizadas com etapas adicionais de produção e estão indicadas ao longo do texto.

No **APÊNDICE A** estão apresentadas algumas informações contendo os parâmetros usados nas análises realizadas feitas com o pacote CPPTRAJ (ROE; CHEATHAM, 2013) disponível pelo software Amber16. Em todas as análises envolvendo o peptídeo foram desconsiderados os 50 ns iniciais, considerados como parte do equilíbrio do sistema. As imagens das simulações de DM foram produzidas utilizando o *software Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

5.1 SIMULAÇÃO DO LIGANTE INHHQ

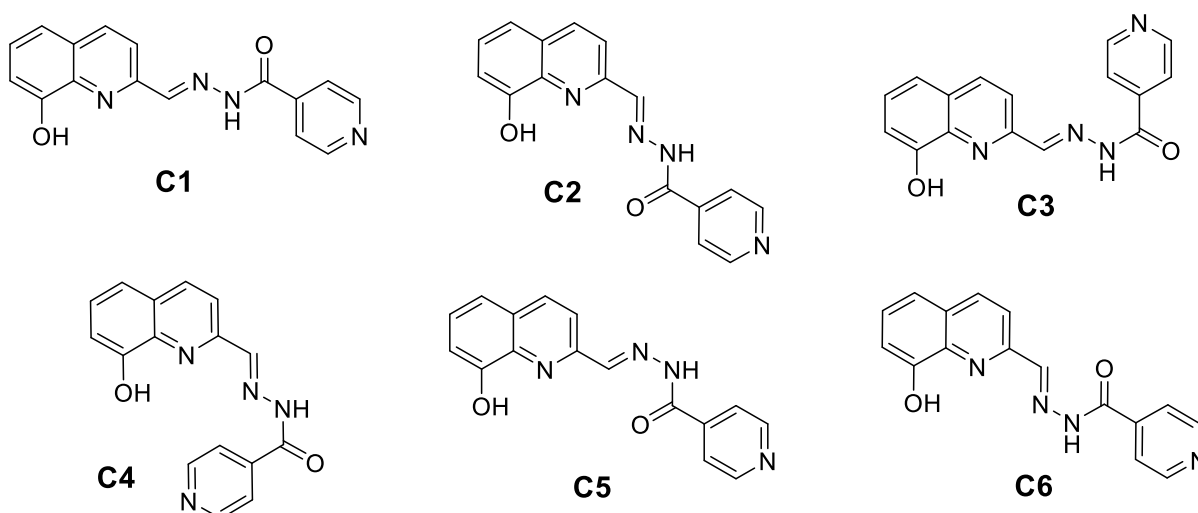
A partir da estrutura do INHHQ é possível construir outras seis conformações considerando três diedros da cadeia alifática da molécula, apresentados na Figura 11 e Figura 12.

Figura 11 – Diedros considerados na construção dos seis confôrmeros (**C1-C6**) do INHHQ.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Confôrmeros construídos a partir da estrutura do INHHQ.



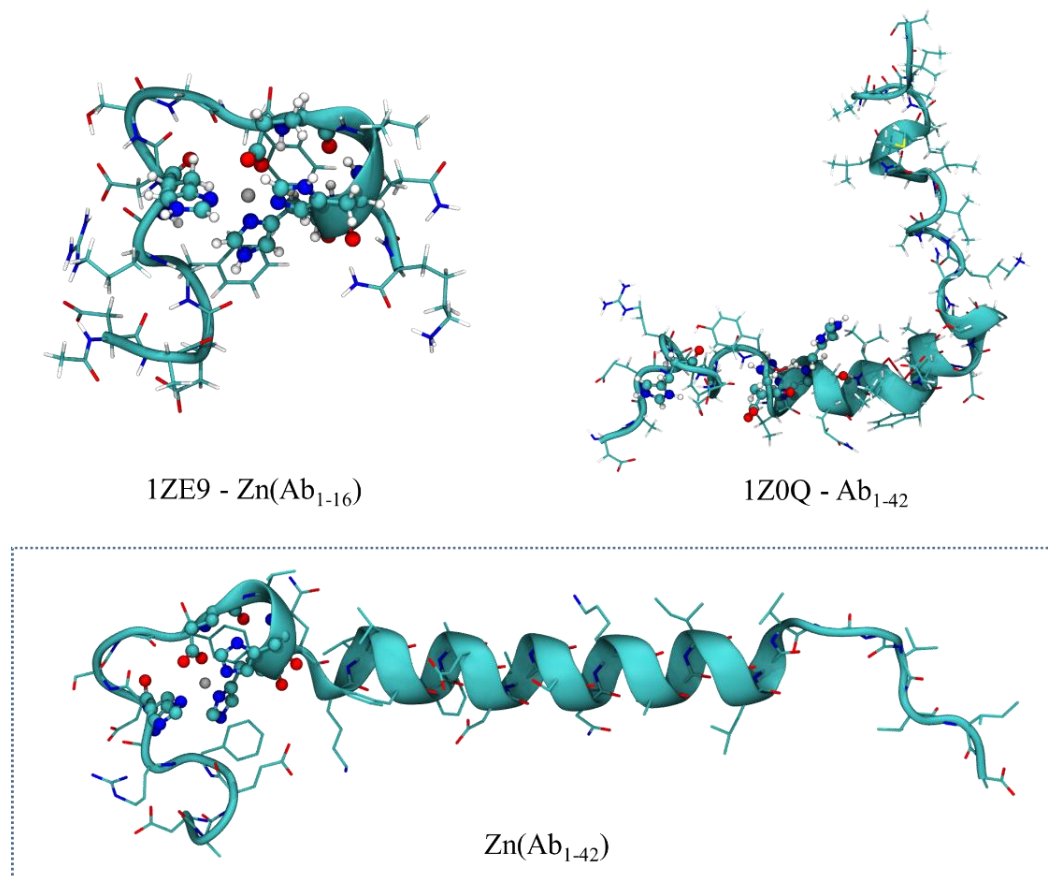
Fonte: Elaborado pelo autor.

A fim de verificar a mobilidade de INHHQ em solvente explícito, foram feitas simulações independentes das seis conformações **C1-C6**. Para a montagem dos seis sistemas, cada espécie teve sua estrutura otimizada e caracterizada com cálculo de frequências harmônicas em nível B3LYP/6-31+G(d,p) em fase gasosa. Foi feito o cálculo para obtenção das cargas ChelpG para cada espécie em mesmo nível de teoria também em fase gasosa, e foi empregado o campo de força GAFF (WANG et al., 2004) para realizar a simulação. Em seguida, foi definido um raio de corte de 15 Å para a inclusão das moléculas de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) em uma caixa cúbica. Ao todo foram incluídas cerca de 1.900 a 2.100 moléculas de água nos sistemas. A simulação do INHHQ foi realizada por 50 ns para cada conformação a fim de verificar as flutuações estruturais de cada espécie.

5.2 CONSTRUÇÃO DO MONÔMERO: SISTEMA MD_00 E MD_01.

A construção do peptídeo Ab₄₀ com metal coordenado aos aminoácidos H6, E11, H13 e H14 foi feita em duas etapas. Primeiramente foi feita a reconstrução do peptídeo Ab₄₂ por meio de modelagem comparativa utilizando o software Modeller (FALGOUT; BLUNDELL, 1993), utilizando como modelos as estruturas de código **1ZE9** e **1Z0Q** depositadas no banco de dados PDB (Figura 13). A modelagem do peptídeo Ab₄₂ foi feita com restrição de estrutura secundária de alfa hélice entre os aminoácidos 17-35, resultando no peptídeo linear mostrado na Figura 10. A estrutura **1ZE9** já apresenta o zinco coordenado aos aminoácidos His6 (Nδ), Glu11 (bidentado), His13 (Nε) e His14 (Nδ), não tendo sido necessário realizar qualquer modificação adicional ao sítio metálico. Em seguida, da estrutura do peptídeo ZnAb₄₂ foram removidos os dois aminoácidos terminais I41 e A42, para se trabalhar com o peptídeo de 40 resíduos, indicado como ZnAb₄₀ ou ZnAb ao longo do trabalho. Também será usada a notação ZnAb₁₋₄₀ para citar segmentos específicos do peptídeo (por exemplo ZnAb₁₋₁₆).

Figura 13 – Estrutura dos peptídeos ZnAb₁₋₁₆ (**1ZE9**) e Ab₄₂ (**1Z0Q**) utilizados na modelagem do peptídeo ZnAb₁₋₄₂.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez construído o peptídeo, foi feita a parametrização do sítio metálico. A parametrização consiste em determinar as constantes de força e valores de equilíbrio que satisfaçam o potencial clássico apresentado na Eq. 10 (D. A. CASE et al., 2016). Esse conjunto de parâmetros é chamado campo de força e é usado para descrever o sistema na simulação de dinâmica molecular. Para biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e moléculas orgânicas, alguns campos de força são descritos na literatura e empregados em diferentes *softwares* de simulação (WANG et al., 2004; CINO; CHOY; KARTTUNEN, 2012; SOMAVARAPU; KEPP, 2015).

$$\begin{aligned} E_{\text{total}} = & \sum_{\text{ligação}} k_b (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\ & + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \end{aligned} \quad (10)$$

Do potencial clássico acima, são chamados parâmetros ligados aqueles usados para definir as ligações, k_b , os ângulos de ligação, k_θ , e os diedros, V_n , além de seus valores de equilíbrio r_{eq} , θ_{eq} e ϕ . Dos parâmetros não ligados, A_{ij} e B_{ij} , parâmetros de van der Waals, são dados por $A_{ij} = 4\epsilon\sigma_{ij}^{12}$, $B_{ij} = 4\epsilon\sigma_{ij}^6$, sendo ϵ_{ij} a energia no fundo do poço de potencial e σ_{ij} a distância em que a energia potencial vale zero, dados para cada par de átomos i e j . As cargas atômicas são representadas por q_i e q_j .

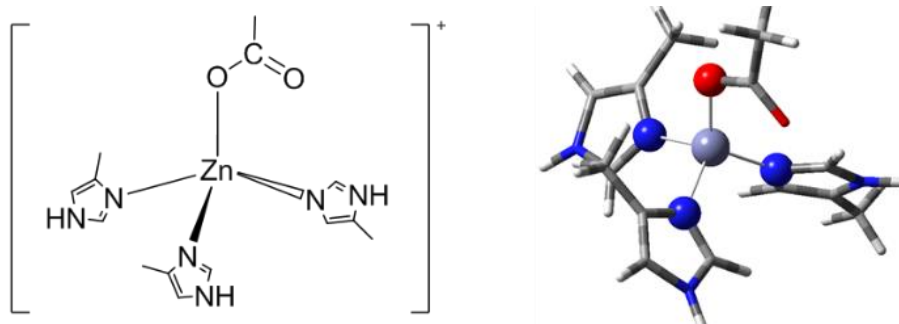
Para a obtenção dos parâmetros ligados k_b e k_θ , foi construído um modelo mimético apresentado na Figura 14. Esse modelo foi obtido a partir da estrutura **1ZE9**, em que o grupo lateral dos aminoácidos His6, Glu11, His13 e His14 foi truncado, e a cadeia peptídica e demais aminoácidos foram removidos. Assim, os aminoácidos His estão representados pelo grupo 4-metilimidazol e o Glu é representado pelo acetato (**Ac**). Esse modelo com o íon Zn^{2+} e acetato possui carga líquida total +1, não tendo sido utilizado um contra íon nos cálculos realizados.

Na estrutura de **1ZE9** o aminoácido His13 difere de His6 e His14 pelo seu modo de coordenação, que ocorre via $\text{N}\epsilon$, o que foi mantido também no modelo mimético. Nas tabelas de constante de força mostradas abaixo, a nomenclatura H6, H13, E11 e H14 foi usada para indicar os aminoácidos coordenados ao metal.

O modelo mimético da Figura 14, representado por $[\text{Zn}(\text{Ac})(\text{His})_3]^+$, **Ac** = acetato, teve sua estrutura otimizada e caracterizada como mínimo na superfície de energia potencial com cálculo de frequência realizados em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD em fase gasosa. Também

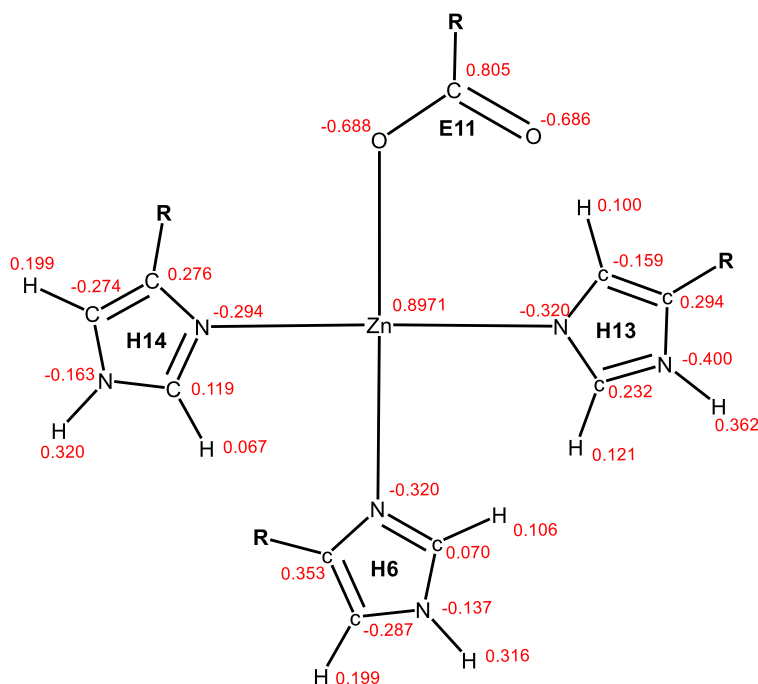
foi feito um cálculo em mesmo nível para obtenção das cargas atômicas ChelpG em fase gasosa (Figura 15).

Figura 14 – Representação do modelo mimético utilizado para obtenção dos parâmetros para montagem do sítio metálico no peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos e ao zinco. Os substituintes **R** indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada em relação ao campo de força usado para o peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Da estrutura original do peptídeo Ab₁₋₁₆ (**1ZE9**) o aminoácido Glu11 aparece coordenado ao zinco em modo bidentado (distância Zn-O_{Glu11} = 2,10 Å para ambos oxigênios). No modelo mimético o **Ac** (representando o Glu11) adota modo de coordenação monodentado após a

otimização da estrutura ($\text{Zn-O}_{\text{ligado}} = 1,96 \text{ \AA}$ e $\text{Zn-O}_{\text{n\~{a}o ligado}} = 2,65 \text{ \AA}$). Esse modelo com ligação monodentada foi usado em todas as simulações envolvendo o Glu11 coordenado ao zinco no peptídeo.

Para obter as constantes de força ligadas, k_b e k_θ , foi utilizado o software VFFDT (ZHENG et al., 2016). Esse software faz uso do método descrito por J. M. Seminario (SEMINARIO, 1996), em que a matriz Hessiana, obtida no cálculo de frequências harmônicas, é operada e então as constantes de força são derivadas. Os parâmetros não ligados ϵ e σ , e massa e polarizabilidade do zinco foram obtidos do campo de força FF14SB (MAIER et al., 2015), disponível no *software* Amber16. A Tabela 10 apresenta os valores de equilíbrio e constantes de força utilizadas para descrever o sítio metálico no peptídeo. Para todos os sistemas que apresentam o sítio metálico conservado (em que os quatro aminoácidos estão coordenados ao metal), foram utilizados os mesmos parâmetros apresentados aqui. Uma vez obtidos esses parâmetros, foi feito o preparo de dois sistemas independentes para simulação: Ab_{40} (**md_00**) e ZnAb_{40} (**md_01**). Ambos modelos consistem na mesma estrutura inicial do peptídeo, em que em Ab_{40} o zinco foi removido do sistema e o peptídeo foi simulado livremente. O campo de força usado para descrever o peptídeo em ambos os casos foi o FF14SB, em que os parâmetros referentes ao sítio metálico foram inseridos na simulação de ZnAb_{40} . Em pH fisiológico o peptídeo livre apresenta carga líquida -3, tendo sido neutralizado com três íons Na^+ em ambos os sistemas. No sistema com o zinco também foram adicionados dois íons Cl^- , garantindo neutralidade de carga total. Em seguida, foi definido um raio de corte de 12 \AA a partir do peptídeo para inclusão das moléculas de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) em uma caixa octaédrica truncada. Ao todo foram incluídas cerca de 10.400 moléculas de água no modelo **md_00** e 10.500 moléculas no modelo **md_01**.

Tabela 10 – Parâmetros inseridos no campo de força do metal. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $\text{kcal mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$ e $\text{kcal mol}^{-1}\text{rad}^{-2}$, respectivamente, com ligações em \AA e ângulos em graus.

Átomos	k_b	Ligação		
Zn-E11	86,46	1,9605		
Zn-H6	58,15	2,0642		
Zn-H13	64,24	2,0487		
Zn-H14	51,57	2,0848		
Átomos	k_θ	Ângulo		
H6-Zn-E11	39,36	111,20		
H6-Zn-H13	26,06	109,38		
H6-Zn-H14	33,47	104,58		
E11-Zn-H13	41,68	121,76		
E11-Zn-H14	48,11	104,42		
H13-Zn-H14	28,42	103,72		
Zn-E11-C	69,37	106,57		
E11-C-O	110,89	121,70		
E11-C-CH2	115,89	116,28		
Zn-H6-C $_\gamma$ (His)	52,05	126,77		
Zn-H6-C $_\epsilon$ (His)	53,04	124,72		
Zn-H13-C $_\epsilon$ (His)	45,51	124,10		
Zn-H13-C $_\delta$ (His)	49,23	129,08		
Zn-H14-C $_\gamma$ (His)	55,84	126,75		
Zn-H14-C $_\epsilon$ (His)	52,12	125,90		
Átomos	V_n	Diedro ¹		
Zn-E11-C-C $_\gamma$	10,00	180,00		
Zn-E11-C-O	10,00	0,00		
Átomo	ϵ	σ	Massa	Polarizabilidade
Zn	1,1000	0,0125	65,40	-
N	1,8240	0,1700	14,01	0,530
O	1,6612	0,2100	16,00	0,434

¹ O ângulo diedro corresponde ao valor de máximo no potencial do parâmetro. Um ângulo definido em 180° indica que o diedro tem ângulo real de 0°.

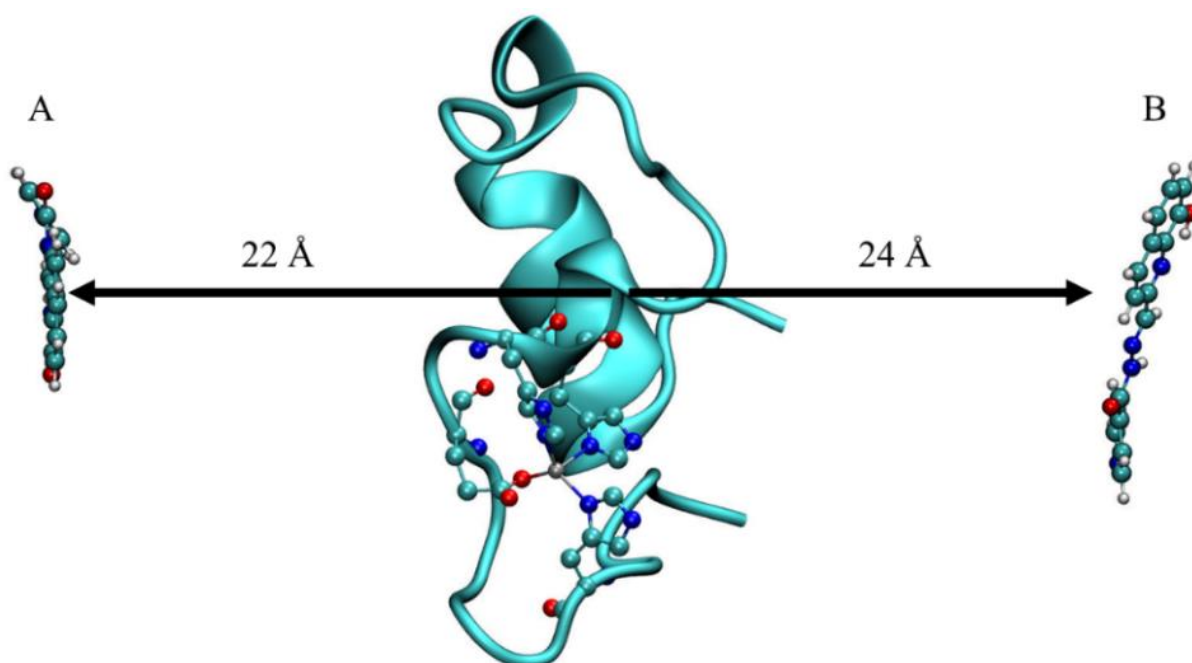
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 INCLUSÃO DO LIGANTE: SISTEMA MD_02 E MD_03.

A fim de avaliar as interações entre INHHQ (H₂L) e o peptídeo ZnAb₄₀, foram construídos dois modelos com estequiometria 1:1 (**md_02**) e 1:2 (**md_03**) metal/ligante, estudados em simulações independentes. Das conformações do INHHQ estudadas, **C1** foi utilizada nas simulações envolvendo o peptídeo, por ser a espécie termodinamicamente mais estável (capítulo 6). O ligante foi inicialmente posicionado a cerca de 22 \AA do centroide do peptídeo ZnAb₄₀ (Figura 16). De modo similar, foi feito a inclusão da segunda molécula a cerca

de 24 Å do peptídeo, em região oposta ao primeiro ligante, como representado na Figura 16. A estrutura de ZnAb₄₀ utilizada nessa montagem foi obtida ao final da simulação do monômero **md_01**, e por isso já se encontra compactado se comparado aos peptídeos em **md_01**. Considerando que o *cutoff*, usado para o cálculo das interações não covalentes, foi definido em 10 Å para ambos os modelos, **md_02** e **md_03**, o ligante H₂L não ‘enxerga’ o peptídeo no início da simulação. Assim, não há uma interação preferencial que orientasse o(s) ligante(s) na simulação.

Figura 16 – Orientação do INHHQ em relação ao peptídeo. **A)** Posição do ligante no modelo 1:1 (**md_02**); **B)** Posição do segundo ligante no modelo 1:2 (**md_03**). Aminoácidos da esfera de coordenação e o metal estão indicados na estrutura do peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

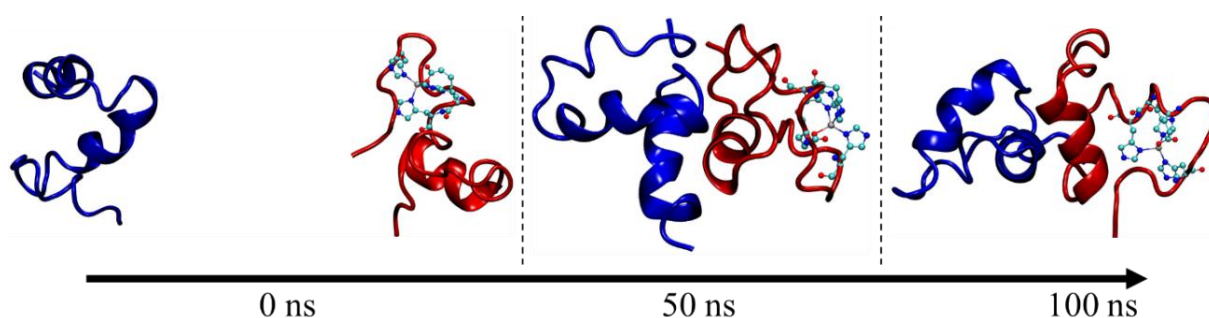
O ligante INHHQ foi tratado com campo de força GAFF e as cargas ChelpG foram as mesmas utilizadas para **C1** no tópico **5.1**. Ambos os modelos foram incluídos numa caixa octaédrica truncada com um raio de corte de 15 Å para inclusão do solvente, levando a um total de 7.800 e 13.500 moléculas de água em **md_02** e **md_03**, respectivamente.

5.4 CONSTRUÇÃO DO DÍMERO: SISTEMA MD_01.

A construção do dímero (**MD_01**) foi feita usando as estruturas finais das simulações dos monômeros **md_00** (Ab₄₀) e **md_01** (ZnAb₄₀), com ambos peptídeos posicionadas lado a lado. Com base na proposta apresentada por Istrate et al. (2016), a formação das placas induzidas pelo zinco ocorreria via dimerização (nucleação), com o zinco ligado aos dois peptídeos, e então propagação, com aumento do oligômero e formação do agregado. Nesse projeto a construção do dímero não ligado corresponde à etapa anterior à ligação do zinco aos peptídeos dois (Ab-Zn-Ab). Dessa forma, avaliar a intervenção do MPAC nessa etapa parece ter significado na prevenção da formação/propagação dos agregados, antes de sua formação.

A orientação inicial de ZnAb₄₀ e Ab₄₀ foi feita considerando uma distância de ~45 Å entre centroides, de modo que a formação do dímero fosse possível em um curto tempo de simulação e não ficasse enviesado (similar ao que foi descrito no tópico 5.2 para H₂L com **md_02** e **md_03**). Para reduzir o custo computacional nessa etapa, foi feita uma simulação inicial de 100 ns, utilizando o modelo implícito de solvatação *Generalized Born* (HAWKINS; CRAMER; TRUHLAR, 1995; HAWKINS; CRAMER; TRUHLAR, 1996). O sistema foi neutralizado com 6 íons Na⁺ (três íons para cada peptídeo) e 2 íons Cl⁻, para balancear a carga do zinco. Foi definida a temperatura em 309 K, usando o termostato de Langevin e $\gamma = 1,0 \text{ ps}^{-1}$, também definindo o algoritmo SHAKE, o que permitiu o uso do fator de integração de 2 fs. São apresentados na Figura 17 três instantes da trajetória obtida até a formação do dímero.

Figura 17 – Representações dos peptídeos formando o dímero na simulação em solvente implícito. O sítio metálico de ZnAb₄₀ está indicado no peptídeo de vermelho.



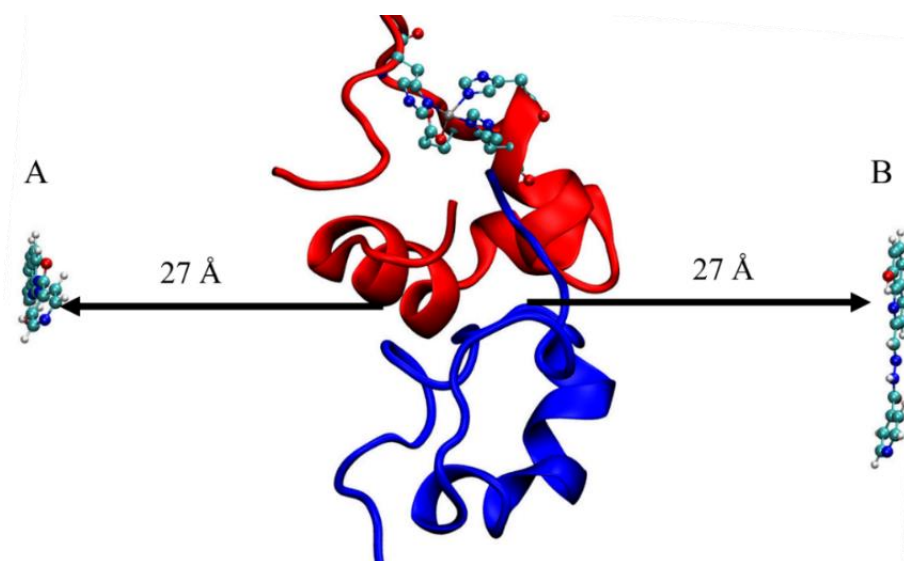
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final dessa simulação, foi realizada a simulação com solvente explícito. O procedimento de minimização, aquecimento e produção segue o protocolo descrito no início deste capítulo. Foi definido um raio de corte de 17 Å para inclusão das moléculas de água em uma caixa de formato octaédrico truncado, totalizando cerca de 10.300 moléculas.

5.5 INCLUSÃO DO LIGANTE: SISTEMAS MD_02 E MD_03.

Ao final de 250 ns de simulação do dímero apresentado anteriormente, foi feita a inclusão de uma e duas moléculas do INHHQ em duas simulações independentes, **MD_02** e **MD_03** respectivamente. Cada ligante foi inserido a cerca de 27 Å do centroide do dímero (Figura 18) (a distância definida segue a mesma consideração já descrita anteriormente). Ambos os sistemas foram neutralizados (6 íons Na⁺ e 2 íons Cl⁻) e foi definido um raio de 17 Å para inclusão das moléculas de água em uma caixa de formato octaédrico truncado. Ao todo foram incluídas cerca de 11.300 e 15.550 moléculas de água para os sistemas com uma e duas moléculas do INHHQ, respectivamente. O ligante INHHQ foi tratado com campo de força GAFF e cargas ChelpG calculadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p) em fase gasosa.

Figura 18 – Modelos construídos para observar a interação dímero-ligante. **A)** Posição de um ligante no sistema **MD_02**. **B)** Posição do segundo ligante em **MD_03**. O sítio metálico de ZnAb₄₀ está indicado no peptídeo em vermelho.

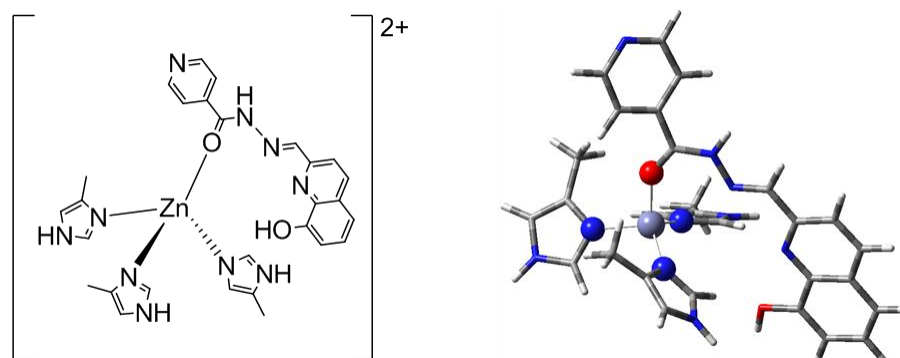


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 INHHQ COORDENADO AO ZN: SISTEMA MD_04.

Para a construção do sistema com o INHHQ coordenado ao zinco com modo monodentado (**MD_04**), foi utilizado o modelo mimético apresentado na Figura 19. Esse modelo foi discutido no capítulo de Proposta de Mecanismo e representa o aduto formado após o ataque nucleofílico do INHHQ ao zinco. Nesta etapa e nas próximas envolvendo o INHHQ coordenado foi utilizada a estrutura dímero do peptídeo.

Figura 19 – Modelo mimético utilizado para representar o sítio metálico após a coordenação do ligante INHHQ via O2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 – Parâmetros inseridos no campo de força do metal. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $\text{kcal mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$ e $\text{kcal mol}^{-1}\text{rad}^{-2}$, respectivamente, com ligações em \AA e ângulos em graus.

Átomos	k_b	Ligação		
Zn-O2	41,11	2,0231		
Zn-H6	78,27	2,0157		
Zn-H13	82,67	2,0054		
Zn-H14	62,63	2,0548		
Átomos	k_θ	Ângulo		
H6-Zn-O2	26,54	108,40		
H6-Zn-H13	34,20	118,90		
H6-Zn-H14	34,49	108,65		
O2-Zn-H13	23,91	111,96		
O2-Zn-H14	33,36	101,87		
H13-Zn-H14	28,37	105,62		
Zn-O2-C	28,02	143,32		
Zn-H6-C $_\gamma$ (His)	62,31	128,20		
Zn-H6-C $_\epsilon$ (His)	60,08	124,42		
Zn-H13-C $_\epsilon$ (His)	48,74	127,91		
Zn-H13-C $_\delta$ (His)	51,47	125,30		
Zn-H14-C $_\gamma$ (His)	60,79	130,01		
Zn-H14-C $_\epsilon$ (His)	59,51	122,93		
	V_n	Diedro*		
Zn-O-C-N	10,00	180,00		
Zn-O-C-C	10,00	0,00		
Átomo	ϵ	σ	Massa	Polarizabilidade
Zn	1,1000	0,0125	65,40	-
N	1,8240	0,1700	14,01	0,530

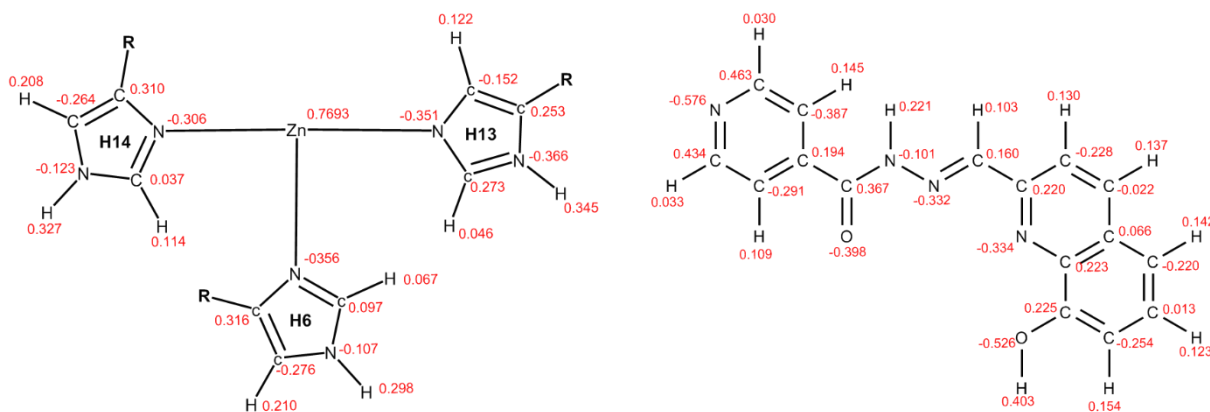
*O ângulo diedro corresponde ao valor de máximo no potencial do parâmetro. Um valor definido em 180° indica que o diedro tem ângulo de 0° .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como descrito anteriormente, a parametrização consiste em obter as constantes de força de ligação assim como os valores de equilíbrio para calcular o potencial clássico (Eq. 10). A estrutura do modelo foi otimizada e caracterizada com cálculo de frequências harmônicas em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD em fase gasosa. A partir do cálculo de frequências harmônicas foram obtidas as constantes de força de ligação e de ângulo de ligação com auxílio do software VFFDT. Essas constantes estão apresentadas na Tabela 11 juntamente com seus valores de equilíbrio. Na Figura 20 são apresentadas as cargas atômicas ChelpG calculadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD também em fase gasosa.

A construção do sistema foi então realizada empregando o campo de força FF14SB para descrever o peptídeo, o campo de força GAFF para o INHHQ e os parâmetros obtidos para o sítio metálico foram inseridos posteriormente. O sistema foi neutralizado (6 íons Na^+ e 2 íons Cl^-) e foi definido um raio de corte de 17 Å para a inclusão das moléculas de solvente em uma caixa octaédrica truncada. Ao todo foram inseridas cerca de 11.000 moléculas de solvente.

Figura 20 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos, ao INHHQ e Zn. Os substituintes **R** indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada em relação ao campo de força FF14SB.



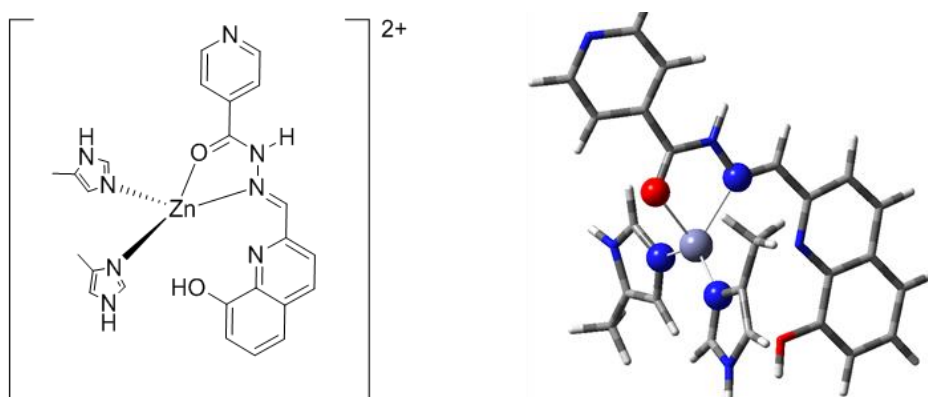
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 INHHQ COORDENADO AO ZN: SISTEMA MD_05.

Para a construção do modelo com o ligante coordenado como quelante (**MD_05**) foi usado o modelo mimético apresentado na Figura 21, com a estrutura obtida ao final da simulação da etapa anterior, **MD_04**.

Neste ponto vale destacar um aspecto negativo em relação ao *software* VFFDT. O cálculo das constantes de força envolvendo os átomos A-B (ou A-B-C) ligados, segundo o método desenvolvido por J. M. Seminario, requer que a matriz Hessiana apresente todos os termos positivos envolvendo esses átomos. Entretanto, problemas na derivação das constantes de força podem surgir se for encontrado um valor negativo (um termo imaginário) na Hessiana e que envolva qualquer dos átomos A, B ou C. Desse modo, o *software* não fornece o resultado e é preciso lidar com o problema de outra forma. Assim, exclusivamente para este sistema foi utilizado o modelo mimético com estrutura otimizada e geometria caracterizada em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD em solvente implícito descrito pelo SMD. Com a inclusão do solvente implícito já foi possível evitar o contratempo encontrado inicialmente. As cargas atômicas, contudo, foram calculadas em fase gasosa como nos demais modelos em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD.

Figura 21 – Modelo mimético usado para o cálculo de constantes de força e cargas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

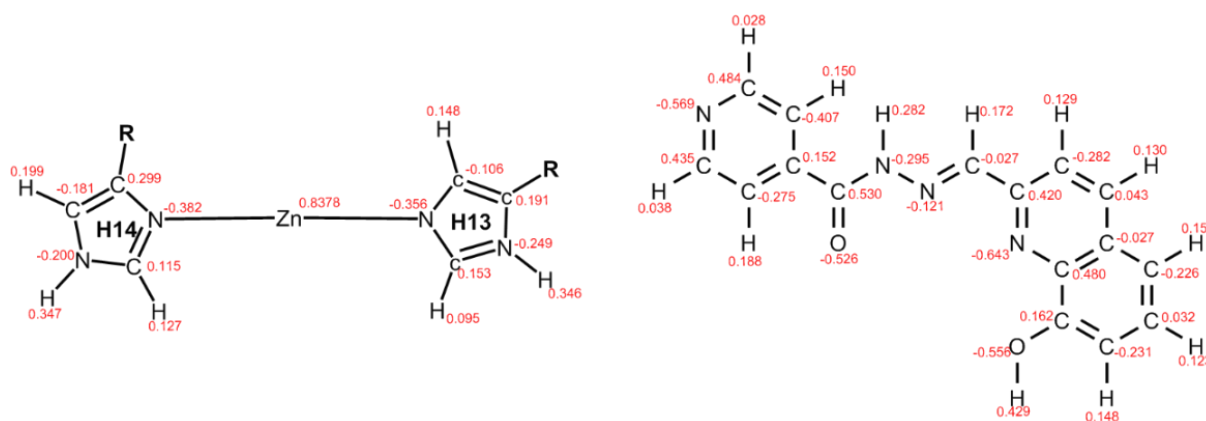
Como explicado na Proposta de Mecanismo, o ligante se apresenta na forma neutra com o zinco coordenado a duas histidinas (His13 e His14). As constantes de força usadas para o sítio metálico estão apresentadas na Tabela 12 e as cargas atômicas na Figura 22. Os peptídeos foram descritos usando o campo de força FF14SB, o INHHQ com o campo de força GAFF e os parâmetros envolvendo o sítio metálico foram inseridos posteriormente. O sistema foi neutralizado (6 íons Na^+ e 2 íons Cl^-) e foi definido um raio de corte de 17 Å para a inclusão das moléculas de solvente em uma caixa octaédrica truncada. Ao todo foram inseridas cerca de 11.200 moléculas de solvente.

Tabela 12 – Parâmetros inseridos no campo de força do Zn. Constantes k_b , k_θ e V_n são dadas em kcal mol⁻¹Å⁻² e kcal mol⁻¹rad⁻², respectivamente, com ligações em Å e ângulos em graus.

Átomos	k_b	Ligação		
Zn-O2	32,41	2,137		
Zn-N4	37,52	2,254		
Zn-H14	70,68	2,039		
Zn-H13	98,49	2,033		
Átomos	k_θ	Ângulo		
H14-ZN-O2	32,03	109,49		
H14-ZN-N4	45,76	120,58		
H14-ZN-H13	51,72	126,84		
O2-ZN-N4	54,00	75,13		
O2-ZN-H13	36,27	104,72		
N4-ZN-H13	50,50	106,65		
ZN-O2-C	62,78	115,93		
ZN-N4-N	34,98	108,17		
ZN-N4-C	34,67	135,98		
ZN-H14-CG	93,86	129,14		
ZN-H14-CE	86,49	123,45		
ZN-H13-CE	92,97	124,84		
ZN-H13-CD	99,23	128,36		
	V_n	Diedro*		
Zn-O2-C-CA	10,00	0		
ZN-N4-N3-C	10,00	180,00		
ZN-N4-C-H	10,00	0		
ZN-N4-C-H	10,00	0		
ZN-N4-C-CA	10,00	180		
	ϵ	σ	Massa	Polarizabilidade
Zn	1,1000	0,0125	65,40	-
N	1,8240	0,1700	14,01	0,530

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Cargas ChelpG atribuídas aos átomos dos aminoácidos His13 e His14, ao INHHQ e ao Zn. Os substituintes **R** indicam a parte nos aminoácidos que não foi modificada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

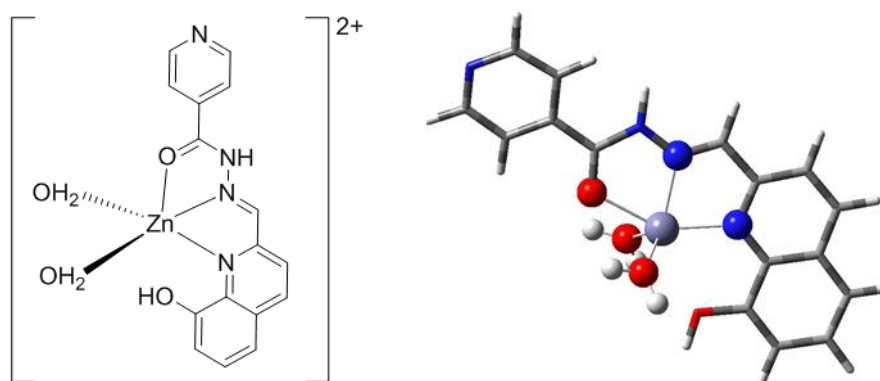
5.8 COMPLEXO LIVRE $[Zn(H_2L)(H_2O)_2]^{2+}$: SISTEMA MD_06.

O sistema com o complexo livre $[Zn(H_2L)(H_2O)_2]^{2+}$ foi construído a partir da última estrutura obtida na simulação anterior **MD_05**. Nesta etapa o campo de força definido para o complexo não envolve o peptídeo e sua estrutura é mostrada na Figura 23. A Tabela 13 apresenta todas as constantes de força utilizadas para parametrizar o sítio metálico, agora com duas moléculas de água coordenadas. A fim de simplificar a definição das constantes de força, foram usados valores médios ($\langle \rangle$) para as moléculas de água e átomos similares na estrutura do complexo. Apesar de ser possível ocorrer troca das águas com solvente, as ligações Zn-OH₂ foram definidas explicitamente.

Vale ressaltar que, embora tenha sido observado maior propensão à formação de um complexo de zinco tetracoordenado nos cálculos quânticos, a topologia definida inclui três ligações entre zinco-INHHQ. Algumas constantes de força obtidas para o complexo foram derivadas do campo de força GAFF e estão indicadas na Tabela 13, enquanto os peptídeos foram descritos usando o campo de força FF14SB.

O sistema foi neutralizado (6 íons Na⁺ e 2 íons Cl⁻) e foi definido um raio de corte de 17 Å para a inclusão das moléculas de solvente em uma caixa octaédrica truncada. Ao todo foram inseridas cerca de 9.400 moléculas de solvente.

Figura 23 – Complexo livre $[Zn(H_2L)(H_2O)_2]^{2+}$ usado na simulação.



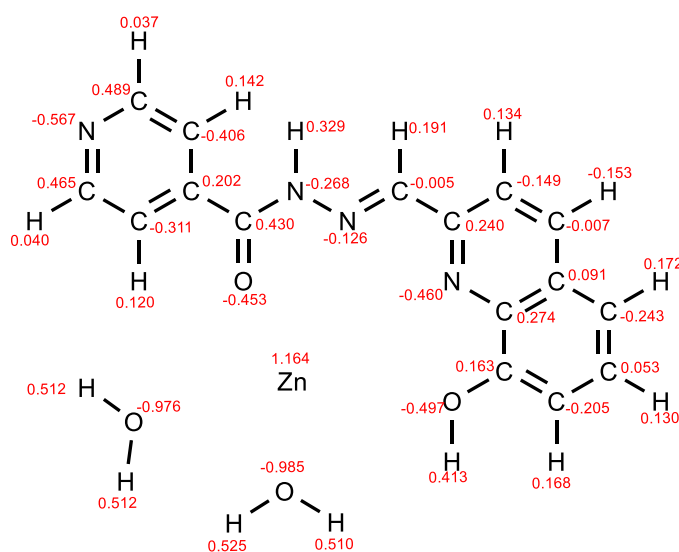
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13 – Parâmetros obtidos para o complexo. Constantes de força k_b , k_θ e V_n são dados em $\text{kcal mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$ e $\text{kcal mol}^{-1}\text{rad}^{-2}$, respectivamente, com ligações em \AA e ângulos em graus.

Átomos	k_b	Ligação		
Zn-O2	8,46	2,234		
Zn-N4	43,86	2,123		
Zn-N5	43,68	2,101		
<Zn-H ₂ O>	57,84	2,051		
Átomos	k_θ	Ângulo		
O2-Zn-N4	13,41	72,02		
O2-Zn-N5	28,12	149,26		
<Zn-H ₂ O>	34,87	82,31		
N4-Zn-N5	11,28	77,25		
<N4-Zn-H ₂ O>	24,78	115,05		
<N5-Zn-H ₂ O>	31,31	111,39		
H ₂ O- Zn - H ₂ O	17,34	119,13		
Zn-O2-C	31,27	116,28		
Zn-N4-N3	37,90	117,71		
Zn-N4-C	38,59	116,06		
<ZN-N5-C>	48,01	120,31		
<Zn-O-H> _{H₂O}	39,10	123,90		
	V_n	Diedro		
Zn-N5-C -C	4,80	180,00	GAFF	
Zn-N5-C -C	4,80	180,00	GAFF	
Zn-N4-C -H	4,15	180,00	GAFF	
Zn-N4-N3-C	4,15	180,00	GAFF	
Zn-N4-N3-H	0,40	0,00	GAFF	
	ϵ	σ	Massa	Polarizabilidade
Zn	1,1000	0,0125	65,4	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Cargas atômicas ChelpG atribuídas aos átomos do INHHQ, H₂O e ao Zn.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 ESTUDO DO LIGANTE INHHQ

Como descrito no tópico **5.1**, podem-se obter seis conformações do INHHQ considerando os diedros δ_1 , δ_2 e δ_3 da cadeia alifática (Figura 11). Foi avaliada a estabilidade relativa das espécies a partir do ΔG em relação à conformação **C1**, termodinamicamente mais estável (FREITAS et al., 2013). Também foi realizado o cálculo para obtenção da energia de solvatação das espécies em água, usando o modelo implícito SMD.

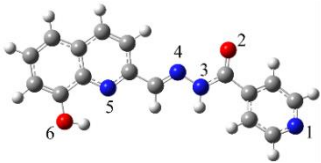
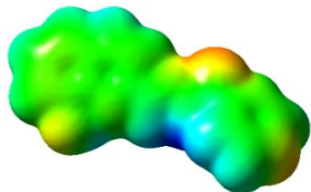
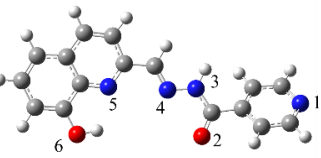
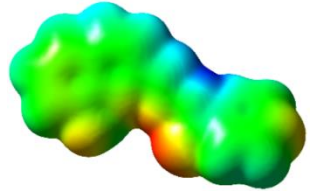
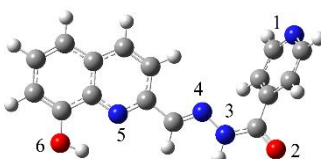
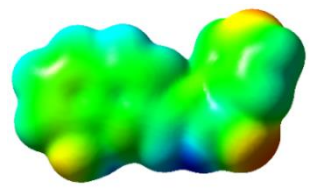
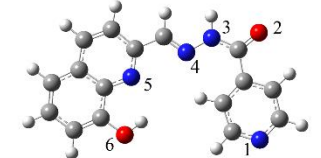
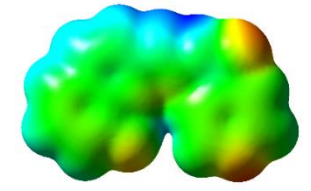
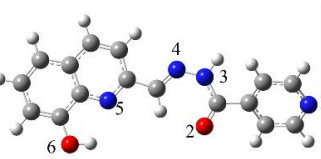
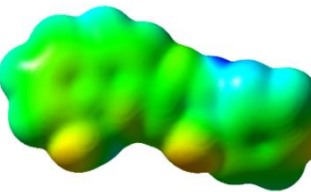
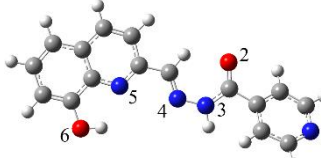
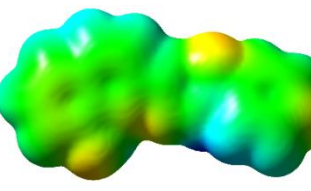
Do cálculo de cargas ChelpG, descrito no capítulo **5**, foram obtidos os mapas de potencial eletrostático (MPE), a fim de verificar a distribuição de carga nos confôrmeros (Tabela 14). Da estrutura do INHHQ dois átomos de oxigênio, O2 e O6, estão estericamente desimpedidos, de modo que poderiam atuar como nucleófilos. Segundo MPE calculado, o oxigênio O2 apresenta a região de maior densidade eletrônica. Em **C1** fica evidente a existência de menor densidade eletrônica no hidrogênio de N3, mais evidente nas conformações **C2** e **C4**.

As conformações **C5** e **C6** estão orientadas de modo que ocorra formação de um anel de seis membros através da interação entre os átomos $C-H \cdots O_2=C$, o que estabiliza as conformações, mas não o suficiente para torná-las termodinamicamente preferenciais. Em relação à diferença de energia de solvatação ($\Delta\Delta G$), somente as conformações **C4** e **C5** parecem ter algum ganho significativo de estabilização em relação a **C1**. Para as demais conformações, seu valor absoluto fica abaixo de $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ sendo essa contribuição muito pequena ($< RT = 0,592 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Com base no $\Delta G_{(C1 \rightarrow Cn)}$ apresentado, as populações de Gibbs das três espécies mais favoráveis são: **C1** = 84,9 %, **C2** = 13,8 % e **C3** = 1,3 % a 298,15 K (**C4-C6** ~ 0%). Além disso, a barreira de rotação do diedro δ_2 para transição **C1** \rightarrow **C2** tem valor $\Delta G^\ddagger = +6,75 \text{ kcal mol}^{-1}$, que pode ser reduzida em meio biológico por conta de interações intermoleculares. Os valores de pKa determinados experimentalmente por Freitas (2014) são $pK_{a1}(O_6H) = 9,84 \pm 0,01$ e $pK_{a2}(N_3H) = 10,94 \pm 0,01$, o que indica que o ligante se encontra neutro em pH fisiológico.

Das simulações de DM, foram monitorados os diedros δ_1 - δ_3 a fim de avaliar a mobilidade do ligante em solvente explícito. A Figura 25 apresenta os valores dos diedros monitorados ao longo da simulação por 50 ns. Neste intervalo de tempo já é possível observar as flutuações estruturais do INHHQ, apesar de serem encontrados na literatura tempos de simulação da ordem de microssegundos para pequenas moléculas (MATTHES et al., 2017).

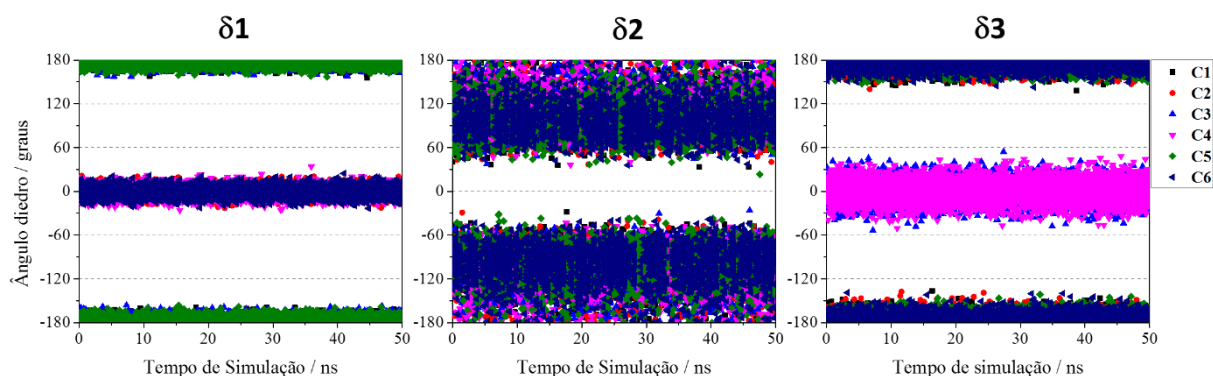
Tabela 14 – Conformações **C1-C6** e sua estrutura otimizada em nível B3LYP/6-31+G(d,p) com MPE em escala relativa – azul: menor densidade eletrônica; vermelho: maior densidade eletrônica – e energias em kcal mol⁻¹

Cn	Estrutura	MPE (Iso 0.0004)	Diedro	$\Delta G_{(C1 \rightarrow Cn)}$	$\Delta \Delta G_{(solv.)}$
C1			$\delta 1: 180^\circ$ $\delta 2: 180^\circ$ $\delta 3: 180^\circ$	-	-
C2			$\delta 1: 0^\circ$ $\delta 2: 180^\circ$ $\delta 3: 180^\circ$	+1.08	+0,38
C3			$\delta 1: 180^\circ$ $\delta 2: 180^\circ$ $\delta 3: 0^\circ$	+2.46	-0,14
C4			$\delta 1: 0^\circ$ $\delta 2: 180^\circ$ $\delta 3: 0^\circ$	+6.52	-1,28
C5			$\delta 1: 180^\circ$ $\delta 2: 0^\circ$ $\delta 3: 180^\circ$	+4.21	-1,06
C6			$\delta 1: 0^\circ$ $\delta 2: 0^\circ$ $\delta 3: 180^\circ$	+5.42	-0,40

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode ser observado que $\delta 1$ e $\delta 3$ apresentam maior rigidez, o que é esperado ocorrer por conta do caráter de dupla ligação existente nesses diedros. Os valores de $\delta 2$ apresentam oscilações de $\pm 25^\circ$ enquanto $\delta 3$ é um pouco mais flexível com valores de $\pm 35^\circ$. Já em $\delta 2$ a variação do diedro é de 60° a -60° (60° a 180° / -180° a -60°), dando ao ligante uma amplitude de flutuação de 240° . Apesar do ligante apresentar estrutura plana em estado sólido (FREITAS et al., 2013), a variação em $\delta 2$ em solução indica que o ancoramento/docagem do ligante no peptídeo pode ser facilitado por conta de sua mobilidade. Além disso, com base nas variações de diedro, as conformações que diferem somente em $\delta 2$ (C1 e C5, C2 e C6) podem ser tratadas como essencialmente as mesmas na dinâmica.

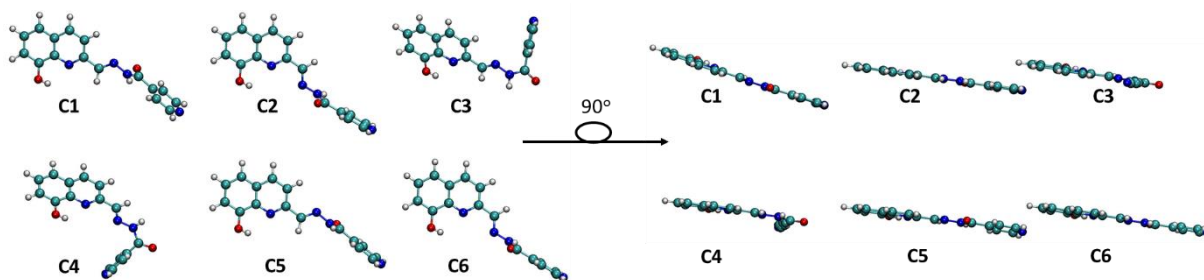
Figura 25 – Gráficos dos diedros $\delta 1$, $\delta 2$ e $\delta 3$ para as seis espécies avaliadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final de 50 ns de simulação, com auxílio do pacote CPPTRAJ do Amber16 foi obtido uma estrutura média de cada confômero sobre 5.000 estruturas analisadas de cada simulação (Figura 26). Essa análise consiste em calcular as coordenadas médias de cada átomo do sistema nos 5.000 frames avaliados, podendo resultar em uma estrutura final deformada. As estruturas médias obtidas aparecem deformadas e refletem a flexibilidade em relação à ligação N3-N4, de modo que os grupos carbonil e piridil aparecem ‘comprimidos’. Em todos os casos, a estrutura média é similar à conformação usada como estrutura inicial e não foi observado conversão de um confômero em outro no tempo de simulação analisado, com exceção dos que diferem somente em $\delta 2$.

Figura 26 – Estrutura média de 5.000 *frames* analisadas ao longo da simulação de 50 ns.



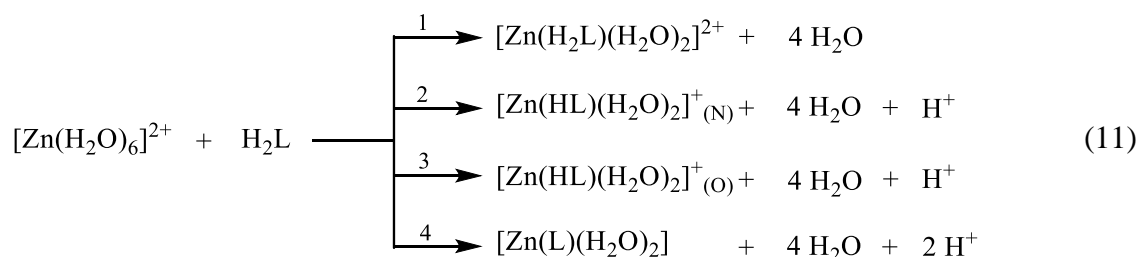
Fonte: Elaborado pelo autor.

Um ponto a se destacar é o fato de a conversão **C1**→**C2** ser necessária para que ocorra coordenação ao metal na forma de quelante, similar ao que é observado para o análogo HPICH (Figura 6 e 7). Como será mostrado nas simulações nos próximos capítulos, as interações INHHQ-Ab₄₀ não promovem essa conversão no tempo de simulação avaliado e o ligante permanece como **C1** em todos os casos.

Os dados apresentados também servirão como parâmetro para monitorar o ligante nas simulações de dinâmica molecular envolvendo o peptídeo. Uma vez que um possível docking pode ocorrer, é interessante saber o efeito estrutural causado pelo peptídeo no ligante e vice-versa.

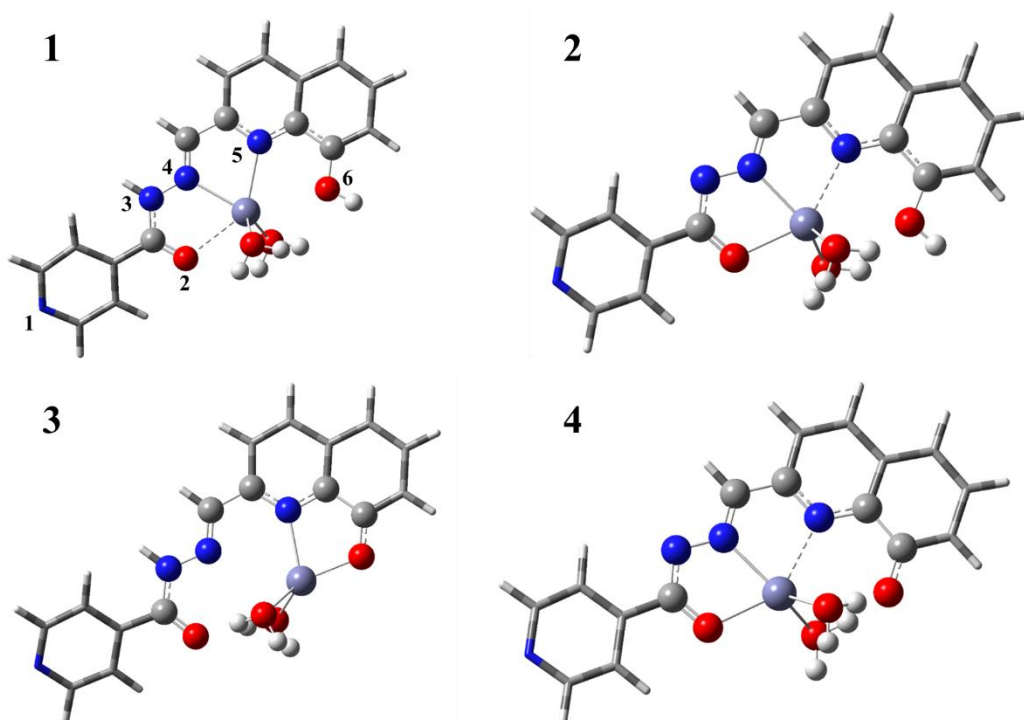
7 FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ZINCO COM INHHQ

A Eq. 11(11 apresenta a reação de formação de quatro possíveis formas do complexo $[\text{Zn}(\text{H}_n\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{n+}$ com $n=0, 1$ ou 2 , de modo que a energia livre de formação (ΔG) foi avaliada considerando íon $\text{Zn}(\text{II})$ livre na forma do complexo hexaaquozinco(II) (MUNOZ-PAEZ; PAPPALARDO; MARCOS, 1995; RUDOLPH; PYE, 1999).



Os complexos formados nas reações 1-4 serão chamados complexos 1, 2, 3 e 4 e estão apresentadas na Figura 27, em que o subscrito (N) ou (O) indica em qual grupo o ligante está desprotonado. Os dados estruturais dos complexos estão mostrados na Tabela 16.

Figura 27 – Estrutura otimizada dos complexos de zinco após coordenação do INHHQ. Os átomos ligados ao metal estão indicados por uma linha preenchida e a interação com o metal pela linha pontilhada, ambos baseados nas distâncias de ligação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 15 apresenta os termos que contribuem para a energia de formação ΔG do complexo segundo as quatro reações apresentadas. Como pode ser visto, a contribuição entrópica é significativa, uma vez que a reação envolve a liberação de 4 moléculas de água após a coordenação do ligante. Em **1** a contribuição do termo $-T\Delta S$ determina a espontaneidade da formação do complexo, enquanto nas demais reações, a ionização do ligante (pouco favorável) eleva a contribuição da energia eletrônica, aumentando a energia de formação das espécies desprotonadas $[\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})_2]^+(\text{N})$ e $[\text{Zn}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]$. Para recuperar parte da correlação eletrônica e reduzir parte do erro associado ao tamanho da função de base, foi feito o cálculo de energia em nível MP2/CBS sobre a geometria B3LYP.

Tabela 15 – Energias calculadas para as reações **1-4** sobre a estrutura otimizada em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD/SMD. Todos os valores estão em kcal mol⁻¹.

Reação	$\Delta E_{\text{el,sol}}^{\text{B3LYP}}$	$\Delta E_{\text{el,sol}}^{\text{MP2/CBS}}$	ΔH_c	$-T\Delta S$	$\Delta G^{\circ \rightarrow *}$	¹ $\Delta G^{\text{MP2/CBS}}$
1	+3,672	+10,623	-2,633	-26,104	+3,78	-14,335
2	+21,895	+29,019	-11,274	-25,875	+3,78	-4,351
3	+45,050	+24,585	-10,723	-25,241	+3,78	-7,599
4	+61,581	+50,253	-20,410	-24,546	+3,78	+9,077

¹ $\Delta G^{\text{MP2/CBS}} = \Delta E_{\text{el,sol}}^{\text{MP2/CBS}} + \Delta H_c - T\Delta S + \Delta G^{\circ \rightarrow *}$. A quantidade $\Delta G^{\circ \rightarrow *}$ corresponde à energia para mudança de estado padrão 1 atm para 1 mol L⁻¹ com $\Delta n = 3$ (Eq. 2). MP2/CBS representa o nível MP2/cc-pVTZ/SMD, em que a base de Dunning foi usada para todos os átomos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A correção da energia eletrônica em nível MP2/CBS é considerável, mas tem maior peso na reação **3**, com redução de 21 kcal mol⁻¹, o que mostra maior estabilização do complexo possivelmente por conta do efeito de ressonância do grupo quinolínico. Essa estabilização acaba por tornar essa mesma reação espontânea. A energia livre de Gibbs também foi corrigida incluindo a contribuição feita pela correção da mudança de estado padrão de 1 atm para 1 mol L⁻¹ (SHIELDS; SEYBOLD, 2009), o que pela estequiometria das reações resulta em um acréscimo de +3,78 kcal mol⁻¹ para cada reação ($\Delta n = 3$). Exceto para **4**, a formação do complexo se mostra bastante favorável com a desprotonação sendo possível em ambas posições (N3 e O6) após a coordenação, se partindo do íon livre em solução.

Apesar de não haver dados diretos da formação do complexo de zinco em solução aquosa, Hauser-Davis et al. (2015) mostraram que o INHHQ é capaz de remover as perturbações causadas pelo Zn²⁺ ao peptídeo Ab₄₀, provavelmente via quelação. Cukierman et al. (2018) mostraram que o análogo HPCIH (Figura 5) quando coordenado ao zinco se apresenta em duas

formas tautoméricas em solução DMSO- d_6 : (*E*)-enamina com ligante desprotonado e (*E*)-cetoamina com ligante protonado (neutro), sendo a enamina majoritária (complexo $[\text{Zn}(\text{PCIH})\text{Cl}_2]$). Ambos os casos indicam que a formação do complexo de zinco com INHHQ é possível de ocorrer, apesar de não ter sido ainda demonstrada em solução aquosa. Com base no modelo apresentado na Eq. 11, alguns fatores adicionais podem contribuir para a formação do complexo. Primeiramente, os complexos formados foram analisados como espécies isoladas, mas pode-se considerar a influência da primeira camada de solvatação na estabilização dos complexos carregados **1-3**. Além disso, por conta do caráter hidrofóbico do INHHQ, com a formação do complexo de zinco há liberação de moléculas de água de sua camada de solvatação promovendo aumento de entropia no sistema.

Podem ser encontrados na literatura estruturas cristalográficas de compostos de coordenação do INHHQ com os lantanídeos Yb(III) (LIU; YANG, 2009a), Eu(III) (LIU; YANG, 2009b) e Ho(III) (LIU; YANG, 2009c). Ao contrário do que é apresentado por Liu e Yang, em que o ligante aparece totalmente desprotonado (L^{2-}), as estruturas cristalográficas dos complexos de zinco com o análogo HPCIH, apresentadas no capítulo 4, e o análogo HQFUH (FREITAS et al., 2018) não mostram essa tendência. Como a química dos metais de terras raras é diferente da dos metais da primeira série de transição, essas estruturas não fornecem informações adicionais.

Uma vez que os valores de pKa do ligante são elevados (pKa = 9,84 e 10,7) (FREITAS et al., 2013), mesmo após a coordenação é pouco provável que ocorra a desprotonação total do ligante no complexo em solução aquosa ($\Delta G^{\text{MP2/CBS}} = +9,07 \text{ kcal mol}^{-1}$). Com base nessas informações, todas as etapas avaliadas no projeto foram realizadas com o ligante neutro. Os parâmetros geométricos dos quatro complexos formados estão apresentados na Tabela 16.

Em relação ao modo de coordenação, o índice de trigonalidade (τ_5) calculado para os complexos **1**, **2** e **4** sugere geometria com maior caráter de pirâmide de base quadrada (CUKIERMAN et al., 2018), consequência da orientação das moléculas de água mais próximas ao plano do ligante.

De modo similar, considerando o número de coordenação 4, os valores de τ_4 sugerem claramente maior caráter tetraédrico, também característico de complexos de Zn(II) e observado por FREITAS et al., 2018. Em ambos os tratamentos a geometria distorcida é evidente, em que H_2L apresenta ligações mais longas por conta de seu volume e estrutura mais rígida. Já quando

ocorre a ionização o caráter iônico domina a interação e em **2-4** o ligante se aproxima do metal apresentando ligações mais curtas.

Tabela 16 – Parâmetros estruturais dos complexos **1-4** otimizados em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD/SMD. Comprimentos de ligação em Å com ligações mais curtas sublinhadas e ângulos em graus.

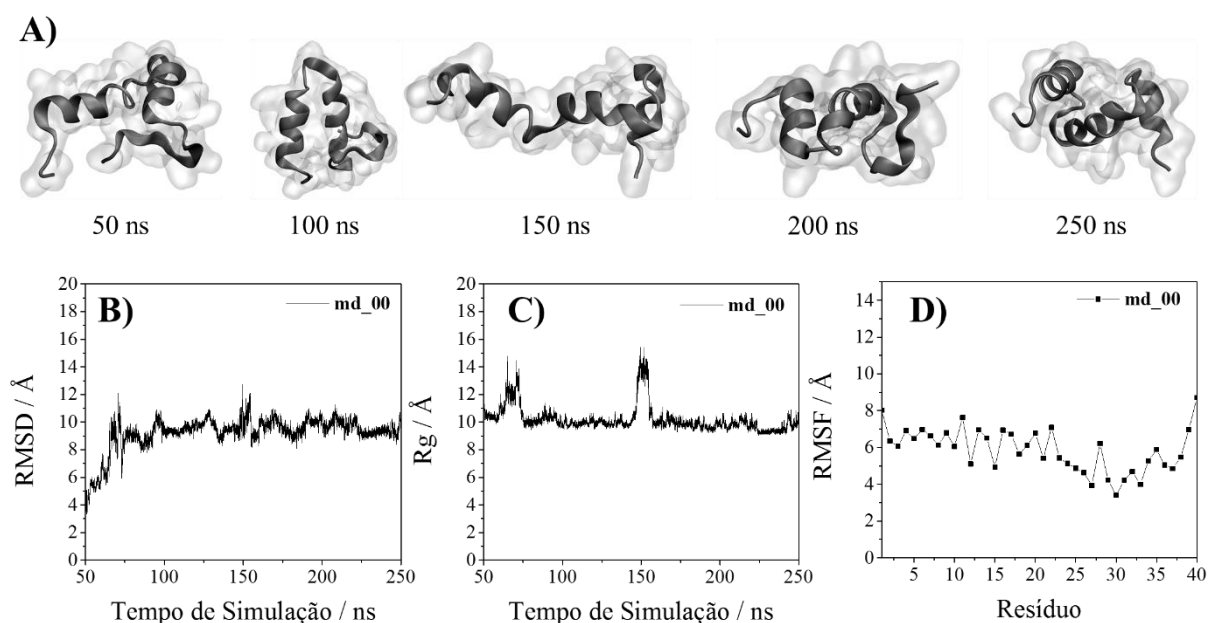
Átomos	1	2 (o)	3 (N)	4
Zn – N5	<u>2,243</u>	<u>2,072</u>	2,454	2,326
Zn – N4	<u>2,147</u>	2,866	<u>2,077</u>	<u>2,034</u>
Zn – O2	2,534	-	<u>2,170</u>	<u>2,105</u>
Zn – O6	2,821	<u>1,980</u>	-	3,100
Zn – H ₂ O (1)	<u>2,075</u>	<u>2,073</u>	<u>2,093</u>	<u>2,074</u>
Zn – H ₂ O (2)	<u>2,071</u>	<u>2,079</u>	<u>2,126</u>	<u>2,073</u>
C – N4	1,284	1,286	1,289	1,288
N4 – N3	1,354	1,363	1,360	1,356
N3 – C2	1,369	1,359	1,351	1,343
C2 – O2	1,238	1,249	1,280	1,281
\angle N5 – Zn – N4	75,35	-	73,55	76,52
\angle N5 – Zn – O2	143,35	-	148,22	152,95
\angle N5 – Zn – O6	-	84,10	-	-
\angle N5 – Zn – H ₂ O (1)	113,86	114,20	94,00	90,15
\angle N5 – Zn – H ₂ O (2)	110,00	121,50	93,54	90,12
\angle H ₂ O (1) – Zn – H ₂ O (2)	115,83	93,52	105,10	96,05
τ_5	0,386	-	0,324	0,372
τ_4	0,889	0,795	0,755	0,701

Fonte: Elaborado pelo autor.

8 ANÁLISES DAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

A estrutura final da simulação **md_00** (Ab₄₀, peptídeo livre) é mostrada abaixo na Figura 28. Logo nos primeiros 50 ns de simulação (não incluídos na análise) o peptídeo já apresenta uniformidade de volume ($R_g = (10,2 \pm 0,9) \text{ \AA}$) (Figura 28C). Uma vez que o peptídeo sofre algumas inversões na orientação da cadeia (inversão do sentido no *turn*), o valor de RMSD oscila até atingir cerca de 10 \AA (Figura 28B), se mantendo constante. É de se esperar que um peptídeo como Ab tenha um comportamento bastante dinâmico, como é observado para pequenas proteínas (LINCOFF; SASMAL; HEAD-GORDON, 2019), podendo atingir diversas conformações de mínimo antes de chegar a uma estrutura de equilíbrio após longo período de simulação (RAFFA; RAUK, 2007). Neste trabalho o tempo de simulação foi definido de acordo com as flutuações observadas ao longo da própria simulação. Desse modo, após 250 ns, as variações de RMSD, R_g ou RMSF fornecem um indicativo da necessidade de se estender o tempo de cada simulação, além do que é observado no *software* de visualização. É evidente que simulações individuais reduzem parte do potencial da técnica de dinâmica molecular, que consiste na amostragem de estruturas. Dentro do escopo do trabalho, generalizações foram evitadas justamente para evitar um possível viés.

Figura 28 – **A)** Peptídeo Ab₄₀ em 5 instantes da simulação; **B)** Gráfico RMSD; **C)** Raio de giro; **D)** Flutuações médias RMSF.

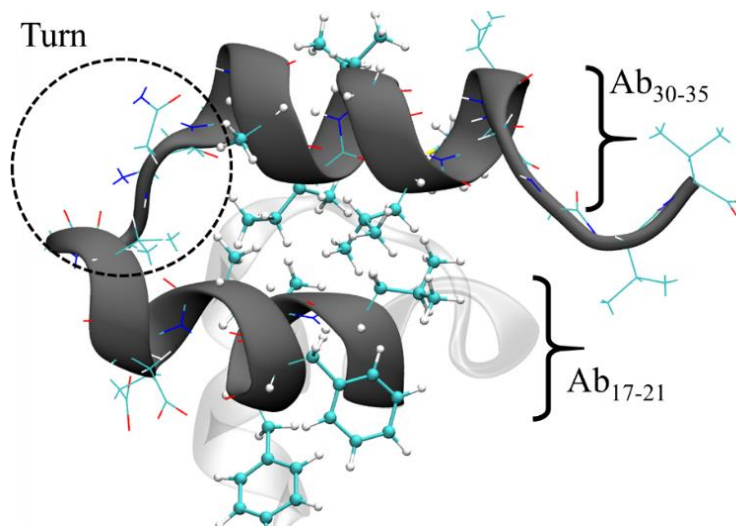


Fonte: Elaborado pelo autor.

A caracterização da estrutura do peptídeo foi feita usando o gráfico de percentual de estrutura secundária (% Estrutura Secundária ou %SS) (APÊNDICE A, Figura A.1 **md_00**). A %SS é definida como a razão do número de *frames* em que um aminoácido adota uma determinada conformação pelo número total de *frames*. Como é esperado, não é observado a formação de folhas beta (Para e Anti), assim como será mostrado para os demais modelos. A literatura reporta como uma etapa fundamental para a formação das placas senis a mudança estrutural, saindo do oligômero amorfo para sua forma de folhas beta (HAN; HE, 2018). Esse processo ocorre principalmente ao final da *lag-phase* e durante o crescimento das fibras (Introdução, Figura 3). A região C-terminal parece adotar preferencialmente alfa hélice com regiões de *turn* em toda estrutura, sendo observado na região Ab₂₁₋₂₅ maior percentual de *turn* pela mudança de direção entre as duas hélices formadas em Ab₁₇₋₂₁ e Ab₃₀₋₃₅. Nessa região estão concentrados os aminoácidos hidrofóbicos (L₁₇VFFA₂₁₋₂₅---A₃₀IIGLM₃₅), que se mantêm próximos por interações hidrofóbicas (Figura 29). Vale destacar que o modelo usado na reconstrução do peptídeo (Figura 13, PDB **1Z0Q**) consistia numa estrutura de RMN que já adotava estrutura secundária de alfa hélice (modelagem comparativa). Como será mostrado mais adiante, parte dessa estrutura parece se conservar em todas as simulações.

Figura 29 – Representação da região de alfa hélice e *turn* na estrutura final de **md_00**.

Aminoácidos da região Ab₁₇₋₂₁ e Ab₃₀₋₃₅ em representação de bastão e bola.

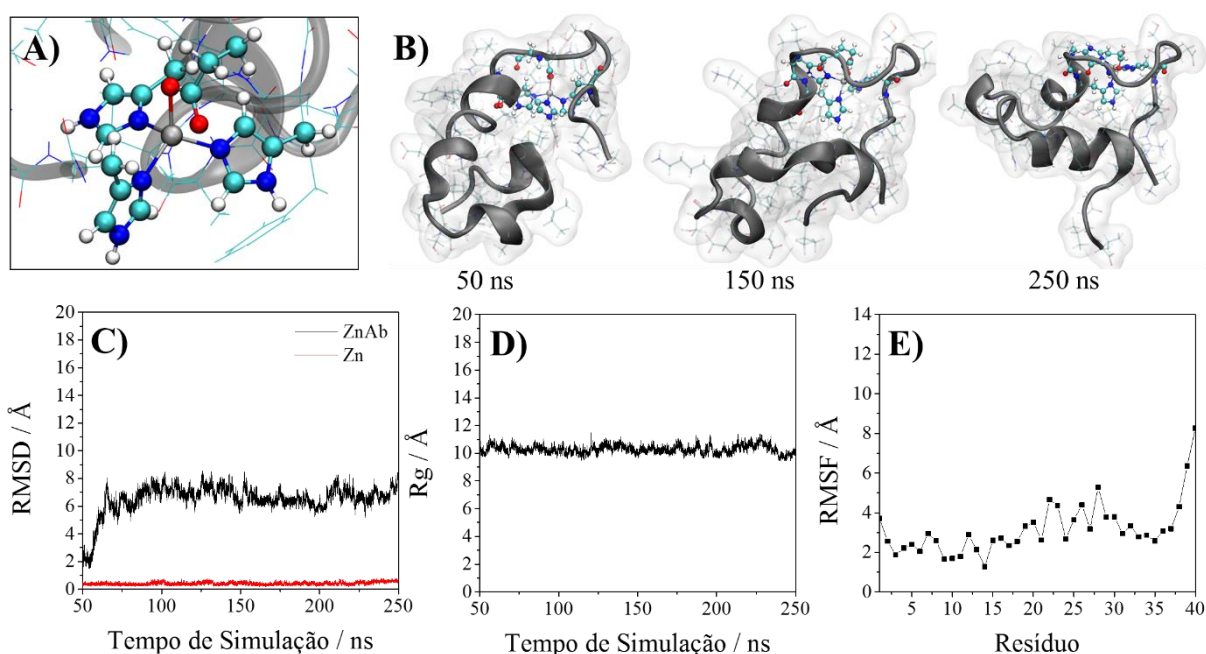


Fonte: Elaborado pelo autor.

No sistema **md_01** (ZnAb₄₀) a presença do metal na região N-terminal parece não afetar o volume do peptídeo e rapidamente é observado convergência com $R_g = (10,3 \pm 0,3) \text{ \AA}$ (Figura 30D). Assim como ocorre no modelo **md_00**, em **md_01** a contribuição de %SS Para e Anti não é significativa, aparecendo somente para dois aminoácidos, mas como pontos isolados em

His6 e Gly9 (Figura A.1 **md_01**). Aqui também é observado maior contribuição da estrutura alfa hélice e hélice 3-10, havendo formação de *turn* rígida nos aminoácidos Asp7 e Ser8. Diferente de **md_00**, a região C-terminal apresenta muito menos ordenamento, com maior contribuição também de *turn* contra a predominância da alfa hélice em **md_00**. Em ambas simulações as estruturas *turn*, alfa hélice e hélice 3-10 constituem maior parte das conformações adotadas pelo peptídeo. Por ser um peptídeo pequeno e intrinsecamente desordenada (PID) (LINCOFF; SASMAL; HEAD-GORDON, 2019), a transição entre essas conformações parece ser coerente, com contribuição de %SS das hélices conservadas do modelo usado em sua construção e o *turn* por ser uma PID.

Figura 30 – **A)** Sítio metálico no peptídeo; **B)** Estrutura do peptídeo em três instantes da simulação; **C)** RMSD – Zn: sítio metálico e ZnAb: peptídeo; **D)** Raio de giro; **E)** Flutuações médias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A diferença inicial mais evidente entre os dois monômeros apresentados está na flutuação média dos resíduos, RMSF, que fica acima de 5 Å para a maior parte dos aminoácidos em **md_00** (Figura 28D), enquanto a presença do metal reduz sua mobilidade na região N-terminal, atingindo valores abaixo de 3 Å (Figura 30E). Vale lembrar que ambas simulações partiram da mesma estrutura inicial, com a diferença de **md_01** apresentar o metal coordenado. Outro efeito que contribui para as flutuações média é a rotação ao longo de regiões de *turn*, que não afetam

a compactação estrutural, mas são responsáveis pelas pequenas oscilações também observadas no RMSD.

Detalhes mais aprofundados sobre a estrutura do peptídeo nas duas simulações não serão discutidos. Aqui se objetiva reconhecer os padrões que podem estar associados ao efeito da presença do ligante nas simulações sequenciais. Dessa forma, dando sequência nas simulações do monômero e com a construção do dímero, dois conjuntos de simulações foram realizados: (i) monômero [(ZnAb) \cdots nH₂L] e (ii) dímero [(ZnAb.Ab) \cdots nH₂L] com n = 1 e 2, e o ligante com conformação **C1**. As etapas envolvendo monômero foram feitas a fim de observar o efeito provocado pela inclusão do ligante na dinâmica do peptídeo. Já na presença do dímero, qualquer influência do ligante poderia afetar a estabilidade do agregado proposto. Nesse caso, faz mais sentido adotar a proporção 1:2 metal/ligante considerando a possibilidade de cada ligante interagir com uma unidade do dímero. Em seguida, para considerar o efeito da coordenação do ligante (etapas do mecanismo proposto), foi usado o dímero como modelo com estequiometria 1:1 metal/ligante.

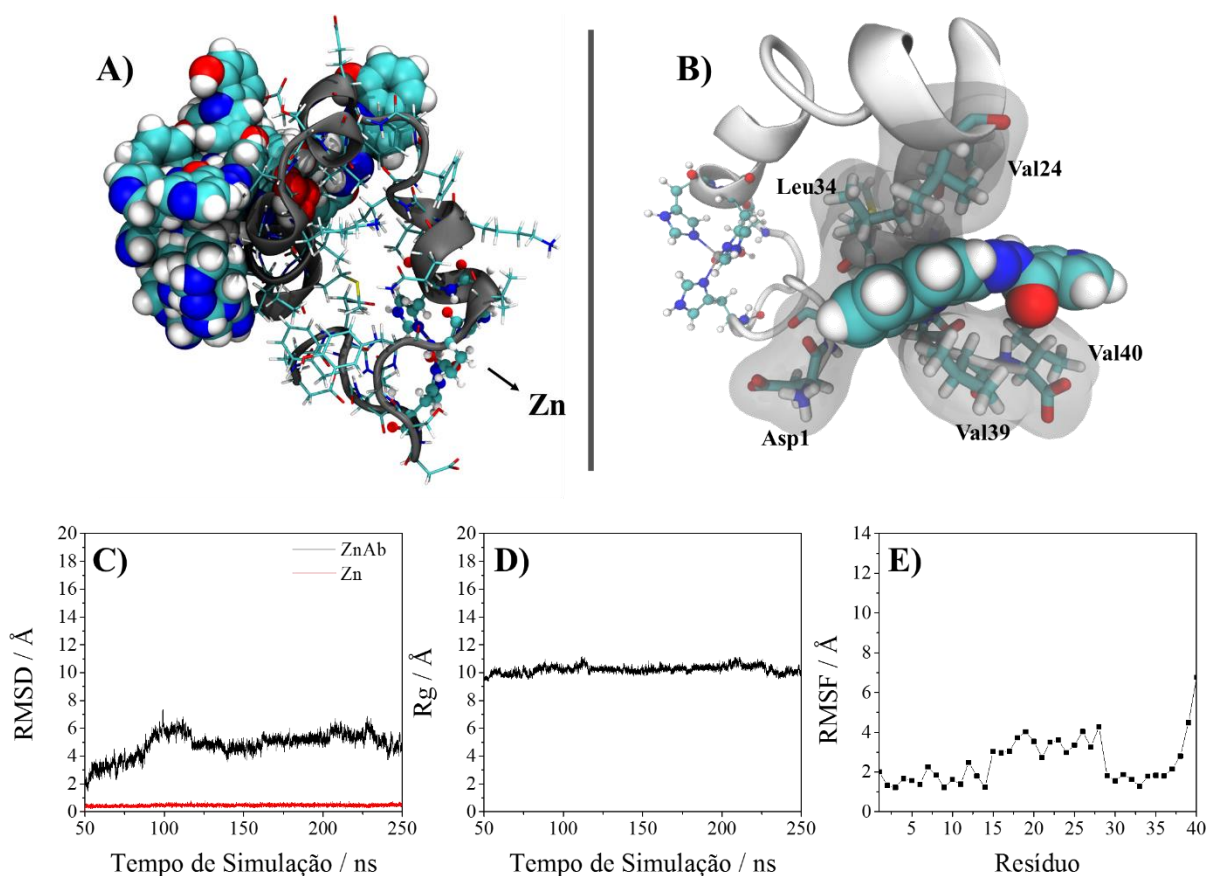
8.1 SIMULAÇÕES COM MONÔMERO ZNAB – (ZNAB₁₋₄₀):

Após a inclusão do ligante, simulação **md_02**, levam-se cerca de 3 ns até que ocorra sua aproximação da estrutura do peptídeo. Logo após esse intervalo é observado sua maior permanência próximo à região hidrofóbica C-terminal. O ligante também chega a se aproximar da região do metal estabelecendo interações π -stacking com o aminoácido Tyr10, mas não permanece por muito tempo próximo à região. Assim como fazem Matthes et al. (2017), foram definidos alguns modos de interação do ligante com o peptídeo. Essas interações são mostradas na Figura A.3 e aqui estão divididas em: não ligado (NL), parcialmente ligado (PL) e docado (DC), modos de interação baseados no número de contatos totais entre ligante e peptídeo (descrição do número de contatos no **APÊNDICE A**). Após cerca de 40 ns o ligante já se encontra parcialmente ligado na região hidrofóbica.

Na Figura 31A é mostrado o peptídeo com a sobreposição de 8 estruturas do INHHQ, uma a cada 25 ns entre os 50 e 250 ns de simulação. Apesar de o peptídeo também alterar sua conformação, sua última estrutura foi usada como referência. Na Figura 31B é mostrado que ocorre a docagem do ligante, apesar de não serem observadas mudanças significativas nos valores de RMSD e R_g do peptídeo (Figura 31C e D). Nesse *frame* são mostrados alguns aminoácidos que interagem diretamente com o INHHQ. A mudança mais relevante é observada

nas flutuações para a região Ab₂₉₋₃₇, com valores médios abaixo de 2 Å (Figura 31E). Assim como em **md_01**, a região do metal não sofre grandes variações, uma vez que o ligante parece não interagir próximo a essa região por tempo apreciável. Apesar da presença de grupos polares na estrutura do ligante, a ocorrência de ligações de hidrogênio entre H₂L e ZnAb é muito pequena e ocorrem por curto período. O Gráfico A.2 **md_02** (APENDICE A) mostra com quais aminoácidos ocorre formação de algumas ligações de hidrogênio peptídeo-ligante durante a simulação e sua distância média. As 10 ligações de hidrogênio com maior ocorrência se concentram entre os aminoácidos do segmento Ab₂₈₋₄₀, mesma região em destaque na Figura 31B e com menores flutuações. Apesar de as ligações de hidrogênio não serem o modo de interação predominante, há de se considerar principalmente o efeito hidrofóbico como direcionador das interações.

Figura 31 – **A)** Sobreposição de 8 estruturas do H₂L ao longo da simulação; **B)** Região Ab₂₁₋₄₀ indicando o ligante e alguns aminoácidos interagentes; **C)** RMSD; **D)** Raio de Giro; **E)** Flutuações médias.

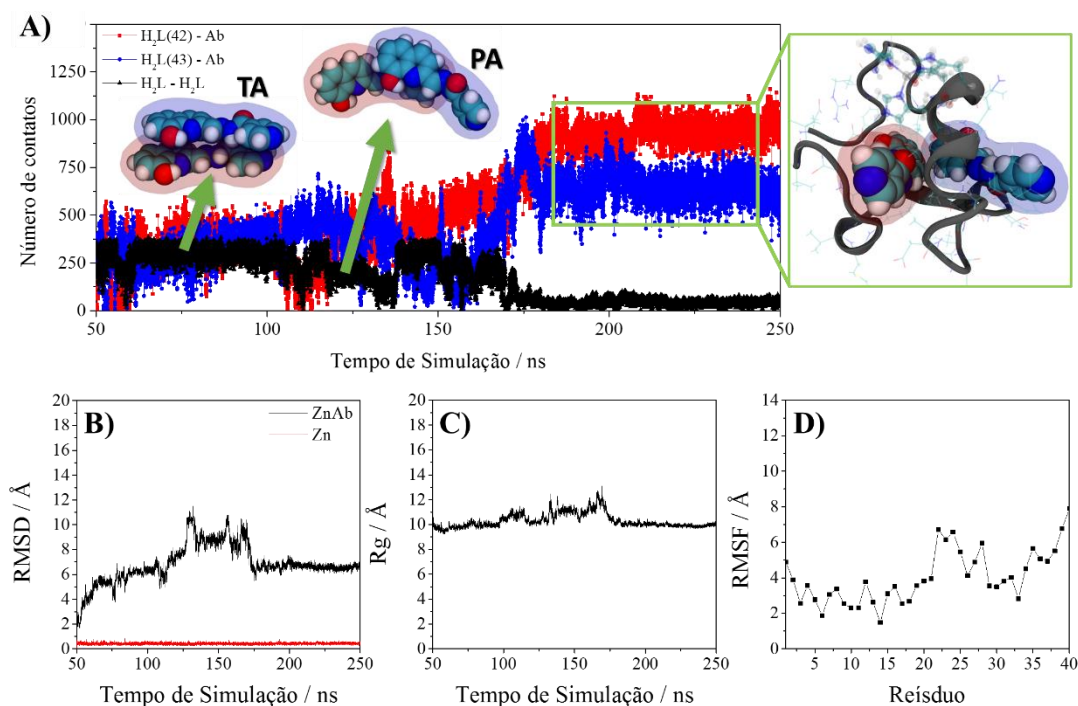


Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como ocorre para o ligante livre, também é observado sua grande mobilidade em relação ao diedro $\delta 2$ (Gráfico A.3). Ao mesmo tempo, o ligante se apresenta em momentos em que os valores de $\delta 2$ se mantêm constantes, reflexo dos modos de interação PL e DC. Esse tipo de comportamento ocorre principalmente quando o ligante está docado. Em resumo, a presença do ligante afeta principalmente a região C-terminal, que sofre mudança na contribuição %SS aumentando o valor de alfa hélice, com o segmento Ab₁₋₁₆ se mantendo basicamente inalterado.

Com a inclusão do segundo ligante, simulação **md_03**, logo no início da simulação ocorre formação do dímero (H₂L)₂, mantido por interações do tipo π -stacking e hidrofóbicas (Figura 32). Também foram verificados dois modos de interação entre os ligantes baseados no número de contatos: parcialmente associado (PA) e totalmente associado (TA), mostrados na (Figura 32) em um momento da simulação em que ocorrem. O efeito hidrofóbico contribui para a formação do dímero principalmente para os ligantes, que mesmo após sua aproximação ao peptídeo, se mantém associado.

Figura 32 – **A)** Número de contatos entre os ligantes e ZnAb. Em destaque é mostrado a docagem dos dois ligantes no peptídeo após 175 ns; **B)** RMSD; **C)** Raio de giro; **D)** Flutuações médias.



*NL: menos de 55 contatos; PA: de 56 a 200 contatos; TA: 201 contatos ou mais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a docagem, há ainda um grande número de contatos entre os ligantes e o peptídeo precisa se reorganizar para acomodar as duas moléculas (Figura 32). Após 175 ns, o sistema atinge certa estabilidade e tanto RMSD quanto Rg se tornam constantes (Figura 32B e C).

Na presença dos dois ligantes os valores de %SS são bastante alterados em relação ao peptídeo livre, **md_01**, havendo perda de estrutura secundária na região C-terminal (Figura A.1 **md_03**). A docagem também afeta o RMSF em relação a **md_02**, que possui somente um ligante. Como quase todo o peptídeo parece estar envolvido na docagem, há um acréscimo na flutuação média em pelo menos 2 Å para todos resíduos. Com a formação do dímero (H₂L)₂ é observado menor variação no diedro δ_2 , com mudanças que ocorrem simultaneamente em ambos ligantes como é de se esperar. Após a docagem os ligantes adotam uma conformação bem definida até o final da simulação (Figura 32A). A aproximação dos ligantes ao sítio metálico também não parece ter alguma interação dominante.

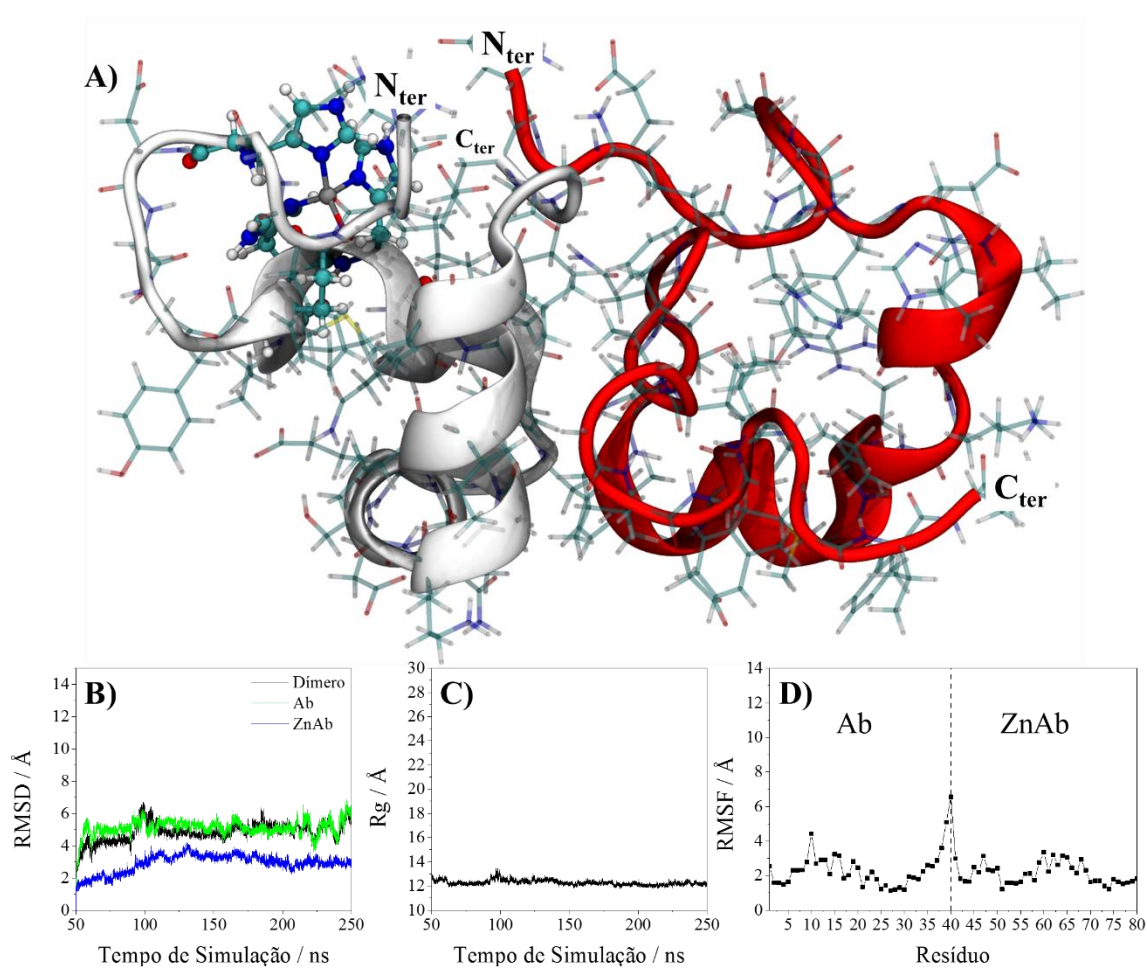
8.2 SIMULAÇÕES COM DÍMERO [ZNAB.AB] – (AB₁₋₄₀; ZNAB₄₁₋₈₀):

Após a formação do dímero em solvente implícito, a dinâmica foi iniciada em solvente explícito com o modelo já estruturado, simulação **MD_01**. Um ponto importante a se considerar é a orientação do sítio metálico no peptídeo ZnAb no dímero. Com a formação do dímero, a região do metal se posiciona afastada da interface entre os peptídeos (Figura 17, tópico **5.3**). A agregação dos monômeros ocorre inicialmente via interação entre os segmentos hidrofóbicos e então o dímero se estabelece (HAN; HE, 2018). Como será visto nos demais modelos, a região hidrofóbica parece ser fundamental para manter os peptídeos unidos nas simulações realizadas. Como há simplificação do ambiente químico no modelo da dinâmica, é possível que a separação não seja realmente observável no intervalo de tempo estudado.

Em relação a **MD_01**, uma vez que a estrutura já se encontra dimerizada, logo no início da simulação ocorrem pequenos rearranjos estruturais e o peptídeo atinge sua estabilidade, observados pelo RMSD e Rg (Figura 33B e C). Nas simulações com dímero o RMSD é apresentado em partes, a fim de verificar a contribuição de cada peptídeo ao seu valor total (Figura 32C – Ab: peptídeo livre; ZnAb: peptídeo com o zinco). Já o volume do dímero é um pouco maior que do monômero, $R_g = (12,3 \pm 0,2)$ Å, com as maiores flutuações concentradas nos aminoácidos terminais Ab₃₈₋₄₀. Em termos de estrutura secundária, também é observado formação de alfa hélice, hélices 3-10 e *turn* (Figura A.1 **MD_01**). O peptídeo Ab₁₋₄₀ apresenta dois pontos com a estrutura Anti que são invariantes ao longo de toda a simulação. Por serem

pontos isolados, não há qualquer contribuição estrutural para a formação de folhas beta também no dímero. Enquanto ocorre maior conservação de estrutura secundária na unidade ZnAb₄₁₋₈₀, a estrutura do peptídeo sem o metal transita entre as conformações secundárias mais frequentes (*turn*, alfa hélice e hélice 3-10).

Figura 33 – **A)** Estrutura do dímero **MD_01**; **B)** RMSD – Ab: peptídeo, ZnAb: peptídeo com metal, Zn: sítio metálico; **C)** Raio de giro; **D)** Flutuações médias de cada monômero.



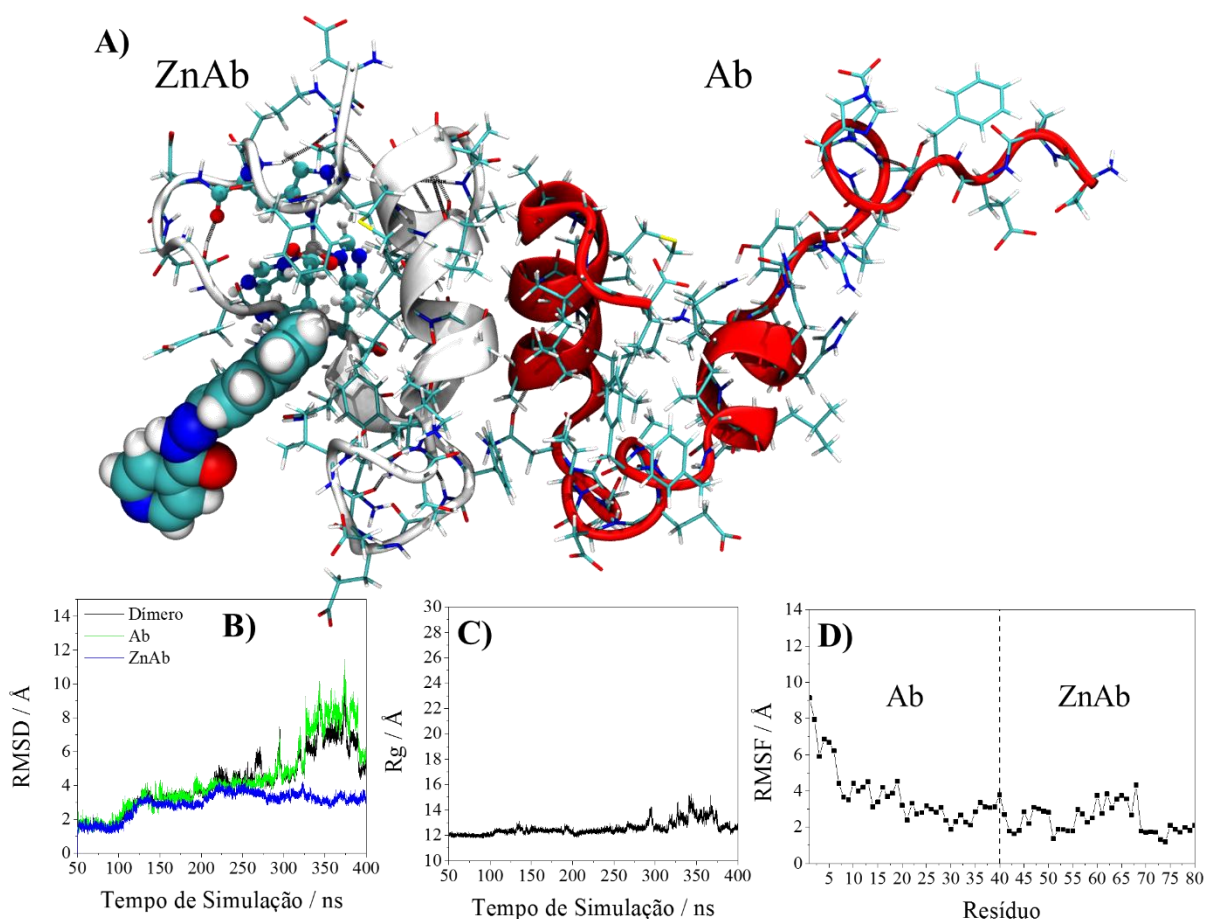
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a inclusão do primeiro ligante, **MD_02**, sua aproximação ao dímero ocorre rapidamente, permanecendo interagindo por quase toda a trajetória. Assim como ocorre para **md_02**, o ligante forma algumas ligações de hidrogênio com o peptídeo. Dos resíduos em que ocorre essa interação, Ala2 (de Ab₄₀) é o que tem maior duração, cerca de ~40 ns, e comprimento de ligação médio 2,78 Å, o mais curto (Gráfico A.2 **MD_02**). Com base no número de contatos, o ligante apresenta modo DC como predominante, apesar de permanecer com valores abaixo de 750 contatos (Gráfico A.4), inferior ao observado em **md_03**. Logo após 100 ns de simulação é observado um pequeno aumento RMSD, que cresce até cerca de 4 Å,

quando ocorre então seu aumento abrupto (Figura 34B). Com o aumento da variação do RMSD, iniciado em 200 ns, a simulação inicial de 250 ns foi então prolongada até 400 ns. Ocorre de o peptídeo Ab₁₋₄₀ se desdobrar, com a região N-terminal se afastando significativamente, atingindo o valor de Rg = 15,3 Å e desvio observado no RMSD (Ab) = 11,45 Å (Figura 34A), sem que haja participação direta do ligante. A Figura 34A mostra o momento em que o peptídeo livre Ab₄₀ se afasta da interface de contato entre os monômeros.

Mesmo após o fenômeno observado, a região hidrofóbica (Ab₂₅₋₄₀), que mantém contato entre os peptídeos, não se separa em momento algum. Como resultado a região C-terminal em ambos monômeros permanece bem definida com a estrutura de alfa hélice dominante (Figura A.1).

Figura 34 – **A)** Representação do dímero com INHHQ próximo ao peptídeo ZnAb; **B)** RMSD; **C)** Raio de giro; **D)** Flutuações médias para cada peptídeo.



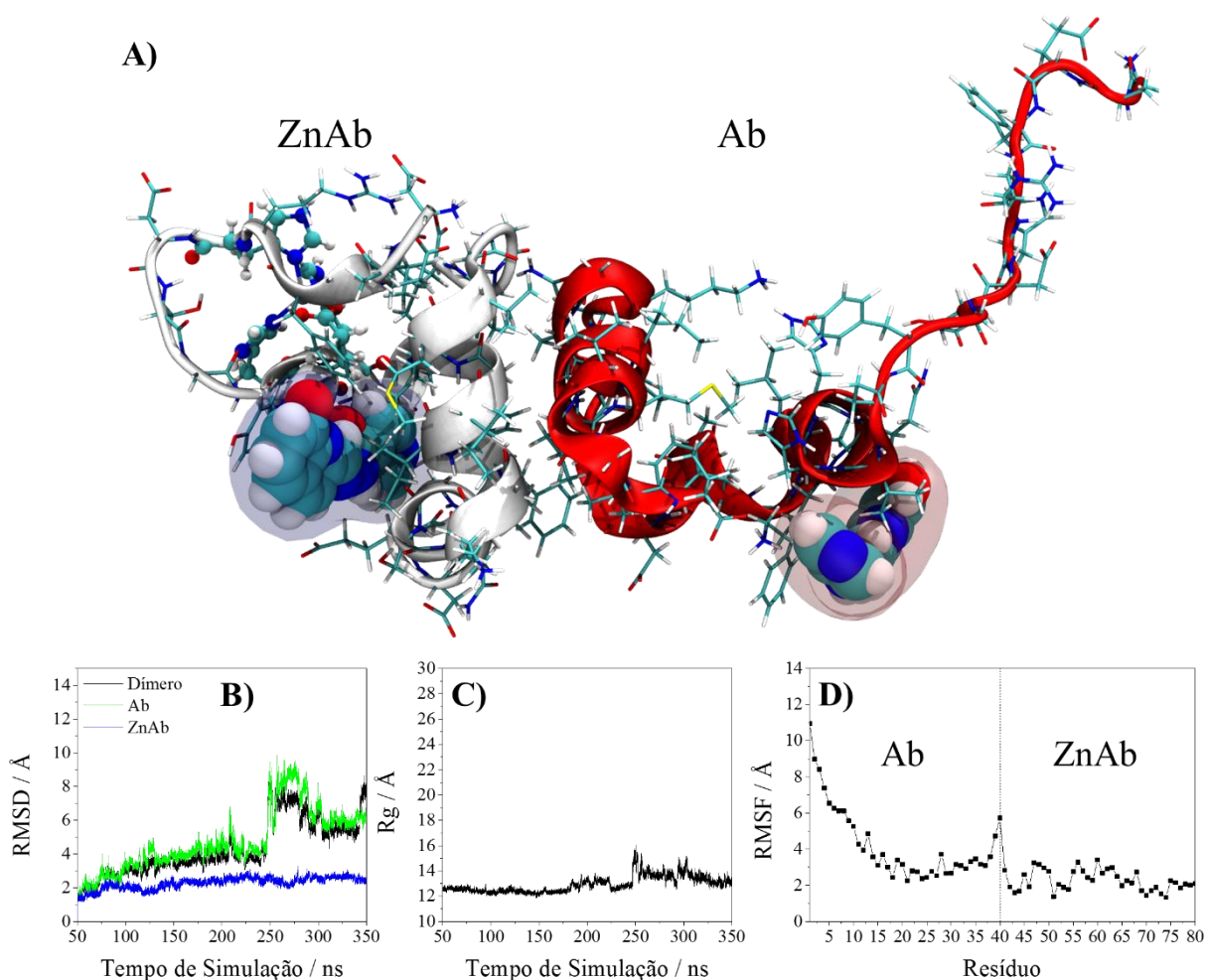
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a formação do dímero e bloqueio da região hidrofóbica provocado pela interação entre os peptídeos, o ligante permanece interagindo na superfície do peptídeo ZnAb. A inclusão

do metal nessa região reduz a carga líquida do peptídeo, o que parece favorecer a aproximação do peptídeo a essa região. Em contrapartida, a região N-terminal livre do peptídeo Ab₄₀ é bastante flexível e carregada, permanecendo interagindo com as moléculas de água do solvente. Com a proximidade do INHHQ ao sítio metálico, a formação de interações π -stacking com aminoácidos como Tyr10 e Phe4 e algumas ligações de hidrogênio podem ter papel importante em uma etapa anterior a sua coordenação ao metal.

Com a inclusão do segundo ligante, **MD_03**, ocorre algo similar aos eventos observados em **md_03** e **MD_02**. A simulação inicia com aproximação dos ligantes ao dímero e logo após 50 ns ocorre a formação da espécie (H₂L)₂, que se mantém dimerizado por cerca de 100 ns. Neste ponto os ligantes permanecem próximos aos peptídeos, parcialmente docados, principalmente por terem uma das faces em contato entre si.

Figura 35 – **A)** Estrutura do dímero com a região N-ter de Ab₁₋₄₀ afastada; **B)** RMSD; **C)** Raio de giro; **D)** Flutuações médias por peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando os ligantes se separam, ocorre a docagem e cada molécula permanece interagindo com um dos peptídeos (Figura 34A e Figura A.5).

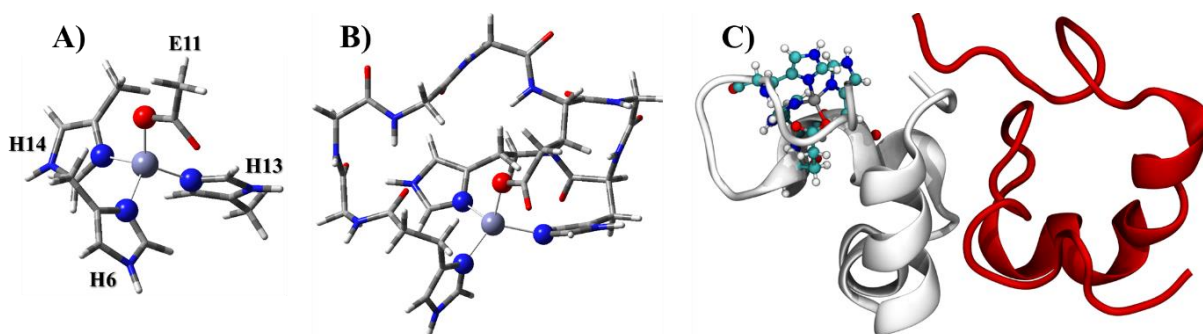
Em Ab₁₋₄₀ ocorre o desdobramento região N-terminal e os valores de RMSD e Rg crescem significativamente, com valores máximos a partir de 265 ns (Figura 35B e C). A mudança estrutural reflete os altos valores de RMSF, que passa de 9 Å nos resíduos Asp1 e Ala2 (Figura 35D). Em termos globais, ambos peptídeos apresentam alto contribuição da formação de alfa hélice, com as regiões C-terminal bastante conservadas (Figura A.1 **MD_03**). No segmento ZnAb₆₈₋₇₆ a estrutura de alfa hélice permanece essencialmente inalterada em toda a simulação (%SS > 90 %), similar ao que ocorre com o modelo **MD_01**, que se encontra isolado em solução. Nos três modelos apresentados, o perfil de estrutura secundária se mantém bastante parecido no peptídeo coordenado ao metal, ZnAb₄₁₋₈₀. A retenção da estrutura nessa parte do dímero é esperada, já que as flutuações se concentram na região N-terminal, hidrofílica, e o metal reduz sua mobilidade. Analisando as simulações do dímero, o perfil de Rg, RMSD, RMSF e %SS se mantém bem definido para ZnAb₄₁₋₈₀. Uma vez que há grande flutuação da região N-terminal (vide **md_00**), a presença do metal promove redução da carga líquida do peptídeo, reduzindo sua solubilidade, sua mobilidade é afetada e a entropia do sistema reduzida. Com isso, as alterações conformacionais são observadas principalmente no peptídeo livre Ab₁₋₄₀. Em adição, o contato entre as regiões hidrofóbicas não permite com que os peptídeos se separem ou que o ligante se aproxime dessa região. Como citado anteriormente, é possível que a dissolução do dímero não seja observada no tempo de simulação estudado nas condições avaliadas.

9 MECANISMO DE REAÇÃO – MODELO QUÂNTICO E CLÁSSICO

Após a coordenação do ligante as simulações foram realizadas de acordo com o mecanismo proposto e três etapas modeladas para dinâmica serão discutidas juntamente com a parte quântica. Nessas etapas o ligante foi incluído na conformação **C2**, que já se orienta para a formação da ligação multidentada.

Seguindo a lógica minimalista, o primeiro modelo mimético **zm** é representado como o menor fragmento que representa o sítio metálico do peptídeo. Esse é o mesmo modelo utilizado na obtenção dos parâmetros para dinâmica molecular (tópico 5.2) e, como dito, representa o sítio metálico com a primeira esfera de coordenação. Aqui os ligantes possuem maior liberdade rotacional e será mostrado que a geometria do complexo metal-peptídeo, apesar de tetraédrica, apresenta maior deformação se considerada a cadeia peptídica que conecta esses aminoácidos. A Figura 36 apresenta os três modelos utilizados no trabalho: **zm** como modelo minimalista; **ZM** como modelo maior, que inclui efeito estrutural e parte da segunda esfera de coordenação e **MD_01**, estudado na dinâmica molecular. Como mencionado no capítulo 5, os aminoácidos histidina estão representados pelo grupo 4-metilimidazol e o glutamato pelo acetato (**Ac**) no modelo **zm**. Todas as estruturas do modelo **zm** foram otimizadas e caracterizadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD/SMD. Para o cálculo das energias eletrônicas em solução, entretanto, usar o método MP2/CBS, usado no cálculo de energia de formação do complexo Zn-INHHQ, se mostrou bastante custoso e não foi realizado. A fim de melhorar as energias, foi feito emprego da base cc-pVTZ para todos os átomos neste modelo, mas ainda com o funcional B3LYP (Tabela 17).

Figura 36 – **A)** Modelo mimético minimalista **zm** com aminoácidos indicados. **B)** Modelo mimético maior **ZM**. **C)** Modelo **MD_01** representando o sistema “real” usado na DM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo **ZM** inclui, além da primeira, também a segunda esfera de coordenação do zinco, com exceção das moléculas de água de solvatação. Este modelo foi construído tomando inicialmente a estrutura do peptídeo Ab₁₋₁₆ (PDB **1ZE9**), que foi truncada entre os aminoácidos His6 e His14, formando o segmento Ab₆₋₁₄ (**H₆DSGYEVHH₁₄**). Neste segmento, os aminoácidos não coordenados tiveram seus grupos laterais substituídos por átomos de hidrogênio, totalizando um sistema com 100 átomos, incluindo o zinco. Dessa forma o segmento Ab₆₋₁₄ foi utilizado para incluir o efeito estrutural da cadeia peptídica que conecta os aminoácidos coordenados. Assim, **ZM** tem melhor correlação com o que seria esperado de um sistema real. Esse modelo teve sua estrutura otimizada e caracterizada como mínimo na superfície de energia potencial em nível B3LYP/6-31G(d)/SDD/SMD, com energia eletrônica em solução recalculada aumentando a base dos átomos de C, N, H e O para 6-311+G(2d,2p).

Tabela 17 – Valores de energia para cada etapa da reação proposta empregando os modelos **zm** e **ZM**. Energias em kcal mol⁻¹.

Modelo zm						
Etapa	$\Delta E_{el,sol}$	¹ $\Delta E_{el,sol}^{SP}$	ΔH_c	-T ΔS	$\Delta G^{o \rightarrow *}$	² ΔG^{SP}
1	-3,79	-5,51	+0,36	+9,88	-1,89	+2,84
2	+4,01	+3,83	+0,18	-0,23	-	+3,78
3	+1,72	+1,15	+2,51	+11,83	-1,89	+13,61
4	+5,04	+4,49	-0,45	+0,27	-	+4,32
5	-0,51	+0,82	-0,96	-11,10	+1,89	-9,36
6	+0,59	+1,25	+0,08	+0,51	-	+1,84
7	+3,94	+5,80	-1,51	-7,02	-1,89	-4,61
8	+23,51	+25,21	-3,39	-31,57	+5,67	-4,08
Total						+8,34
Modelo ZM						
Etapa	$\Delta E_{el,sol}$	³ $\Delta E_{el,sol}^{SP}$	ΔH_c	-T ΔS	$\Delta G^{o \rightarrow *}$	² ΔG^{SP}
1	+5,81	+1,51	-1,44	-8,30	-1,89	-10,12
2	+0,16	-0,94	-0,38	+2,73	-	+1,42
3	+0,70	+8,59	+2,45	+14,73	-1,89	+23,87
4	+2,03	+4,81	-0,88	-1,01	-	+2,92
5	-3,91	-9,31	-0,14	-3,13	-	-12,59
6	+3,04	-0,20	-0,83	+3,87	-	+2,84
7	-6,08	-2,64	+3,00	+8,89	-1,89	+7,37
8	+16,50	+10,67	-0,38	-16,16	+1,89	-3,98
Total						+11,73

¹Energia eletrônica corrigida com a base cc-pVTZ para todos os átomos. ² $\Delta G^{SP} = \Delta E_{el,sol}^{SP} + \Delta H_c - T\Delta S + \Delta G^{o \rightarrow *}$. A quantidade $\Delta G^{o \rightarrow *}$ corresponde à energia para mudança de estado padrão 1 atm para 1 mol L⁻¹ e depende da estequiometria da reação. ³ Energia eletrônica corrigida com a base 6-311+G(2d,2p) para os átomos C, H, N e O.

Fonte: Elaborado pelo autor.

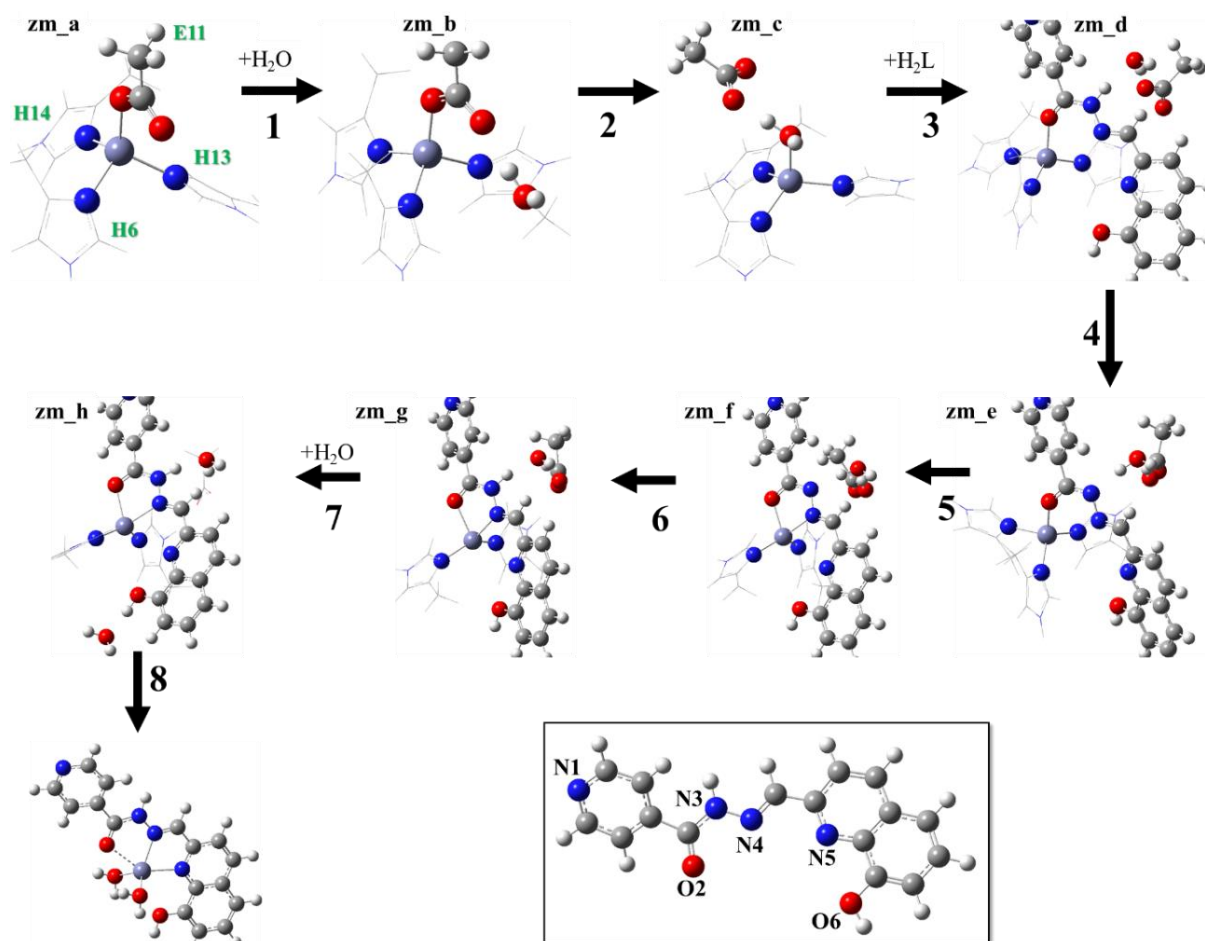
O aumento da base teve como objetivo reduzir um pouco do erro associado ao truncamento do conjunto de funções de base. A Tabela 17 mostra as energias livre de Gibbs, ΔG^{SP} , e suas componentes em cada etapa. A energia eletrônica $\Delta E_{el,sol}$, calculada no nível de otimização, foi colocada a fim de comparação com a correção obtida com o aumento da base. A energia eletrônica corrigida está indicada com como $\Delta E_{el,sol}^{SP}$.

De modo geral, a mudança de ΔE_{el} com aumento da base no modelo **zm** é menor que 2 kcal mol⁻¹ em todas etapas, enquanto no modelo **ZM** a diferença chega a quase 6 kcal mol⁻¹ (Tabela 17). Essa tendência é razoável, uma vez que a função de base 6-31G(d), usada na otimização das estruturas em **ZM**, não inclui funções de polarização para os átomos de H, que estão envolvidos nas ligações de hidrogênio entre H₂L, H₂O e **Glu**. Na Figura 37 são mostradas as estruturas otimizadas do modelo **zm**, dando destaque para os fragmentos mais importantes de cada espécie. No **APÊNDICE A** estão apresentados os valores de comprimento de ligação e ângulo de ligação de cada complexo apresentado (**a-h**) para ambos modelos (Tabela A.1 à Tabela A.6), além do mesmo esquema para **ZM** (Figura A.6).

Avaliando a proposta de reação, na etapa **1** foi considerado a aproximação de uma molécula de água que passa a fazer parte do sistema durante toda a reação na forma de um complexo molecular. Como será mostrado mais à frente, a presença de uma molécula pode facilitar a desprotonação do ligante, uma etapa considerada importante no mecanismo proposto. A diferença de energia nessa etapa é pequena no modelo **zm** e foi encontrada $\Delta G^{SP}(\mathbf{zm}) = +2,839$ kcal mol⁻¹, porém, cerca de 13 kcal mol⁻¹ maior do que o valor obtido para o modelo **ZM**. Nessa etapa a contribuição do termo $-T\Delta S$ é significativo e indica aumento de entropia com a formação do complexo molecular **ZM_b**.

Na sequência ocorre então a troca entre o **Glu** (**Ac** no modelo **zm**) pela molécula de água, tendo sido considerada a labilidade do carboxilato, etapa **2**. Na Proposta de Mecanismo foi comentado o papel de um quarto ligante oxigenado na esfera de coordenação do zinco em Ab (para o modo de coordenação 3N1O). Por se tratar de um ligante oxigenado variável, uma estrutura intermediária com uma molécula de solvente seria possível de se formar, o que facilitaria a coordenação do ligante. A troca de **Glu/Ac** por H₂O tem pequeno valor de energia e se mostra bastante provável de ocorrer, em que as interações com a cadeia peptídica tanto pela molécula de água quanto pelo **Glu** acabam por estabilizar a espécie **ZM_c**. A etapa **3** é a etapa mais desfavorável, em que ocorre a entrada do ligante H₂L na esfera de coordenação deslocando a molécula de água.

Figura 37 – Caminho de reação proposto com modelo **zm**. O destaque é feito para os fragmentos mais importantes do sistema.



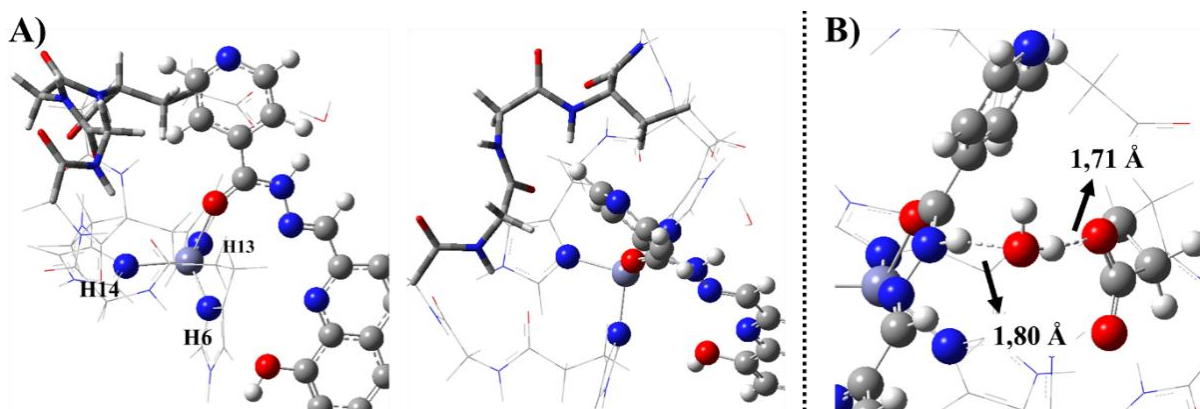
Fonte: Elaborado pelo autor.

A perda de entropia no termo $-T\Delta S$ em ambos os modelos passa de 11 kcal mol^{-1} e é o termo determinante na energia de reação. Com a formação de **ZM_d** a correção da energia eletrônica também contribui com um aumento de $\Delta E_{\text{el,sol}} = +0,698 \text{ kcal mol}^{-1}$ para $\Delta E_{\text{el,sol}}^{\text{SP}} = +8,59 \text{ kcal mol}^{-1}$, que pode ser atribuído ao rearranjo da cadeia peptídica para acomodar o ligante volumoso, principalmente o grupo piridil (Figura 38A).

Como foi mostrado na formação do complexo de zinco com INHHQ (capítulo 7), é evidente a participação do átomo de oxigênio do INHHQ na esfera de coordenação dos complexos $[\text{Zn}(\text{H}_n\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{n+}$ quando ocorre a ionização. Por outro lado, o envolvimento dos átomos de nitrogênio **N4** e **N5** no complexo com ligante neutro e nos complexos do HPCIH (Figura 6 e 7) coordenados em modo bidentado também é observada (modo **N^N**). As espécies **zm_d** e **ZM_d** foram então avaliadas com modo de coordenação **N^N**, sendo a diferença de energia calculada $\Delta G(\text{zm}) = [G(\text{N}^{\wedge}\text{N}) - G(\text{O}_2)] = +14,041 \text{ kcal mol}^{-1}$ e uma estimativa de $\Delta G(\text{ZM})$

$\sim +9,307$ kcal mol⁻¹ para **ZM_d**. A mudança de geometria do complexo também é alterada, sendo o caráter de pirâmide de base quadrada mais evidente ($\tau_4 = 0,902$ com H₂L_(O2) e $\tau_5 = 0,383$ com H₂L_(N^N) para **zm**) (Tabela 18).

Figura 38 – **A)** O Grupo piridil volumoso promove o rearranjo da cadeia peptídica em destaque. **B)** Molécula de água considerada na transferência de próton entre H₂L e **Glu**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a coordenação bidentada N^N as ligações Zn-His são alongadas em ambos os modelos em quase 0,1 Å, o que promove grande distorção na estrutura do complexo formado com as histidinas His6 e His13 em ângulos próximos a 180° (Figura A.7).

Com a coordenação, na etapa 4 ocorre então a transferência de próton de H₂L para **Glu/Ac** com auxílio da molécula de água (Figura 38B), o que aproxima o ligante do metal reduzindo o comprimento de ligação Zn-O2(**zm_e**) de 2,152 Å para 2,033 Å (Tabela A.2) com $\Delta G^{SP}(\mathbf{zm}) = +4,32$ kcal mol⁻¹. Como a energia envolvida na coordenação N^N é bem maior que a transferência de próton, esta é muito mais provável que ocorra em solução. A formação da espécie HL⁻ é similar ao tautômero enamina proposto por Cukierman et al. (2018) para o análogo HPCIH. Uma vez que ocorre formação do ligante carregado (**zm_e**), o caráter nucleofílico de O2 coordenado ao metal cresce e a aproximação de N4 *trans* à His14 também fica facilitado. Na etapa 5, considerar o modelo mimético **zm** não traz muita informação, uma vez que a saída de qualquer histidina poderia ser considerada equivalente, já que são representadas pelo mesmo ligante 4-metilimidazol. Nesse ponto o modelo **ZM** inclui parte do efeito estrutural e a energia encontrada nessa etapa foi $\Delta G^{SP}(\mathbf{ZM}) = -12,585$ kcal mol⁻¹, melhor correlacionada com o modelo real. Em ambos os modelos o processo se mostra bastante favorável, com todos os termos da energia livre de Gibbs contribuindo para a espontaneidade

da reação (Tabela 17), definindo essa como a etapa mais importante para o avanço no mecanismo proposto.

Tabela 18 – Parâmetros estruturais da espécie **zm_d** nos modos monodentado e bidentado (**N^N**). Ângulos usados no cálculo de τ_4 e τ_5 estão sublinhados.

Ligação / Å	zm_d (O2)	zm_d (N^N)	ZM_d (O2)	ZM_d (N^N)
Zn – H6	2,094	2,176	2.079	2.194
Zn – H13	2,048	2,117	2.099	2.137
Zn – H14	2,103	2,157	2.125	2.237
Zn – O11	-	-	-	-
Zn – O2	2,152	-	2.242	3.019
Zn – N3	3,805	-	-	3,411
Zn – N4	3,469	2,335	-	2,383
Zn – N5	4,564	2,430	-	2,417
Zn – O6	4,576	-	2.079	2,866
Ângulo / graus	zm_d (O2)	zm_d (N^N)	ZM_d (O2)	ZM_d (N^N)
\angle H6 – Zn – H13	<u>125,42</u>	<u>171,82</u>	<u>135,54</u>	<u>165,11</u>
\angle H6 – Zn – H14	101,88	91,22	96,75	91,68
\angle H13 – Zn – H14	106,83	96,03	<u>112,86</u>	101,15
\angle H6 – Zn – O11	-	-	-	-
\angle H6 – Zn – O2	<u>107,84</u>	-	106,40	-
\angle Zn – O2 – C	145,24	-	145,73	-
\angle H14 – Zn – N4	-	<u>148,84</u>	-	140,75
\angle H14 – Zn – N5	-	<u>140,08</u>	-	<u>147,79</u>
τ_4	0,902	-	0,792	-
τ_5	-	0,383	-	0,286

Fonte: Elaborado pelo autor.

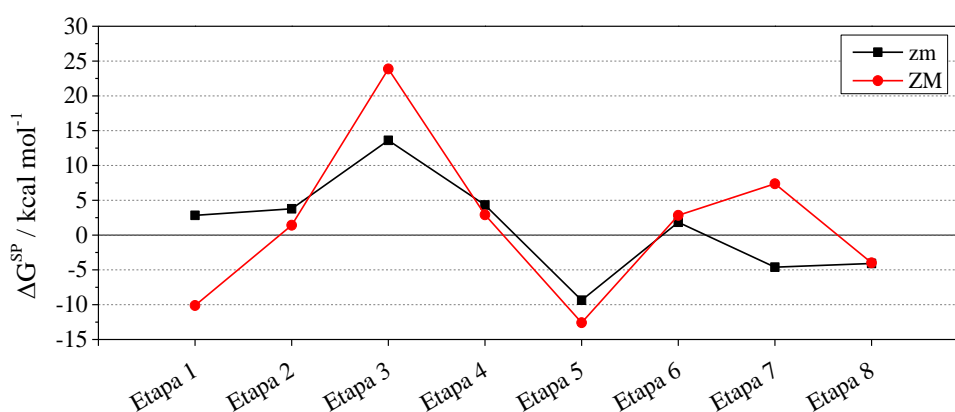
O complexo formado (**zm_f**) apresenta uma geometria tetraédrica deformada com ângulo H13-Zn-H14 de 135,52° em **zm_f** e 123,63° em **ZM_f** (Tabela A.2 e Tabela A.5). Essa diferença se dá pela restrição estrutural que a cadeia peptídica promove, impedindo os aminoácidos de se acomodarem na esfera de coordenação do metal. Após a transferência do próton de **HGlu/HAc** para **HL⁻** na etapa **6**, as ligações Zn-O2 e Zn-N4 se alongam e o ângulo H13-Zn-H14 se torna menos tensionado. Nessa etapa a energia também é pequena, estando abaixo de 3 kcal mol⁻¹ para ambos modelos.

Na etapa **7** foi inserido uma molécula de água ao sistema já visando a formação do complexo final [Zn(H₂L)(H₂O)₂]²⁺. O termo -TΔS tem maior peso na energia total, sendo desfavorável na formação de **ZM_h**. A diferença de energia entre os modelos também é significativa, elevando o valor de ΔG^{SP}(**zm**) = -4,615 kcal mol⁻¹ para ΔG^{SP}(**ZM**) = +7,369 kcal mol⁻¹. Por fim, a liberação do metal na forma do complexo [Zn(H₂L)(H₂O)₂]²⁺ aparece com energia de reação bem parecida em ambos os modelos, com ΔG^{SP} ~ -4,0 kcal mol⁻¹. No modelo

zm a parte remanescente do peptídeo é dada pelos ligantes 4-metilimidazol e acetato isolados, enquanto em **ZM** o metal foi retirado do peptídeo junto ao ligante e as duas moléculas de água, deixando o restante peptídeo com a estrutura inalterada.

A energia livre de Gibbs total para ambos os modelos é bem parecida e de mesmo sinal, o que sugere que o modelo **zm** consegue reproduzir, de modo geral, o perfil energético da reação proposta (Gráfico 1). Vale destacar que **zm** é limitado em reproduzir o caráter restritivo dos aminoácidos ligados pela cadeia peptídica e apresenta em todas as etapas o acetato interagindo com o sistema. Com o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ formado, a carga elevada do composto garante sua solubilidade e difusão em solução. A captura por outras biomoléculas poderia facilitar seu deslocamento para outras regiões, promovendo a distribuição do metal.

Gráfico 1 – Perfil energia ΔG^{SP} ao longo do caminho de reação para ambos os modelos.



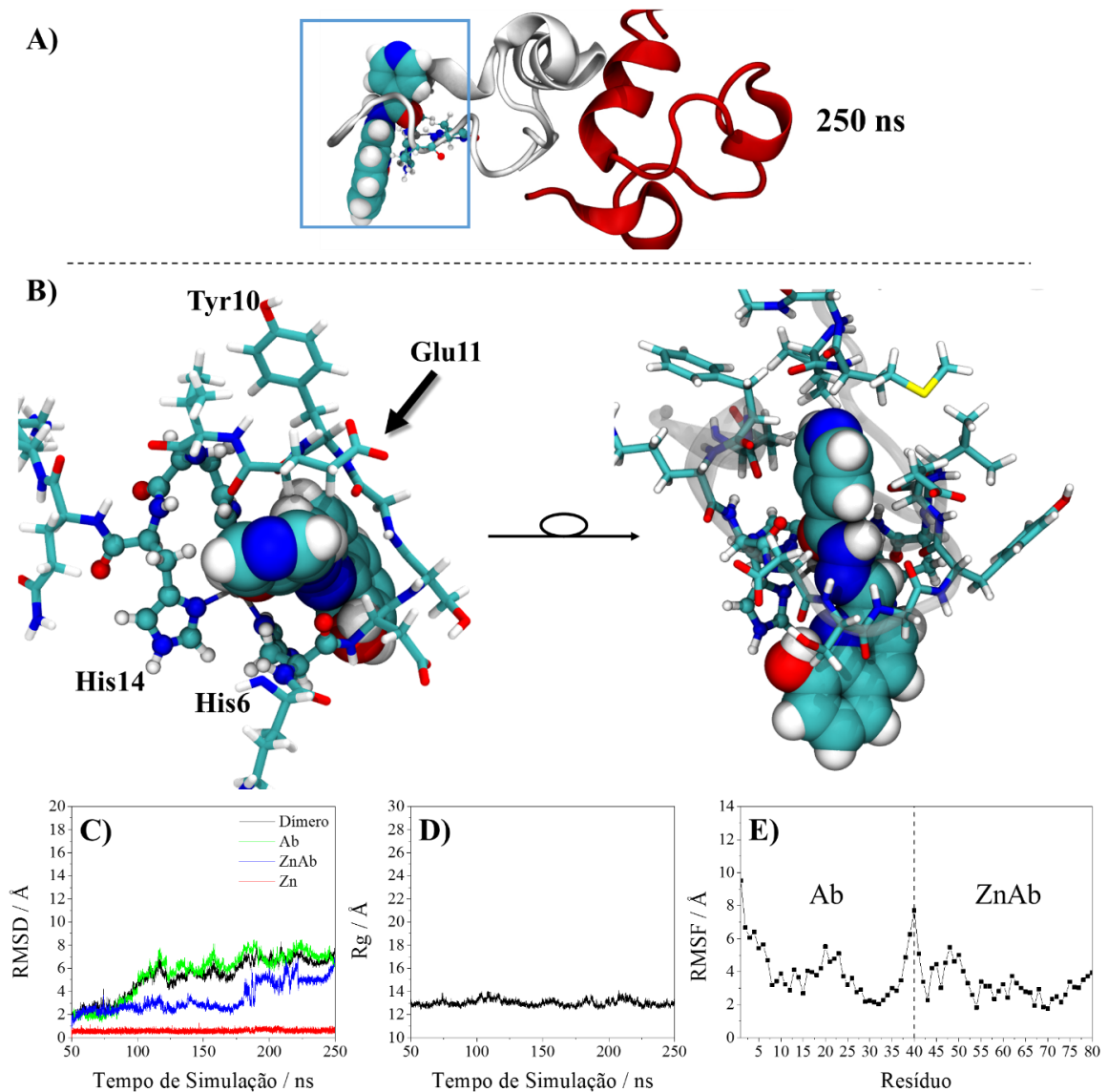
Fonte: Elaborado pelo autor.

As espécies **zm_d**, **zm_f** e **zm_h** foram então usadas no preparo dos sistemas **MD_04**, **MD_05** e **MD_06** de dinâmica molecular (tópicos 5.6, 5.7 e 5.8). Os detalhes sobre a construção do sistema foram abordados no capítulo de Construção dos Sistemas, mas vale ressaltar que se tratam de simulações sequenciais, em que a estrutura final de **MD_04** foi usada na construção de **MD_05**, e esta na construção de **MD_06**. A ideia dos modelos sequenciais era tentar observar como a mudança de coordenação e liberação do complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ poderia afetar a dinâmica do sistema.

Observando a dinâmica molecular, o segmento ZnAb_{47-52} , que conecta His6 e His13, está bloqueando o sítio metálico e a aproximação do ligante ficaria dificultada (estrutura final de **MD_02**). No entanto, mesmo com essa restrição o ligante foi inserido na esfera de coordenação e o sistema foi simulado (Figura 39A). Ao longo da dinâmica o segmento peptídico permanece na mesma posição, o que acaba restringindo parte da mobilidade do ligante. Na região

hidrofílica do peptídeo ZnAb, segmento ZnAb₄₁₋₅₅, ocorre predominância de hélice 3-10 com regiões sem uma conformação secundária definida, enquanto o peptídeo Ab₁₋₄₀ parece permanecer com mesma tendência estrutural do dímero isolado em solução **MD_01** (Figura A.2 **MD_01**). Mesmo estando o sítio metálico afastado da região de interface entre os peptídeos, as flutuações em Ab ocorrem como observado em outras simulações, sofrendo inversões em regiões de *turn* e provocando o aumento no RMSD, sem alterar o valor de Rg (Figura 39C e D). Isso pode ser observado principalmente no gráfico de RMSF (Figura 39E), em que parte dos aminoácidos de Ab₁₋₄₀ apresenta desvios acima de 4 Å, principalmente as regiões N- e C-terminais.

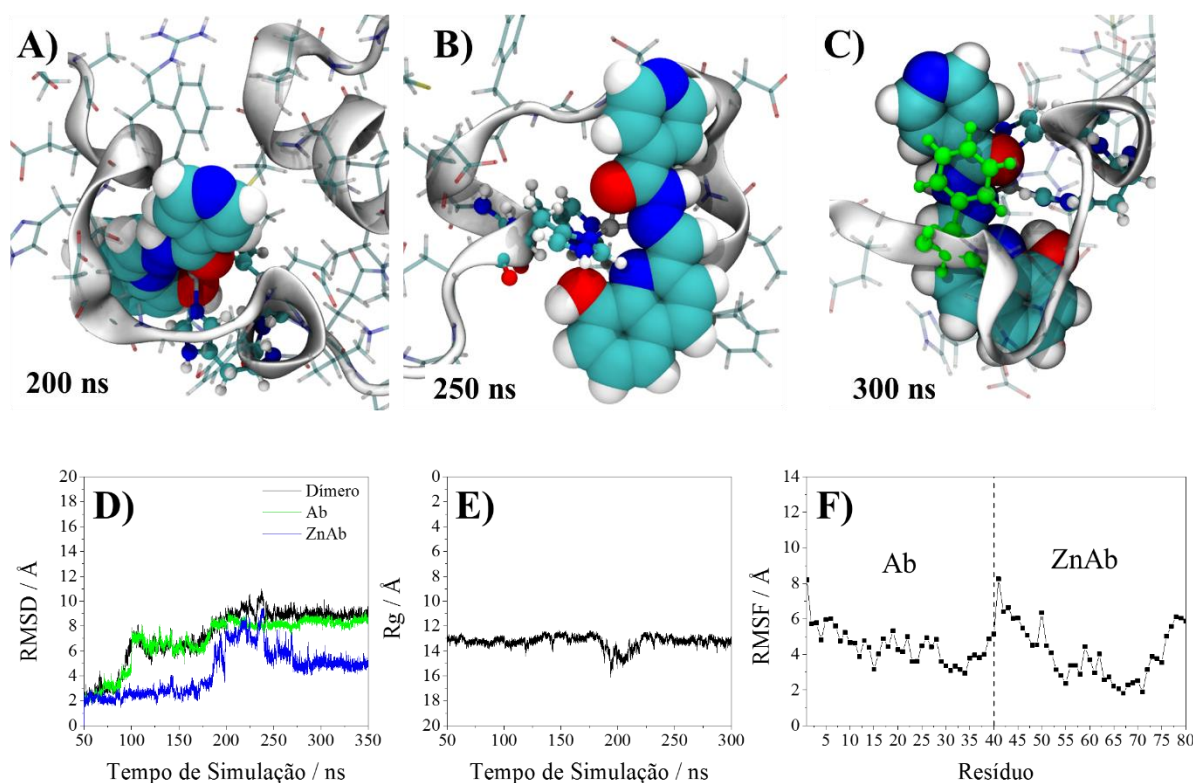
Figura 39 – **A)** Ligante coordenado ao zinco; **B)** Cadeia peptídica protegendo o sítio metálico com estrutura do H2L; **C)** RMSD; **D)** Raio de giro; **E)** Flutuação média por peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um aspecto particular do modelo estudado está na formação do dímero. Uma vez que a agregação dos monômeros Ab e ZnAb foi feita em solvente implícito, o viés associado à sua construção foi significativamente eliminado. Entretanto, como a aproximação dos peptídeos ocorre via região hidrofóbica e então ocorre a estabilização do dímero (até 250 ns), o posicionamento do sítio metálico oposto à interface dos peptídeos pode ter pouco papel na sua desestabilização. Contudo, com a saída da His6 da esfera de coordenação do metal o peptídeo possui muito mais mobilidade, uma vez que His13 e His14 são resíduos adjacentes e não restringem o movimento do peptídeo. Enquanto o ligante permanece “protegido” pela cadeia peptídica em **MD_04**, com a formação da ligação bidentada $O^{\wedge}N$ de H_2L e a saída de His6, a região N-terminal ganha maior mobilidade e torna o sítio metálico exposto ao solvente. Na Figura 40 são representados três instantes da simulação **MD_05**. Até 200 ns a região N-terminal permanece envolvendo o ligante, com maiores variações sendo causadas por Ab₁₋₄₀ (Figura 40D).

Figura 40 – **MD_05** em três instantes diferentes mostrando a orientação da região N-terminal em ZnAb com: **A)** ligante preso; **B)** ligante exposto e **C)** interação π -stacking formada com Phe4; **D)** RMSD; **E)** Raio de giro; **F)** Flutuações médias por peptídeo.



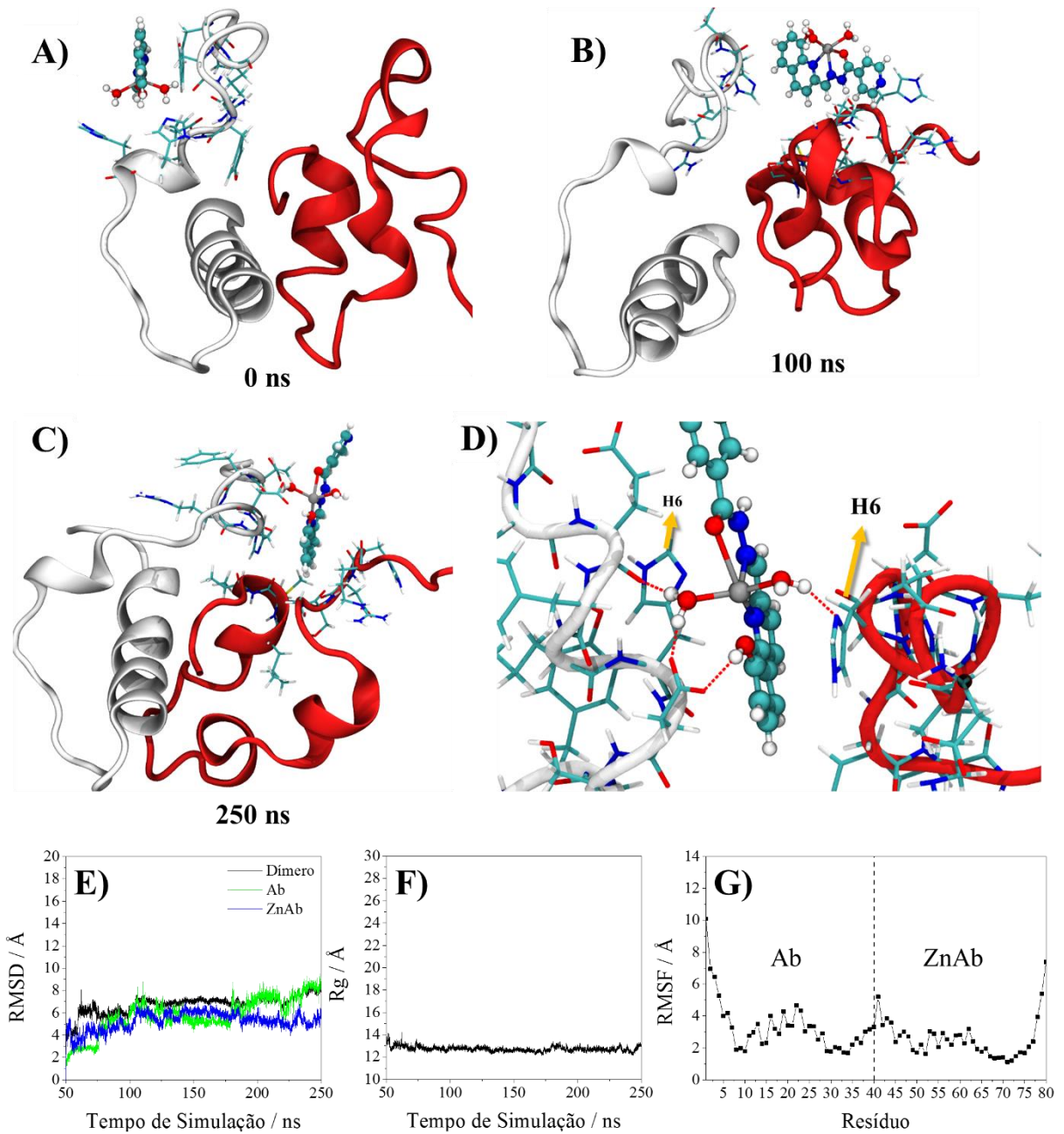
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 200 ns, o segmento ZnAb₄₁₋₅₂ muda sua orientação e deixa o ligante exposto e logo ao final da simulação ocorre formação da interação π -stacking entre o resíduo Phe4 e o ligante (Figura 40C). Esse tipo de interação não é previsível no modelo **ZM** dos cálculos quânticos e serve como um indicativo de que as interações H₂L-peptídeo podem estabilizar a coordenação do ligante na forma do complexo ternário H₂L-Zn-Ab. Outro aspecto é a estrutura secundária dominante alfa hélice no fragmento ZnAb₅₃₋₇₆ (Figura A.2), o mesmo segmento com menores flutuações observadas no RMSF (Figura 40F). Ao contrário do que ocorreu nas demais simulações, ZnAb₄₁₋₈₀ sofre mudanças conformacionais de modo mais acentuado em **MD_05**, contribuindo bastante para o RMSD do dímero, assim como o peptídeo Ab₁₋₄₀. Uma vez que o o peptídeo está ligado ao metal por dois aminoácidos adjacentes, a mobilidade restaurada da região N-terminal contribui bastante para as flutuações no dímero.

Por fim, com a hidrólise do aduto e formação do complexo livre $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, a simulação **MD_06** apresenta alguns pontos interessantes. Logo nos primeiros 50 ns o complexo estabelece ligações de hidrogênio com os peptídeos e permanece interagindo com os resíduos carregados Glu e Asp de ambas unidades (Figura 41). Com isso, mesmo que o metal não esteja mais coordenado, a sua permanência se concentra na região N-terminal de ambos peptídeos, chegando a estabelecer uma interação inter-peptídeo (Figura 41D). Por se tratar de um complexo de carga líquida +2, as interações eletrostáticas são dominantes e o complexo não se desprende do peptídeo no intervalo de tempo estudado. Visto que, embora a função de MPAC do ligante envolva transportar o metal para diferentes regiões no sistema biológico auxiliando a recuperação da homeostase, esse tipo de comportamento também deve ser considerado. A neutralidade do complexo só seria possível com a desprotonação total de H₂L, o que não parece ser um processo espontâneo, ou sua interação com outras biomoléculas. Apesar disso, sua carga elevada garante alta solubilidade e o peptídeo tem parte de sua carga líquida total restaurada. Possivelmente a ionização do ligante levando ao complexo $[\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ poderia reduzir sua afinidade pelos aminoácidos carregados do peptídeo, mas esse modelo não foi estudado neste trabalho.

No sistema de dinâmica molecular estudado a presença do complexo interagindo com o peptídeo é inevitável. Entretanto, o ganho de mobilidade observado na região N-terminal serve como um bom indicativo de que o ataque do INHHQ ao metal, mesmo se estabilizado num complexo ternário, pode facilitar sua dissolução.

Figura 41 – Quatro representações de MD_06 com A) Complexo no início da produção; B) Próximo à região entre os peptídeos; C) Interagindo com resíduos carregados Asp e Glu; D) Formando ligações de hidrogênio entre peptídeos; E) RMSD; F) Raio de giro; G) Flutuações médias por peptídeo



Fonte: Elaborado pelo autor.

10 CONCLUSÕES

Esse trabalho teve como objetivo propor um mecanismo de reação do INHHQ como MPAC capturando o íon Zn^{2+} no peptídeo beta amiloide. O projeto foi iniciado com a definição de uma metodologia quântica adequada, segundo a qual a literatura é bastante variável (Tabela 3). Com a obtenção das estruturas dos modelos usando o funcional B3LYP e funções de base de Pople, a correção da energia eletrônica foi feita usando o método MP2 e função de base cc-pVTZ, isso quando possível. A correção das energias em todos os cálculos realizados tem papel significativo, como visto na formação dos complexos de zinco com INHHQ (capítulo 7) e nas etapas mostradas no mecanismo de reação (capítulo 9).

Com uma estrutura dinâmica, o INHHQ teve seis conformações modeladas a partir dos diedros $\delta 1-3$ da cadeia alifática. A energia relativa à espécie termodinamicamente mais estável mostra que **C1**, **C2** e **C3** são as espécies predominantes em solução, com valores de população de Gibbs de 84,9 %, 13,8 % e 1,3 % respectivamente. A conformação **C2** é similar à adotada pelo análogo HPCIH nas estruturas cristalográficas mostradas na Figura 6 e Figura 7, com uma barreira de $\Delta G^{(C1 \rightarrow C2)} = +6,75 \text{ kcal mol}^{-1}$, sendo esse valor acessível em solução e podendo ser reduzido com interações com o solvente, com o peptídeo e com o metal. Pela dinâmica molecular realizada o diedro $\delta 2$ é o mais flexível com amplitude de 240° , indicando ampla possibilidade de ancoramento do INHHQ no peptídeo. Não foram observadas conversões entre as espécies na dinâmica realizada com o campo de força GAFF, exceto aquelas que diferem somente por $\delta 2$.

Em relação ao envolvimento do zinco, as reações de complexação fornecem um indicativo da estabilidade do complexo $[Zn(H_2L)(H_2O)_2]^{2+}$ com energia de formação $\Delta G^{MP2/CSB} = -14,335 \text{ kcal mol}^{-1}$, a espécie mais estável, sendo a ionização total do ligante improvável. Tendo em vista que propor um mecanismo envolve conhecer as propriedades de algumas espécies, a partir das energias relativas entre os complexos **1-4**, é possível considerar que ocorra uma ionização do ligante após a coordenação ao metal na estrutura do peptídeo. Esse processo pode facilitar a formação de ligação multidentada do ligante, direcionando a reação para a liberação do metal.

Nas simulações de dinâmica com o monômero ZnAb, o ligante aparece interagindo principalmente com a região hidrofóbica a maior parte do tempo. Não são formadas ligações de hidrogênios entre ligante e o peptídeo por tempo significativo (Gráfico A.2), o que mostra que as interações π -stacking e interação hidrofóbica são as duas interações mandatórias entre

ligante e peptídeo. Sua mobilidade verificada com $\delta 2$ também permite que o ligante adote diferentes modos de interação, chegando a ficar docado ou parcialmente docado tanto no monômero quanto no dímero do peptídeo. A aproximação do ligante ao sítio metálico no dímero parece se basear nas interações citadas, o que foi verificado pela sua posição relativa ao longo das trajetórias de **md_02-3** e **MD_02-3** (Figura 31, Figura A.4 e Figura A.5). No dímero a região hidrofóbica do peptídeo se mantém bastante conservada e o ligante não chega a penetrar na interface entre os monômeros. Entretanto, a mobilidade acentuada de Ab₁₋₄₀ foi observada tanto nas simulações com INHHQ não ligado quanto nas dinâmicas do aduto, acentuando o valor de RMSD em todos os casos.

Com base nas reações propostas para o mecanismo, a etapa determinante é definida pela formação do aduto, com entrada do INHHQ na esfera de coordenação do zinco. A energia $\Delta G^{SP}(\mathbf{zm}) = +13,607 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta G^{SP}(\mathbf{ZM}) = +23,871 \text{ kcal mol}^{-1}$ tem grande contribuição da parte entrópica ($-T\Delta S$), em ambos modelos, e eletrônica para acomodação do ligante (Figura 38A) em **ZM**. As energias envolvidas na transferência de próton são pequenas e quando considerados junto com a saída da His6 (Tabela 17) acabam favorecendo o avanço da reação. Por fim, a etapa **8** de formação do complexo livre também se mostrou uma reação espontânea e, para ambos os modelos **zm** e **ZM**, a reação global tem energia livre de Gibbs da ordem de 10 kcal mol^{-1} . Esse se mostra um valor interessante, considerando as aproximações feitas com modelo, como remoção dos aminoácidos laterais e não ter sido avaliado o envolvimento de outras moléculas de água do meio. Apesar de não ter sido considerada a formação de uma espécie coordenada a uma única histidina, His13 ou His14, a magnitude das energias nas etapas permite compreender a termodinâmica do mecanismo proposto. A discussão entre qual das duas histidinas teria maior papel pode ter relação mais dependente da dinâmica do sistema, que não foi observado ser diferente, que do modo de coordenação via N ϵ em His13 ou N δ em His14. Em relação à proposta de reação, uma forma de ampliar os resultados se daria pelo estudo de outros modelos envolvendo o zinco coordenado ao peptídeo, visto que o zinco aparece coordenado em diferentes formas no monômero e em dímeros (Tabela 7). Em todo caso, o estudo envolvendo a hipótese metálica e hipótese amiloide deve ser continuamente realizado, promovendo contínua discussão acerca do seu papel na doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

ABRAZ. Associação Brasileira de Alzheimer. Disponível em: <<http://abraz.org.br/web/>>. Acesso em: 23 maio 2019.

ADDISON, Anthony W. et al. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, [s.l.], n. 7, p.1349-1356, 1984. **Royal Society of Chemistry (RSC)**. <http://dx.doi.org/10.1039/dt9840001349>.

ALIES, Bruno et al. Zinc(II) Binding Site to the Amyloid- β Peptide: Insights from Spectroscopic Studies with a Wide Series of Modified Peptides. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 20, p.10499-10509, 26 set. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01733>.

ALIES, Bruno; HUREAU, Christelle; FALLER, Peter. The role of metal ions in amyloid formation: general principles from model peptides. *Metallomics*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.183-192, 2013. **Royal Society of Chemistry (RSC)**. <http://dx.doi.org/10.1039/c3mt20219d>.

ALÍ-TORRES, Jorge et al. 3D Structures and Redox Potentials of Cu^{2+} - $\text{A}\beta(1-16)$ Complexes at Different pH: A Computational Study. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 118, n. 18, p.4840-4850, 28 abr. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp5019718>.

ALÍ-TORRES, Jorge et al. Structures and Stabilities of $\text{Fe}^{2+/3+}$ Complexes Relevant to Alzheimer's Disease: An ab Initio Study. **The Journal Of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 115, n. 45, p.12523-12530, 17 nov. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp2026626>.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2019. Disponível em: <<https://www.alz.org/>>. Acesso em: 23 maio 2019.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. 2019. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/>>. Acesso em: 23 maio 2019.

ARFKEN, G. B. & WEBER, H. J. **Mathematical methods for physicists**. Academic Press, 3ed., 1985.

BAREGGI, Silvio R.; CORNELLI, Umberto. Cloquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.41-46, 27 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00231.x>.

BECKE, Axel D.. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 98, n. 7, p.5648-5652, abr. 1993. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.464913>.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 81, n. 8, p.3684-3690, 15 out. 1984. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.448118>.

BONDI, Mark W.; EDMONDS, Emily C.; SALMON, David P.. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. **Journal Of The International Neuropsychological Society**, [s.l.], v. 23, n. 9-10, p.818-831, out. 2017. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s135561771700100x>.

BRANCH, Thomas et al. Kinetic Analysis Reveals the Identity of A β -Metal Complex Responsible for the Initial Aggregation of A β in the Synapse. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.1970-1979, 29 jun. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00121>.

BRAYMER, Joseph J. et al. Development of Bifunctional Stilbene Derivatives for Targeting and Modulating Metal-Amyloid- β Species. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 21, p.10724-10734, 7 nov. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic2012205>.

BRENEMAN, Curt M.; WIBERG, Kenneth B.. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.361-373, abr. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540110311>.

CAMAIONI, Donald M.; SCHWERDTFEGER, Christine A.. Comment on "Accurate Experimental Values for the Free Energies of Hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺". **The Journal Of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 109, n. 47, p.10795-10797, dez. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp054088k>.

CHASSEIGNEAUX, Stéphanie; ALLINQUANT, Bernadette. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 120, p.99-108, 7 dez. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x>.

CHEN, Guo-fang et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.1205-1235, 17 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.28>.

CHITI, Fabrizio; DOBSON, Christopher M.. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.333-366, jun. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.

CINO, Elio A.; CHOY, Wing-yiu; KARTTUNEN, Mikko. Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.2725-2740, 26 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct300323g>.

COSKUNER, Orkid. Divalent copper ion bound amyloid- β (40) and amyloid- β (42) alloforms are less preferred than divalent zinc ion bound amyloid- β (40) and amyloid- β (42) alloforms. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.957-973, 22 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-016-1392-5>.

CUKIERMAN, Daphne S. et al. Aroylhydrazones constitute a promising class of 'metal-protein attenuating compounds' for the treatment of Alzheimer's disease: a proof-of-concept based on the study of the interactions between zinc(II) and pyridine-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.1227-1241, 25 ago. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-018-1606-0>.

CUKIERMAN, Daphne Schneider et al. A moderate metal-binding hydrazone meets the criteria for a bioinorganic approach towards Parkinson's disease: Therapeutic potential, blood-brain barrier crossing evaluation and preliminary toxicological studies. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 170, p.160-168, maio 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.02.020>.

D.A. CASE, R.M. BETZ, D.S. CERUTTI, T.E. CHEATHAM, III, T.A. DARDEN, R.E. DUKE, T.J. GIESE, H. GOHLKE, A.W. GOETZ, N. HOMEYER, S. IZADI, P. JANOWSKI, J. KAUS, A. KOVALENKO, T.S. LEE, S. LEGRAND, P. LI, C. LIN, T. LUCHKO, R. LUO, B. MADEJ, D. MERMELSTEIN, K.M. MERZ, G. MONARD, H. NGUYEN, H.T. NGUYEN, I. OMELYN, A. ONUFRIEV, D.R. ROE, A. ROITBERG, C. SAGUI, C.L. SIMMERLING, W.M. BOTELLO-SMITH, J. SWAILS, R.C. WALKER, J. WANG, R.M. WOLF, X. WU, L. XIAO AND P.A. KOLLMAN (2016), Amber 2016, University of California, San Francisco.

DANIELSSON, Jens et al. High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid β -peptide. **Febs Journal**, [s.l.], v. 274, n. 1, p.46-59, 20 nov. 2006.

Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05563.x>.

DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 98, n. 12, p.10089-10092, 15 jun. 1993. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.464397>.

DERAEVE, Céline et al. Preparation and Study of New Poly-8-Hydroxyquinoline Chelators for an anti-Alzheimer Strategy. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.682-696, 7 jan. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200701024>

DOIG, Andrew J. et al. Why Is Research on Amyloid- β Failing to Give New Drugs for Alzheimer's Disease? **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1435-1437, 6 jun. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00188>.

FALCO, Anna de et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, [s.l.], p.63-80, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>.

FALLER, Peter; HUREAU, Christelle. Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. **Dalton Trans.**, [s.l.], n. 7, p.1080-1094, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b813398k>.

FISH, Paul V. et al. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.125-133, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>.

FREITAS, Leonardo V. de et al. Synthesis and structural characterization of a 8-hydroxyquinoline derivative coordinated to Zn(II). **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1169, p.119-129, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.050>

FREITAS, Leonardo Viana de et al. Structural and vibrational study of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone – A potential metal-protein attenuating compound (MPAC) for the treatment of Alzheimer's disease. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 116, p.41-48, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.105>.

FREITAS, Leonardo Viana de. **Ligantes derivados de isoniazida e sua coordenação aos íons Cu(II) e Zn(II): potenciais Compostos Atenuantes da Interação Metal-Proteína (MPACs) na terapia da doença de Alzheimer**. 2014. 164 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Puc-rio, Rio de Janeiro, 2014.

FURLAN, Sara; LAPENNA, Giovanni. Modeling of the Zn²⁺ binding in the 1–16 region of the amyloid β peptide involved in Alzheimer's disease. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 11, n. 30, p.6468-6481, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b822771c>.

GAGGELLI, Elena et al. NMR Studies of the Zn²⁺ Interactions with Rat and Human β -Amyloid (1–28) Peptides in Water-Micelle Environment. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 112, n. 1, p.100-109, jan. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp075168m>.

GAUSSIAN 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

GOMES, Luiza M.f. et al. 8-Hydroxyquinoline Schiff-base compounds as antioxidants and modulators of copper-mediated A β peptide aggregation. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 139, p.106-116, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.04.011>.

HAMLEY, I. W.. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 112, n. 10, p.5147-5192, 19 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr3000994>.

HAN, Xu; HE, Gefei. Toward a Rational Design to Regulate β -Amyloid Fibrillation for Alzheimer's Disease Treatment. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.198-210, 3 jan. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00477>.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Disruption of zinc and copper interactions with A β (1–40) by a non-toxic, isoniazid-derived, hydrazone: a novel biometal homeostasis restoring agent in Alzheimer's disease therapy?. **Metallomics**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.743-747, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5mt00003c>.

HAWKINS, Gregory D.; CRAMER, Christopher J.; TRUHLAR, Donald G.. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. **Chemical Physics Letters**, [s.l.], v. 246, n. 1-2, p.122-129, nov. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(95\)01082-k](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(95)01082-k).

HAWKINS, Gregory D.; CRAMER, Christopher J.; TRUHLAR, Donald G.. Parametrized Models of Aqueous Free Energies of Solvation Based on Pairwise Descreening of Solute Atomic Charges from a Dielectric Medium. **The Journal Of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 100, n. 51, p.19824-19839, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp961710n>.

HESTENES, M.r.; STIEFEL, E.. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. **Journal Of Research Of The National Bureau Of Standards**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.409-435, dez. 1952. National Institute of Standards and Technology (NIST). <http://dx.doi.org/10.6028/jres.049.044>.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal Of Molecular Graphics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.33-38, fev. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

ILIE, Ioana M.; CAFLISCH, Amedeo. Simulation Studies of Amyloidogenic Polypeptides and Their Aggregates. **Chemical Reviews**, [s.l.], p.1-38, 11 abr. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00731>.

INSTITUTO ALZHEIMER BRASIL. 2019. Disponível em: <<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br>>. Acesso em: 23 maio 2019.

ISTRATE, Andrey N. et al. Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease A β peptide governs its Zn-induced oligomerization. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-14, 22 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21734>.

ISTRATE, Andrey n. et al. NMR Solution Structure of Rat A β (1–16): Toward Understanding the Mechanism of Rats' Resistance to Alzheimer's Disease. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.136-143, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4006>.

JORGENSEN, William L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 79, n. 2, p.926-935, 15 jul. 1983. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.445869>.

KAMETANI, Fuyuki; HASEGAWA, Masato. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Frontiers In Neuroscience**, [s.l.], v. 12, p.1-11, 30 jan. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>.

KE, Pu Chun et al. Implications of peptide assemblies in amyloid diseases. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 21, p.6492-6531, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7cs00372b>.

KEPP, Kasper P.. Alzheimer's disease: How metal ions define β -amyloid function. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 351, p.127-159, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.007>.

LAITAOJA, Mikko; VALJAKKA, Jarkko; JÄNIS, Janne. Zinc Coordination Spheres in Protein Structures. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 19, p.10983-10991, 7 out. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic401072d>

- ALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L.. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 234, n. 3, p.779-815, dez. 1993. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.
- LEE, Chengteh; YANG, Weitao; PARR, Robert G.. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.785-789, 15 jan. 1988. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevb.37.785>.
- LEE, Shin Jung C. et al. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.310-323, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6cs00731g>.
- LEVINE, Ira N. **Quantum Chemistry**. 7. ed. New York: Pearson, 2014. 714 p.
- LEWARS, Errol G. **Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics**. 2. ed. Peterborough: Springer, 2011. 681 p.
- LI, Li et al. Synthesis and structural characterization of zinc(II) and cobalt(II) complexes based on multidentate hydrazone ligands. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1110, p.180-184, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.01.051>.
- LI, Wenfei et al. Effects of Zinc Binding on the Conformational Distribution of the Amyloid- β Peptide Based on Molecular Dynamics Simulations. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 111, n. 49, p.13814-13821, dez. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp076213t>.
- LINCOFF, James; SASMAL, Sukanya; HEAD-GORDON, Teresa. The combined force field-sampling problem in simulations of disordered amyloid- β peptides. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 150, n. 10, p.104108-104108, 14 mar. 2019. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.5078615>.
- LIU, Yong-chun; YANG, Zheng-yin. Crystal structures, antioxidation and DNA binding properties of Yb(III) complexes with Schiff-base ligands derived from 8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde and four aroylhydrazines. **Biometals**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.733-751, 25 fev. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-009-9221-8>.
- LIU, Yong-chun; YANG, Zheng-yin. Crystal structures, antioxidation and DNA binding properties of Eu(III) complexes with Schiff-base ligands derived from 8-hydroxyquinoline-2-carboxyaldehyde and three aroylhydrazines. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 103, n. 7, p.1014-1022, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.04.013>.
- LIU, Yong-chun; YANG, Zheng-yin. Synthesis, crystal structure, antioxidation and DNA binding properties of binuclear Ho(III) complexes of Schiff-base ligands derived from 8-hydroxyquinoline-2-carboxyaldehyde and four aroylhydrazines. **Journal Of Organometallic Chemistry**, [s.l.], v. 694, n. 19, p.3091-3101, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2009.05.031>.
- MA, Kan et al. Residue-Specific pKa Measurements of the β -Peptide and Mechanism of pH-Induced Amyloid Formation. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 121, n.

38, p.8698-8706, set. 1999. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/ja990864o>.

MAIER, James A. et al. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.3696-3713, 23 jul. 2015. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.

MARCO-CONTELLES, José. Facts, Results, and Perspectives of the Current Alzheimer's Disease Research. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.1127-1128, fev. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00034>.

MARDIROSSIAN, Narbe; HEAD-GORDON, Martin. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: an overview and extensive assessment of 200 density functionals. **Molecular Physics**, [s.l.], v. 115, n. 19, p.2315-2372, 21 jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00268976.2017.1333644>.

MARENICH, Aleksandr V.; CRAMER, Christopher J.; TRUHLAR, Donald G.. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 113, n. 18, p.6378-6396, 7 maio 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp810292n>.

MARINO, T. et al. On the metal ion (Zn²⁺, Cu²⁺) coordination with beta-amyloid peptide: DFT computational study. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.57-69, 28 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12539-010-0086-x>.

MARTIN, Tye D. et al. Computational Study of the Driving Forces and Dynamics of Curcumin Binding to Amyloid- β Protofibrils. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 123, n. 3, p.551-560, 20 dez. 2018. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b09185>

MATTHES, Dirk et al. Resolving the Atomistic Modes of Anle138b Inhibitory Action on Peptide Oligomer Formation. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.2791-2808, 28 set. 2017. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00325>.

MEKMOUCHE, Yasmina et al. Characterization of the ZnII Binding to the Peptide Amyloid- β 1-16 linked to Alzheimer's Disease. **Chembiochem**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.1663-1671, 3 ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200500057>.

MIGLIORINI, Caterina et al. Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 256, n. 1-2, p.352-368, jan. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.004>.

MIGLIORINI, Caterina et al. Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 256, n. 1-2, p.352-368, jan. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.004>.

MOT, Alexandra I et al. Metal attenuating therapies in neurodegenerative disease. **Expert Review Of Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.1717-1745, dez. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/ern.11.170>.

MUNOZ-PAEZ, Adela; PAPPALARDO, Rafael R.; MARCOS, Enrique Sanchez. Determination of the Second Hydration Shell of Cr³⁺ and Zn²⁺ in Aqueous Solutions by Extended X-ray Absorption Fine Structure. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 117, n. 47, p.11710-11720, nov. 1995. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja00152a012>.

NOVATO, Willian T.g. et al. Reaction between the Pt(II)-complexes and the amino acids of the β -amyloid peptide. **Chemical Physics Letters**, [s.l.], v. 667, p.4-8, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2016.11.025>.

PIETROPAOLO, Adriana et al. Different zinc(II) complex species and binding modes at A β N-terminus drive distinct long range cross-talks in the A β monomers. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 153, p.367-376, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.013>.

POLSHAKOV, Vladimir I. et al. A Binuclear Zinc Interaction Fold Discovered in the Homodimer of Alzheimer's Amyloid- β Fragment with Taiwanese Mutation D7H. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 56, n. 39, p.11734-11739, 27 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201704615>.

RAFFA, Duilio F.; RAUK, Arvi. Molecular Dynamics Study of the Beta Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease and Its Divalent Copper Complexes. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 111, n. 14, p.3789-3799, abr. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp0689621>.

RAJASEKHAR, K.; GOVINDARAJU, Thimmaiah. Current progress, challenges and future prospects of diagnostic and therapeutic interventions in Alzheimer's disease. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 8, n. 42, p.23780-23804, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8ra03620a>.

RANA, Monika; SHARMA, Anuj Kumar. Cu and Zn interactions with A β peptides: consequence of coordination on aggregation and formation of neurotoxic soluble A β oligomers. **Metalomics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.64-84, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8mt00203g>.

REZAEI-GHALEH, Nasrollah et al. Effect of Zinc Binding on β -Amyloid Structure and Dynamics: Implications for A β Aggregation. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 101, n. 5, p.1202-1211, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.062>.

RIMOLA, Albert et al. Ab Initio Design of Chelating Ligands Relevant to Alzheimer's Disease: Influence of Metalloaromaticity. **The Journal Of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 115, n. 45, p.12659-12666, 17 nov. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp203465h>.

RITCHIE, Craig W; BUSH, Ashley I; MASTERS, Colin L. Metal-protein attenuating compounds and Alzheimer's disease. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1585-1592, dez. 2004. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.13.12.1585>.

ROBERTS, Blaine R. et al. The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 120, p.149-166, 28 nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07500.x>.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, Luis et al. Coordination properties of a metal chelator clioquinol to Zn²⁺ studied by static DFT and ab initio molecular dynamics. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 17, n. 20, p.13582-13589, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5cp01615k>.

ROE, Daniel R.; CHEATHAM, Thomas E.. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.3084-3095, 25 jun. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct400341p>.

RUDOLPH, Wolfram W.; PYE, Cory C.. Zinc(II) hydration in aqueous solution. A Raman spectroscopic investigation and an ab-initio molecular orbital study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 1, n. 19, p.4583-4593, 1999. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/a904051j>.

RYCKAERT, Jean-paul; CICCOTTI, Giovanni; BERENDSEN, Herman J.c. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal Of Computational Physics**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.327-341, mar. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).

SAMPSON, Elizabeth L; JENAGARATNAM, Lydia; MCSHANE, Rupert. Metal protein attenuating compounds for the treatment of Alzheimer's dementia. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [s.l.], p.1-23, 21 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd005380.pub5>.

SAVELIEFF, Masha G. et al. Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 119, n. 2, p.1221-1322, 10 ago. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00138>.

SEMINARIO, Jorge M. Calculation of intramolecular force fields from second-derivative tensors. **International Journal Of Quantum Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 7, p.1271-1277, 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-461x\(1996\)60:73.0.co;2-w](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-461x(1996)60:73.0.co;2-w).

SHI, Hu; KANG, Baotao; LEE, Jin Yong. Zn²⁺ Effect on Structure and Residual Hydrophobicity of Amyloid β -Peptide Monomers. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 118, n. 35, p.10355-10361, 22 ago. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp504779m>.

SHIELDS, George C.; SEYBOLD, Paul G.. **Computational Approaches for The Prediction of pKa values**. New York: Crc Press, 2009. 164 p.

SOMAVARAPU, Arun Kumar; KEPP, Kasper P.. The Dependence of Amyloid- β Dynamics on Protein Force Fields and Water Models. **Chemphyschem**, [s.l.], v. 16, n. 15, p.3278-3289, 19 ago. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201500415>.

SOUSA, Sérgio F. et al. Comparative analysis of the performance of commonly available density functionals in the determination of geometrical parameters for zinc complexes. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 16, p.2752-2763, dez. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21304>.

STRODEL, Birgit; COSKUNER-WEBER, Orkid. Transition Metal Ion Interactions with Disordered Amyloid- β Peptides in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Insights from Computational Chemistry Studies. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [s.l.], v. 59, n. 5, p.1782-1805, abr. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00983>.

SYME, Christopher D.; VILES, John H.. Solution ^1H NMR investigation of Zn^{2+} and Cd^{2+} binding to amyloid-beta peptide ($\text{A}\beta$) of Alzheimer's disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1764, n. 2, p.246-256, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.09.012>.

UBERUAGA, Blas P.; ANGHEL, Marian; VOTER, Arthur F.. Synchronization of trajectories in canonical molecular-dynamics simulations: Observation, explanation, and exploitation. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 120, n. 14, p.6363-6374, 8 abr. 2004. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1667473>.

VAIRA, Massimo di et al. Clioquinol, a Drug for Alzheimer's Disease Specifically Interfering with Brain Metal Metabolism: Structural Characterization of Its Zinc(II) and Copper(II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 43, n. 13, p.3795-3797, jun. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic0494051>

VIEGAS, Flávia P. D. et al. Alzheimer's Disease: Characterization, Evolution and Implications of the Neuroinflammatory Process. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.286-306, 2011. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20110034>.

WANG, Junmei et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 9, p.1157-1174, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20035>.

WINEMAN-FISHER, Vered; BLOCH, Daniel Nir; MILLER, Yifat. Challenges in studying the structures of metal-amyloid oligomers related to type 2 diabetes, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 327-328, p.20-26, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.010>.

XU, Liang; WANG, Xiaojuan; WANG, Xicheng. Effects of Zn^{2+} Binding on the Structural and Dynamic Properties of Amyloid B Peptide Associated with Alzheimer's Disease: Asp1 or Glu11?. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1458-1468, 13 set. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cn4001445>.

ZHENG, Suqing et al. VFFDT: A New Software for Preparing AMBER Force Field Parameters for Metal-Containing Molecular Systems. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [s.l.], v. 56, n. 4, p.811-818, 29 mar. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00687>.

ZIRAH, Séverine et al. Structural Changes of Region 1-16 of the Alzheimer Disease Amyloid β -Peptide upon Zinc Binding and *In Vitro* Aging. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v.

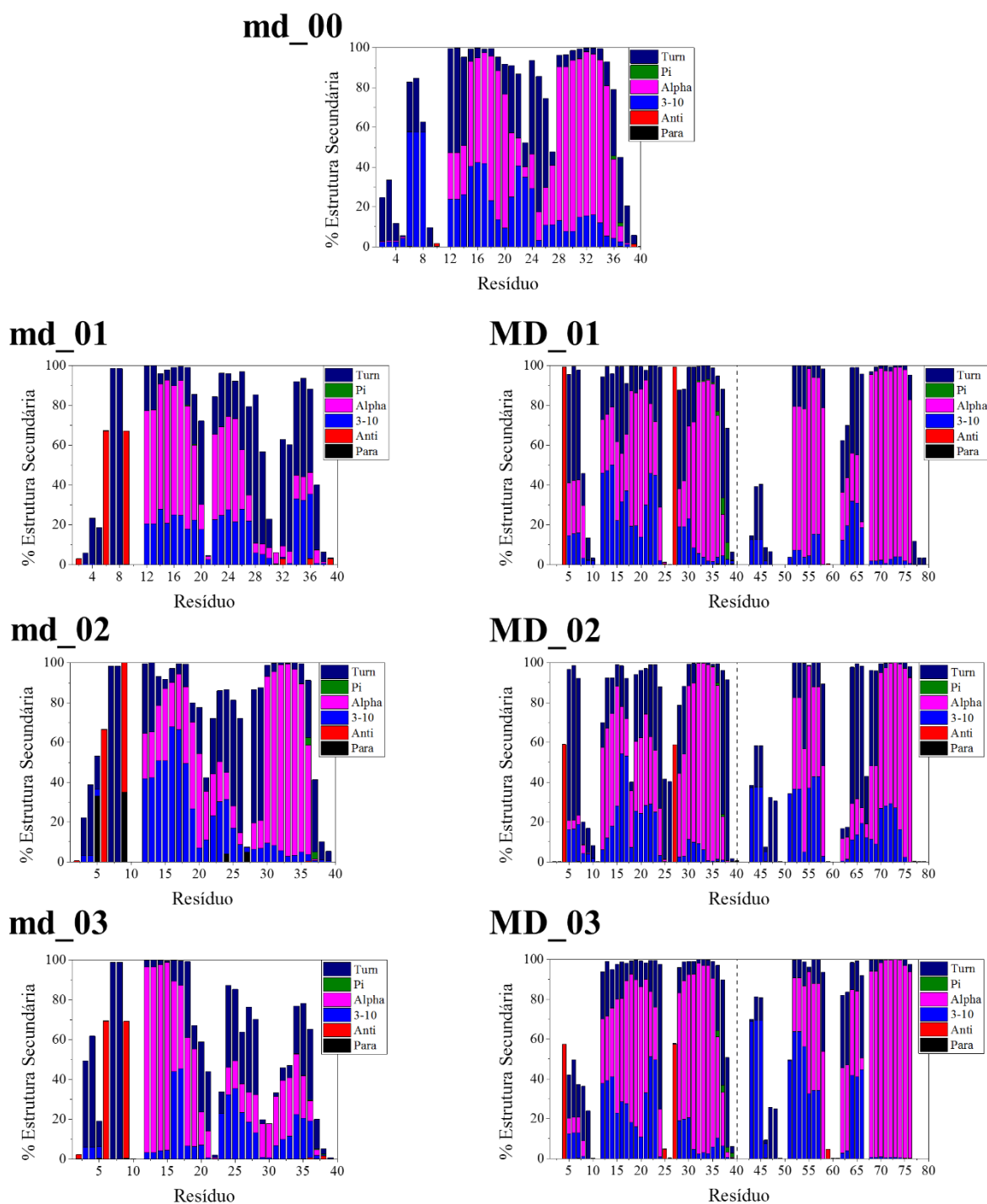
281, n. 4, p.2151-2161, 21 nov. 2005. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m504454200>.

APÊNDICE A – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DAS ANÁLISES.

Pacote CPPTRAJ (ROE; CHEATHAM, 2013)

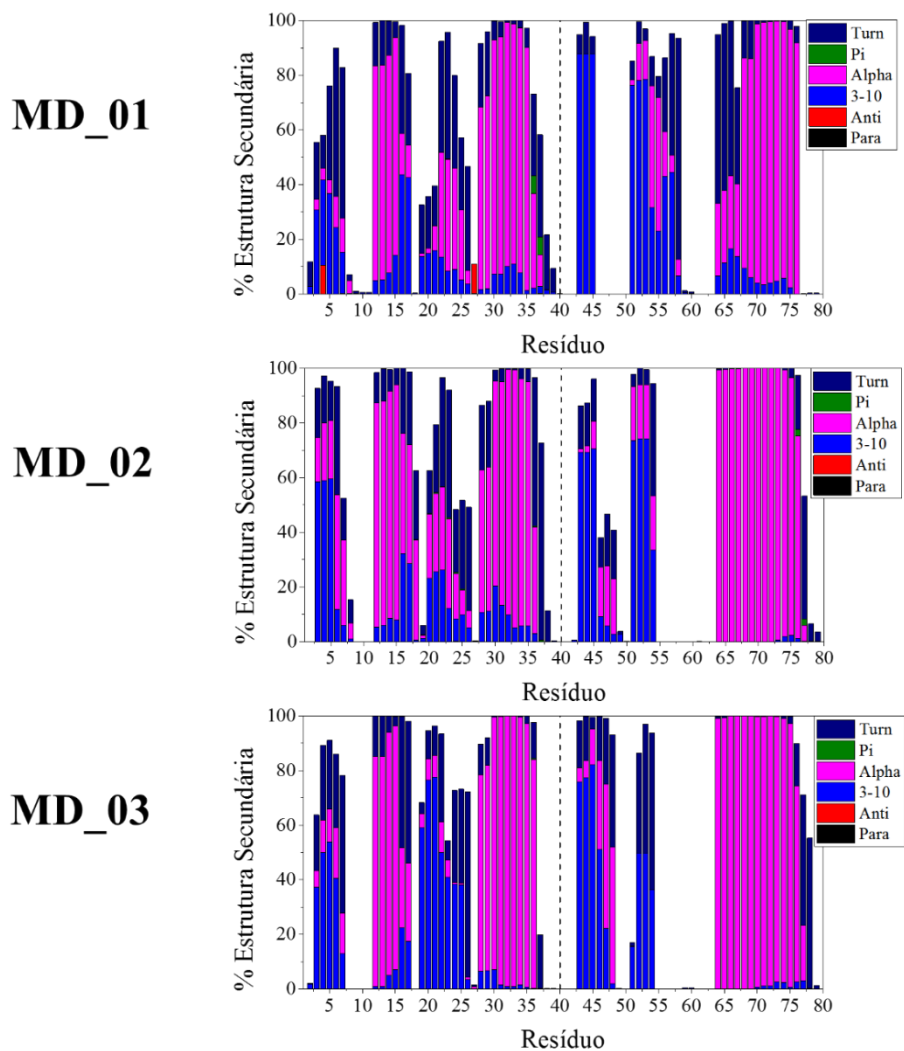
- Root mean squared deviation (RMSD) – A estrutura de referência foi definida como aquela obtida em 50 ns de simulação da etapa de produção; o desvio foi ponderado em função da massa dos átomos.
- Root mean squared fluctuation (RMSF) – Valores de flutuação avaliados em relação à estrutura média obtida por RMSD, ponderado pela massa.
- Radius of gyration (Rg) – Raio de giro calculado ponderado pela massa.
- Ligação de hidrogênio – Distância máxima de ligação de hidrogênio: 3,0 Å; ângulo máximo: 120°.
- % Estrutura Secundária (% SS) – Para: folha beta paralela; Anti: folha beta antiparalela; 3-10: hélice 3-10; Pi: hélice pi; Alpha: alfa hélice; Turn: turn. As definições estruturais usadas para calcular a estrutura secundária seguem o *Dictionary of Protein Secondary Structure (DSSP)*.
- Número de contatos – Foi definido um raio de corte de 5,0 Å para a contagem do número de contatos. A contagem é iniciada definindo duas máscaras <mask1> e <mask2>. Para o cada átomo de <mask1> é feito a contagem do número de átomos de <mask2> dentro do raio de corte de 5,0 Å. A soma dos valores obtidos para cada átomo de <mask1> representa o número de contatos entre <mask1> e <mask2>. O número de contatos não especifica se há qualquer tipo de interação entre as máscaras definidas.

Figura A.1 – Estrutura secundária calculada para todas as simulações envolvendo INHHQ não coordenado ao peptídeo.

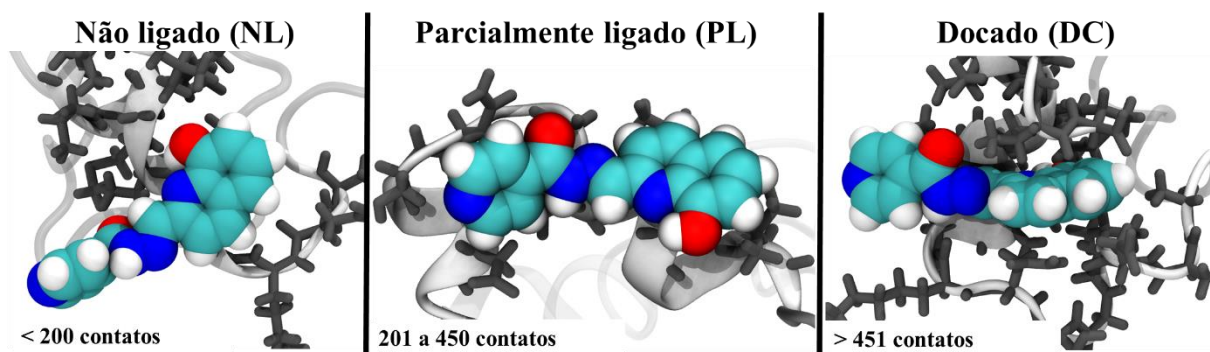


Fonte: Elaborado pelo autor.

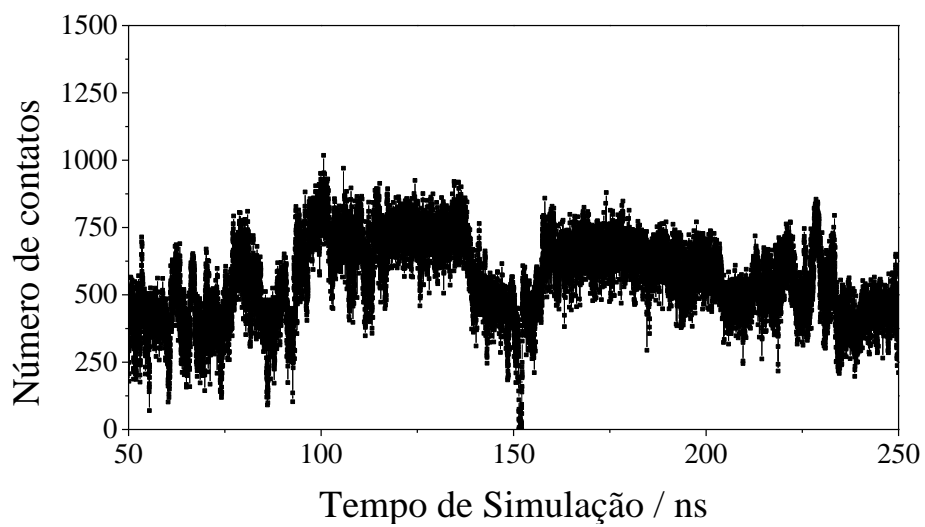
Figura A.2 – Estrutura secundária calculada para todas as simulações envolvendo INHHQ coordenado ao peptídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

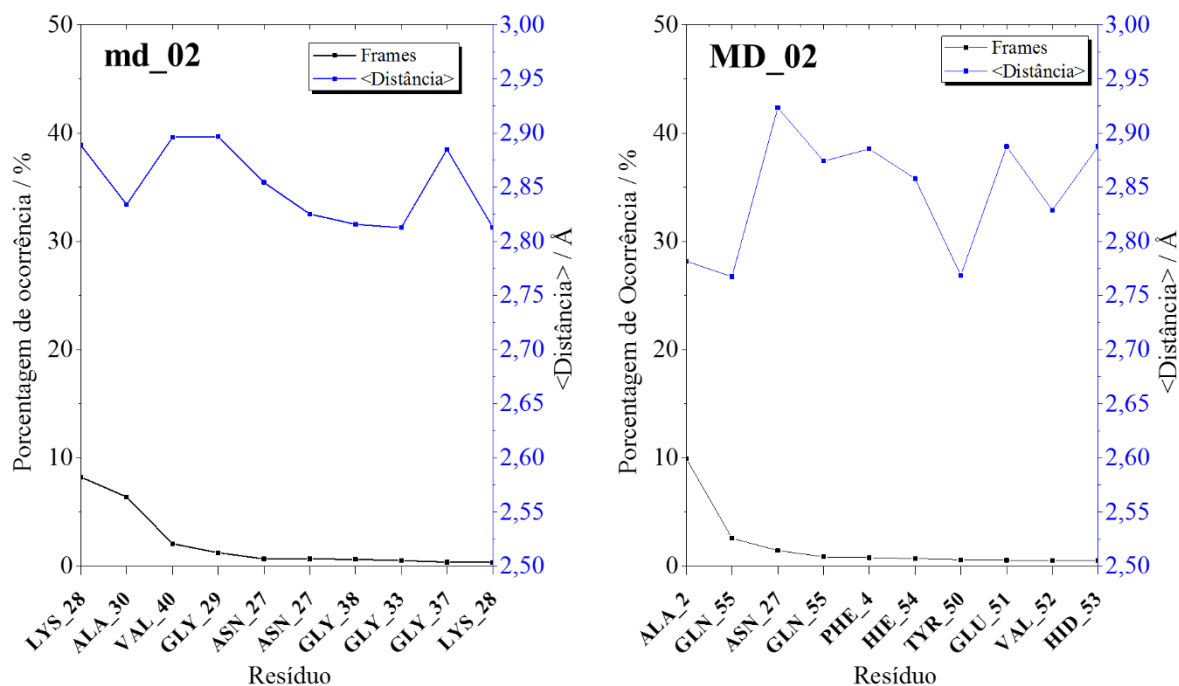
Figura A.3 – Modos de Interação **md_02** H₂L-AB.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico A.1 – Número de contatos entre H₂L e Ab em **md_02**

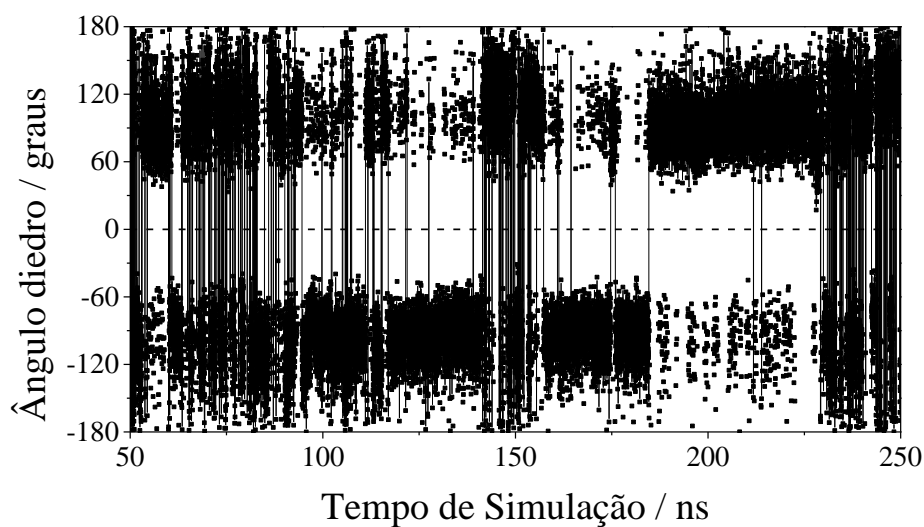
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico A.2– As dez ligações de hidrogênio entre H₂L e ZnAb com maior ocorrência de um total de 20.000 (**md_02**) e 40.000 (**MD_02**) frames.



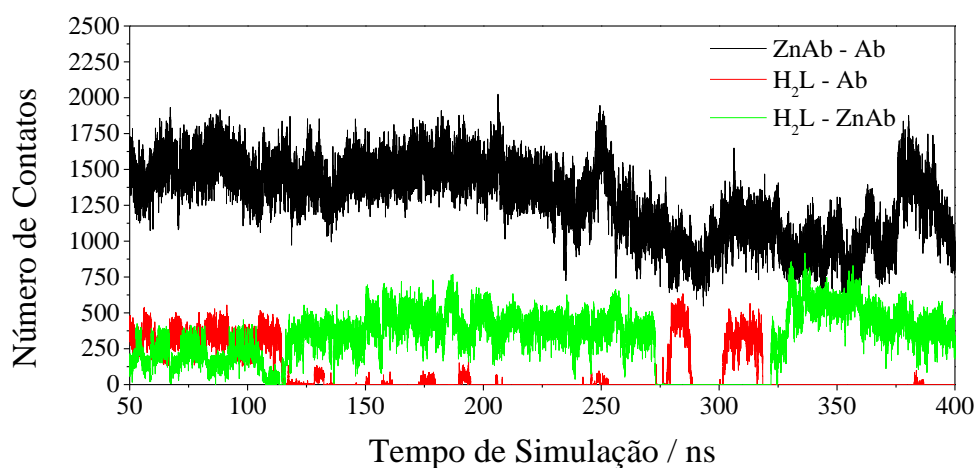
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico A.3 – Variação do diedro $\delta 2$ do INHHQ na simulação **md_02**.



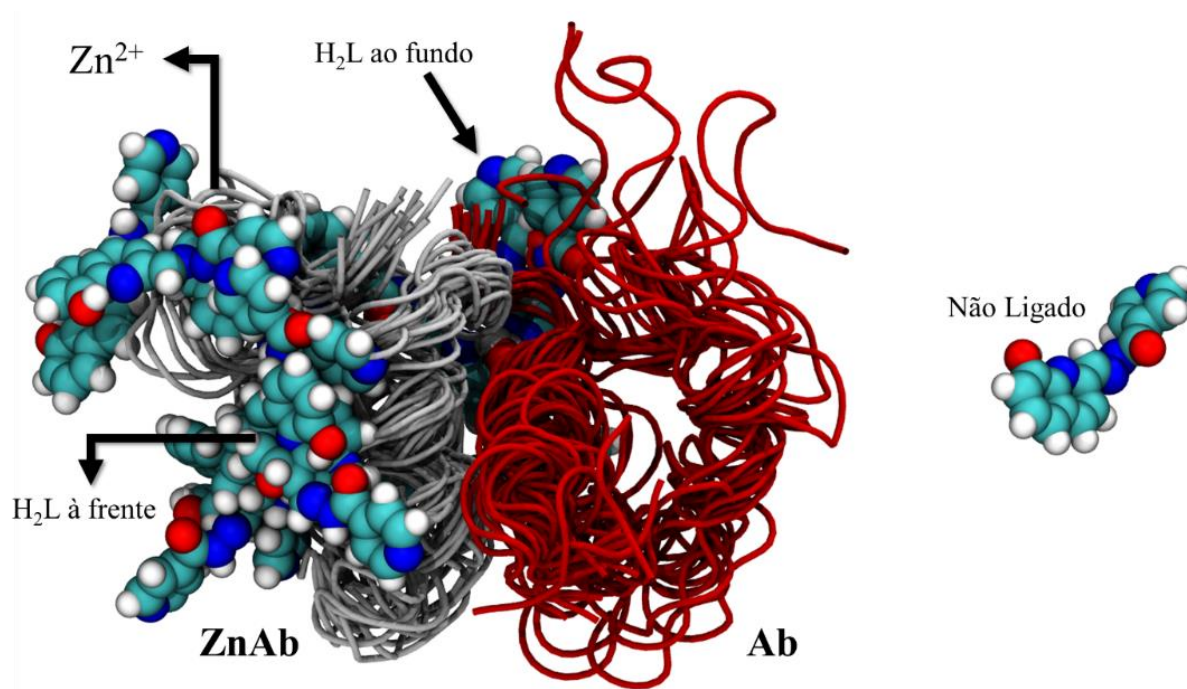
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico A.4 – Número de contatos entre o ligante INHHQ e cada peptídeo do dímero em MD_02.



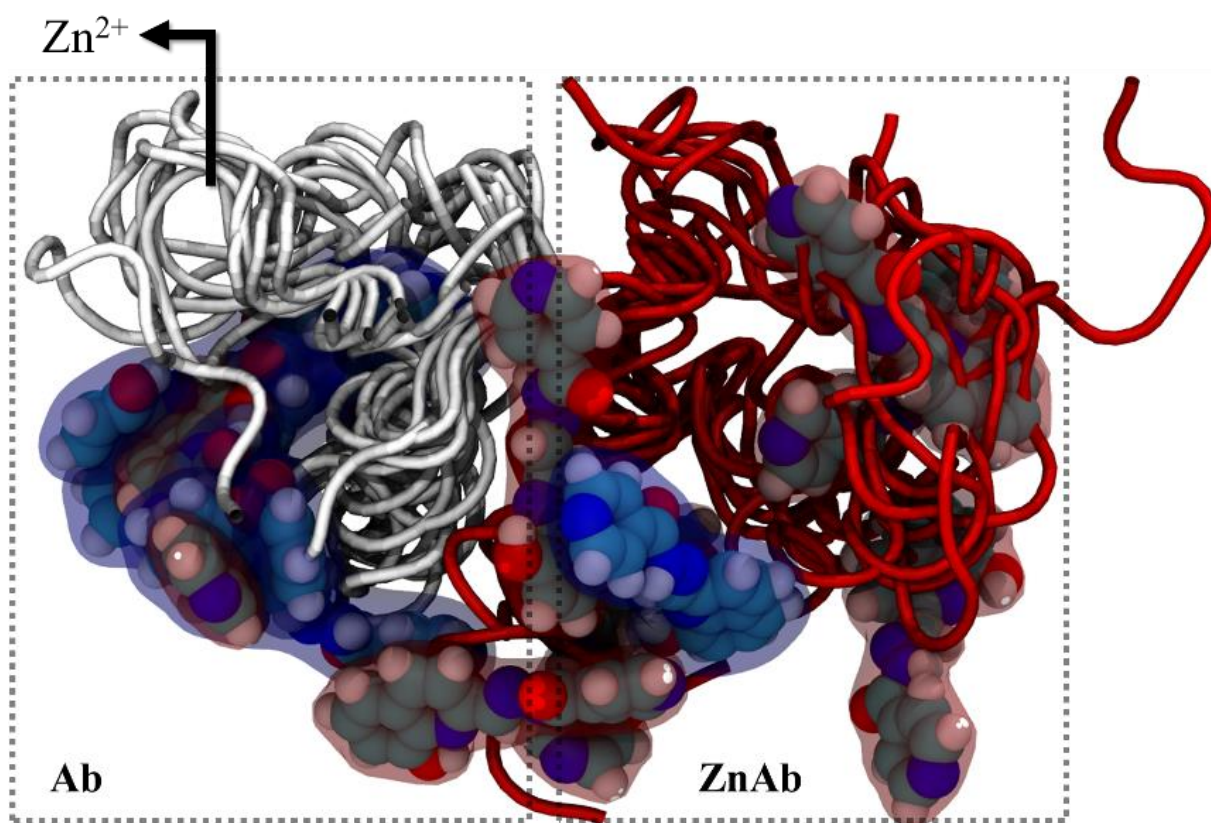
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.4 – Sobreposição de 16 estruturas ao longo de 400 ns de simulação de MD_02.



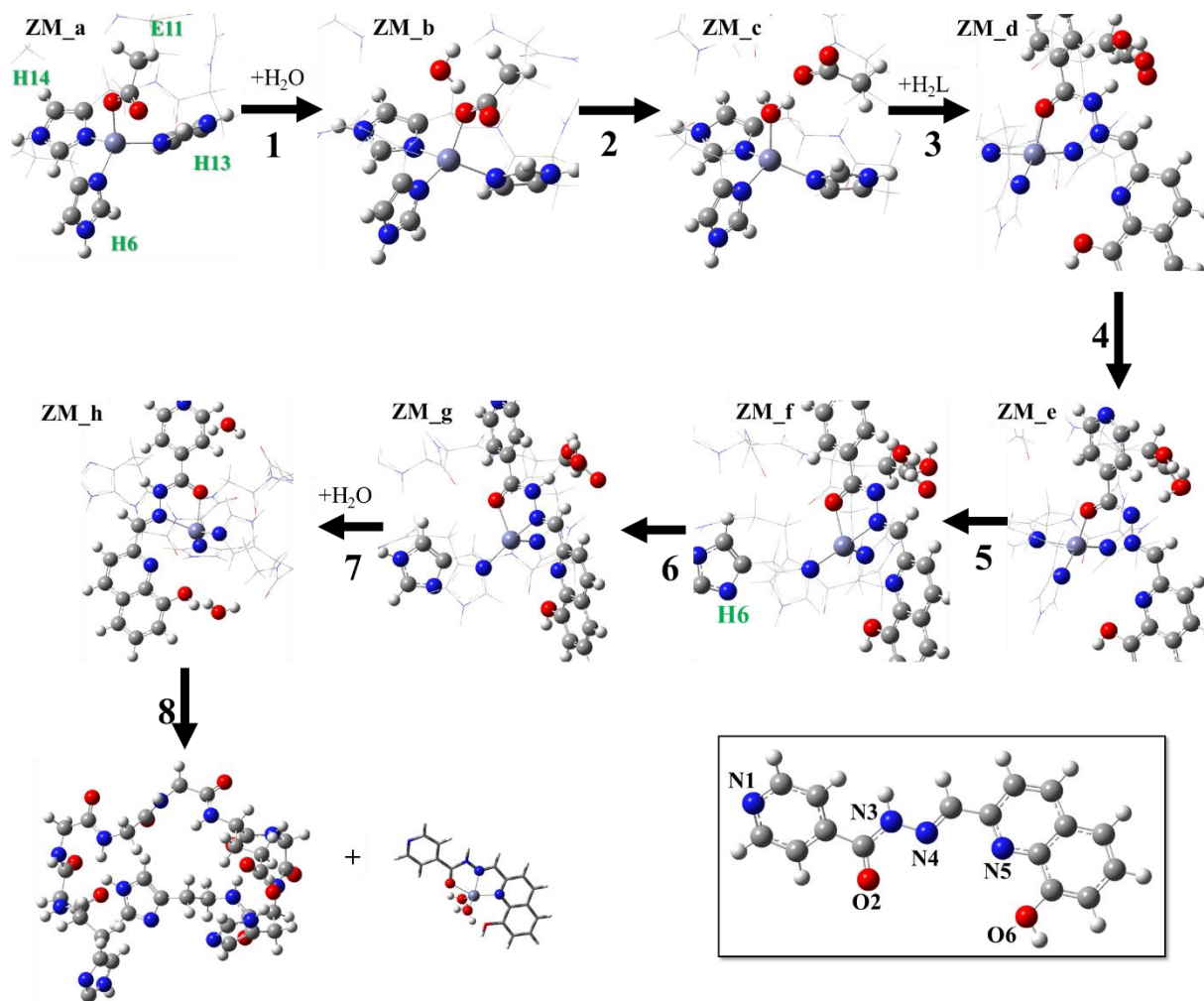
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.5– Sobreposição de 7 estruturas do modelo **MD_03** indicando a posição relativa do ligante H_2L próximo à cada estrutura.



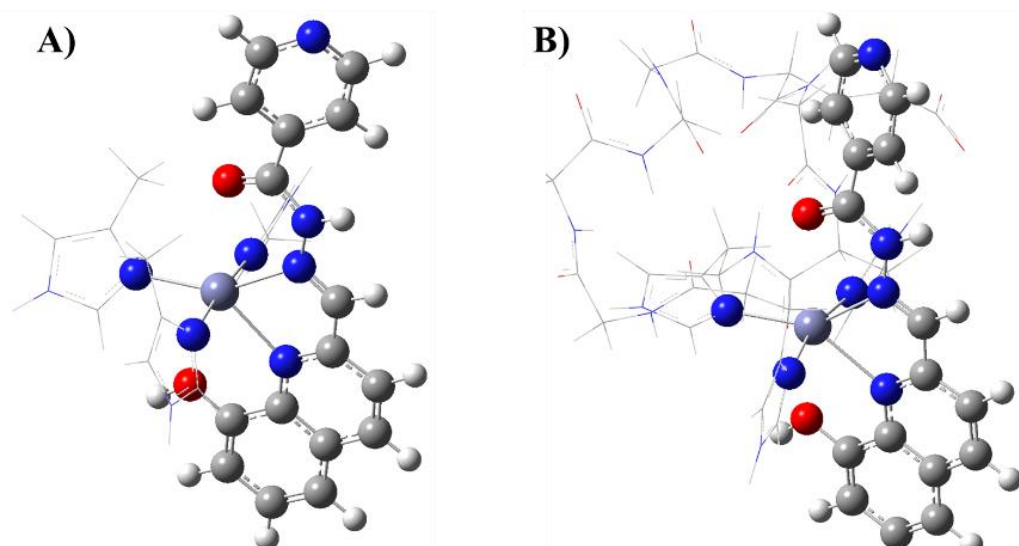
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.6 – Caminho de reação proposto com modelo **ZM**. O destaque é feito para os fragmentos mais importantes do sistema.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.7 – Ligante coordenado no modo N^N em A) modelo **zm** e B) modelo **ZM**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.1 – Dados estruturais do modelo **zm**.

Ligação / Å	zm_a	zm_b	zm_c *
Zn - H6	2,091	2,077	2,082
Zn - H13	2,082	2,082	2,069
Zn - H14	2,075	2,105	2,087
Zn - E11	2,023	2,020	2,088
Zn - O2	-	-	-
Zn - N4	-	-	-
Zn - N5	-	-	-
Zn - O6	-	-	-
Ângulo de ligação / graus			
H6 - Zn - H13	103,99	109,85	121,13
H6 - Zn - H14	105,35	101,17	101,28
H6 - Zn - E11	114,76	117,19	113,11
E11 - Zn - H13	117,32	111,36	99,65
E11 - Zn - H14	108,86	111,87	111,57
H13 - Zn - H14	105,56	104,24	110,42
H6 - Zn - O2	-	-	-
O2 - Zn - N4	-	-	-
O2 - Zn - H13	-	-	-
O2 - Zn - H14	-	-	-
N4 - Zn - H13	-	-	-
N4 - Zn - H14	-	-	-
Zn - O2 - C	-	-	-
Zn - N4 - N	-	-	-
Zn - N4 = C	-	-	-
τ_4	0,907	0,929	0,960

*Valores atribuídos a E11 referem-se à molécula de água coordenada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.2 – Dados estruturais do modelo **zm**.

Ligação / Å	zm_d	zm_e	zm_f
Zn - H6	2,094	2,078	-
Zn - H13	2,045	2,057	2,054
Zn - H14	2,103	2,086	2,056
Zn - E11	-	-	-
Zn - O2	2,152	2,033	2,088
Zn - N4	-	-	2,161
Zn - N5	-	-	3,244
Zn - O6	-	-	3,941
Ângulo de ligação / graus			
H6 - Zn - H13	125,42	118,11	-
H6 - Zn - H14	101,88	103,84	-
H6 - Zn - E11	-	-	-
E11 - Zn - H13	-	-	-
E11 - Zn - H14	-	-	-
H13 - Zn - H14	106,83	110,74	135,52
H6 - Zn - O2	107,84	114,27	-
O2 - Zn - N4	-	-	76,49
O2 - Zn - H13	107,39	109,61	104,21
O2 - Zn - H14	105,95	98,21	106,65
N4 - Zn - H13	-	-	105,95
N4 - Zn - H14	-	-	123,36
Zn - O2 - C	145,24	141,67	112,09
Zn - N4 - N	-	-	111,98
Zn - N4 = C	-	-	133,79
τ_4	0,899	0,905	0,922

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.3 – Dados estruturais do modelo **zm**.

Ligação / Å	zm_g	zm_h
Zn - H6	-	-
Zn - H13	2,027	2,053
Zn - H14	2,037	2,016
Zn - E11	-	-
Zn - O2	2,215	2,213
Zn - N4	2,262	2,232
Zn - N5	3,263	3,250
Zn - O6	3,483	3,853
Ângulo de ligação / graus		
H6 - Zn - H13	-	-
H6 - Zn - H14	-	-
H6 - Zn - E11	-	-
E11 - Zn - H13	-	-
E11 - Zn - H14	-	-
H13 - Zn - H14	126,26	-
H6 - Zn - O2	-	-
O2 - Zn - N4	73,04	73,82
O2 - Zn - H13	105,49	103,79
O2 - Zn - H14	99,15	105,01
N4 - Zn - H13	100,51	96,23
N4 - Zn - H14	122,07	126,32
Zn - O2 - C	113,38	113,36
Zn - N4 - N	109,22	109,82
Zn - N4 = C	135,09	134,86
τ_4	0,939	0,913

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.4 – Dados estruturais do modelo **ZM**.

Ligação / Å	ZM_a	ZM_b	ZM_c *
Zn - H6	2,070	2,075	2,088
Zn - H13	2,135	2,115	2,090
Zn - H14	2,124	2,134	2,088
Zn - E11	2,011	2,030	2,054
Zn - O2	-	-	-
Zn - N4	-	-	-
Zn - N5	-	-	-
Zn - O6	-	-	-
Ângulo de ligação / graus			
H6 - Zn - H13	117,77	119,42	107,89
H6 - Zn - H14	101,71	100,82	107,33
H6 - Zn - E11	124,28	127,61	114,86
E11 - Zn - H13	97,95	94,60	112,46
E11 - Zn - H14	99,84	97,17	95,97
H13 - Zn - H14	114,59	116,26	118,19
H6 - Zn - O2	-	-	-
O2 - Zn - N4	-	-	-
O2 - Zn - H13	-	-	-
O2 - Zn - H14	-	-	-
N4 - Zn - H13	-	-	-
N4 - Zn - H14	-	-	-
Zn - O2 - C	-	-	-
Zn - N4 - N	-	-	-
Zn - N4 = C	-	-	-
τ_4	0,837	0,824	0,900

*Valores atribuídos a E11 referem-se à molécula de água coordenada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.5 – Dados estruturais do modelo **ZM**.

Ligação / Å	ZM_d	ZM_e	ZM_f
Zn - H6	2,079	2,119	-
Zn - H13	2,099	2,114	2,081
Zn - H14	2,125	2,142	2,067
Zn - E11	-	-	-
Zn - O2	2,242	2,044	2,061
Zn - N4	-	3,223	2,122
Zn - N5	-	-	3,145
Zn - O6	-	-	3,851
Ângulo de ligação / graus			
H6 - Zn - H13	135,54	132,37	-
H6 - Zn - H14	96,75	94,32	-
H6 - Zn - E11	-	-	-
E11 - Zn - H13	-	-	-
E11 - Zn - H14	-	-	-
H13 - Zn - H14	112,86	109,07	123,63
H6 - Zn - O2	106,40	110,97	-
O2 - Zn - N4	-	-	77,96
O2 - Zn - H13	93,84	99,79	97,48
O2 - Zn - H14	110,46	109,32	109,98
N4 - Zn - H13	-	-	109,47
N4 - Zn - H14	-	-	123,61
Zn - O2 - C	145,73	138,34	110,33
Zn - N4 - N	-	-	112,02
Zn - N4 = C	-	-	132,35
τ_4	0,792	0,839	0,897

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.6 – Dados estruturais do modelo **ZM**.

Ligação / Å	ZM_g	ZM_h
Zn - H6	-	-
Zn - H13	2,054	2,034
Zn - H14	2,042	2,034
Zn - E11	-	-
Zn - O2	2,125	2,196
Zn - N4	2,261	2,257
Zn - N5	3,210	3,317
Zn - O6	3,756	4,110
Ângulo de ligação / graus		
H6 - Zn - H13	-	-
H6 - Zn - H14	-	-
H6 - Zn - E11	-	-
E11 - Zn - H13	-	-
E11 - Zn - H14	-	-
H13 - Zn - H14	128,43	128,90
H6 - Zn - O2	-	-
O2 - Zn - N4	74,95	73,91
O2 - Zn - H13	93,41	93,47
O2 - Zn - H14	113,97	108,88
N4 - Zn - H13	112,47	120,89
N4 - Zn - H13	116,37	109,46
Zn - O2 - C	116,31	115,59
Zn - N4 - N	108,38	109,80
Zn - N4 = C	134,17	133,52
τ_4 (Td=1)	0,817	0,782

Fonte: Elaborado pelo autor.