

## 510 - MODELAGEM *in silico* DA INTERAÇÃO DO CONTAMINANTE 4-NONILFENOL COM A ENZIMA LACASE DE *Pycnoporus cinnabarinus*

Robson Lourenço da Silva Santos<sup>(1)</sup>; Fabrício Motteran<sup>(2)</sup>

<sup>1</sup>Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, do Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária 50670901 – Recife – PE, Brasil - e-mail: [robson.lourenco@ufpe.br](mailto:robson.lourenco@ufpe.br)

**Endereço<sup>(2)</sup>:** Departamento de Engenharia Civil, Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Avenida da Arquitetura, s/n - 50740-550, Recife - PE, Brasil. - e-mail: [fabricao.motteran@ufpe.br](mailto:fabricao.motteran@ufpe.br)

### RESUMO

Os impactos advindos da urbanização e industrialização desenfreada no ecossistema e na saúde humana têm despertado interesse e preocupação mundial principalmente no que diz respeito à distribuição e destino final de poluentes emergentes presentes em águas residuárias da maioria das fábricas. Entre os poluentes emergentes de destaque, o 4-nonilfenol que é um derivado da degradação do nonilfenol etoxilado é conhecido por sua difícil degradação e por atuar como desregulador endócrino, causando efeitos adversos tanto para organismos aquáticos quanto terrestres. Fungos de podridão branca produzem lacases cujo sítio ativo possui alta afinidade por compostos fenólicos, podendo então ser a utilização dessas enzimas uma alternativa eficiente na degradação do 4-nonilfenol. Apesar de alguns estudos relacionarem a remediação fúngica do 4-NF com a presença de lacase, os estudos restringem-se à descrição do complexo modelado sem um aprofundamento na relação estrutura-atividade. Diante disso, o objetivo desse trabalho é avaliar a interação entre a lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* e o 4-NF de forma a compreender os mecanismos moleculares de degradação envolvidos nesta interação utilizando técnicas de modelagem molecular. Para isso, a estrutura tridimensional do 4-nonilfenol foi otimizada por métodos clássicos e semiempíricos utilizando o Avogadro e o MOPAC e então foram aplicados os comandos para os cálculos dos descritores teóricos e parâmetros termodinâmico. Em seguida, utilizando o 4-nonilfenol otimizado e a estrutura cristalográfica da lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* foi aplicada a técnica de *docking* para avaliação da interação receptor-ligante. O GAP de 9,07 eV reflete uma alta dureza do 4-nonilfenol e confirma a difícil degradação e recalcitrância na natureza. Os resultados do *docking* sugerem que a interação do 4-nonilfenol por lacase é espontânea com  $\Delta G$  de -6,3, sendo a presença dos aminoácidos ALA 80, HIS 111, LEU 457, PRO 346, PHE 81, LEU 112, ASP 458, PRO 79, PHE 448, SER 113, PHE 344 e VAL 82 no sítio ativo crucial para a estabilidade do complexo. Esses resultados demonstram um potencial de utilização da lacase em processos de degradação do 4-nonilfenol, uma vez que a interação espontânea é favorável à degradação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Docking molecular, Biorremediação, Poluentes emergentes, Bioinformática, Desreguladores endócrinos.

### INTRODUÇÃO

A urbanização e a industrialização desenfreada têm se tornado uma preocupação mundial na relação com a poluição ecológica e o bem estar da população, uma vez que, há uma dificuldade para a maioria das fábricas nas etapas de tratamento de suas águas residuárias. A grande quantidade de águas residuárias descartada pela indústria em corpos d'água leva consigo uma variedade de produtos químicos utilizados nos seus processos de fabricação que acarreta, além de problemas ambientais, problemas sociais relacionados à gestão de água, como energia, segurança alimentar, índices de pobreza, alagamentos e problemas de salinidade relacionados à irrigação (VALIPOUR, 2015).

É inegável que o uso de produtos químicos nos últimos anos contribuiu para o desenvolvimento econômico e social em todo o mundo, no entanto, cerca de 50% dos produtos químicos sintéticos presentes no cotidiano são

classificados como prejudiciais ao ambiente e 70% apresentam impacto significativo (GAVRILESCU et al., 2015). Dentre esses produtos estão os recentemente conhecidos como poluentes emergentes, classificados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) como produtos químicos sem regulamentação e de impacto ambiental e efeitos na saúde pública ainda pouco compreendidos ((US EPA, 2022)).

O nonilfenol etoxilado é um surfactante não iônico classificado como poluente emergente, geralmente é utilizado em formulações de detergentes, o que corresponde a cerca de 80% de sua demanda (ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2018). O 4-nonilfenol (4-NF), principal produto da degradação do nonilfenol etoxilado tem ocorrência frequente em lodos de esgoto e aterros sanitários, é caracterizado como poluente de difícil degradação e atua como desregulador endócrino, apresentando alta toxicidade e efeitos adversos à vida aquática e terrestre por ser capaz de interagir com receptores de estrogênio (CHENG et al., 2017; QIU et al., 2016).

Os fungos de podridão branca produzem enzimas lignolíticas, como as lacases (LAC), enzimas pertencentes à família das oxidoredutases que possuem alta afinidade por compostos fenólicos e apesar de alguns estudos relacionarem a remediação fúngica do 4-NF com a presença de lacase, os estudos restringem-se à descrição do complexo modelado sem um aprofundamento na relação estrutura-atividade (STENHOLM et al., 2020).

## OBJETIVO

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a interação entre a lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* e o 4-NF de forma a compreender os mecanismos moleculares de degradação envolvidos nesta interação utilizando técnicas de modelagem molecular para determinar parâmetros quantitativos e qualitativos (energia livre de ligação e descritores de reatividade) relacionados à afinidade entre enzima e ligante.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Obtenção da estrutura tridimensional do 4-NF e da enzima LAC

A estrutura tridimensional do 4-NF foi desenhada utilizando o *software* Avogadro versão 1.2.0, foram testados os métodos clássicos de GAFF, GHEMICAL, MMFF94, MMFF94s e UFF e em seguida as estruturas obtidas foram otimizadas pelos métodos semiempíricos AM1, MNDO, MNDO-d, PM3, PM6, PM7 e RM1 a partir do MOPAC2016. Após esta etapa, as sete estruturas obtidas foram sobrepostas a estrutura tridimensional de código 1752 depositada no *PubChem* para obtenção do melhor RMSD (menor valor abaixo de 3Å) (NOVIĆ et al., 2016). O cristal da LAC de código 2xyz foi obtido do banco de dados *Protein Data Bank*.

### 2. Obtenção dos parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade

Os cálculos dos parâmetros termodinâmicos foram realizados a partir do método quântico que se mostrou mais adequado e utilizando o Avogadro e o MOPAC2016 foram gerados os arquivos mop para o 4-NF. Para MOPAC2016 realizar os cálculos dos parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade foram aplicados os comandos EPS=80 e SUPER para simular a constante dielétrica da água a 25°C.

### 3. Preparação dos complexos LAC-4-NF e aplicação do *docking* molecular

A preparação do receptor (LAC) para o *docking* consistiu da remoção de todas as moléculas de água e adição dos hidrogênios polares e cargas de Kollman utilizando os softwares *Biovia Discovery Studio* v.20.1.0.19295 e *Autodock Tools* v.1.e5.6.

Para a aplicação dos parâmetros para o *docking* foi concedida flexibilidade total aos ligantes, assim todas as ligações ficaram livres para realizar rotações. O receptor foi considerado rígido com a *grid box* de 1Å centralizada no íon Cu 1503 (T1) com coordenadas e dimensões que permitissem que T2, T3 $\alpha$  e T3 $\beta$  também ficassem dentro da área da *grid box*.

Para a simulação de *docking* foi aplicado o algoritmo genético de busca Lamarckiano, então foram gerados os arquivos “.pdbqt” e submetidos ao *docking* usando o *AutoDock Vina* v.1.1.2. adotando o valor de exhaustiveness

igual a 200, assim, cada simulação consistiu em 200 execuções. A conformação de menor energia livre foi adotada como modelo de melhor afinidade e para visualizar as interações moleculares do complexo receptor-ligante foi utilizado o software *Discovery Studio Visualizer* v.20.1.0.19295.

## RESULTADOS

Dos métodos clássicos avaliados, os que obtiveram menor RMSD foram os métodos de GAFF com RMSD de **0,0896** e MMFF94s com RMSD de **0,0984** (tabela 1) apresentando-se como métodos mais adequados para prosseguir para a otimização por métodos semiempíricos.

**Tabela 1. Valores de RMSD da sobreposição das estruturas otimizadas por métodos clássicos com a estrutura cristalográfica do 4-NF destacando os menores RMSDs.**

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

Fonte: dados do autor.

Dos métodos semiempíricos, os que apresentaram RMSD mais favorável foram os métodos PM6 e PM7 com RMSDs de **0,1004** e **0,1079** respectivamente (tabela 2).

**Tabela 2. Valores de RMSD da sobreposição das estruturas pré-otimizadas do 4-NF por método clássico (MMFF94s) e posteriormente por métodos semiempíricos. Destacando o menor valor de RMSD, de energia e o método escolhido.**

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

Fonte: dados do autor.

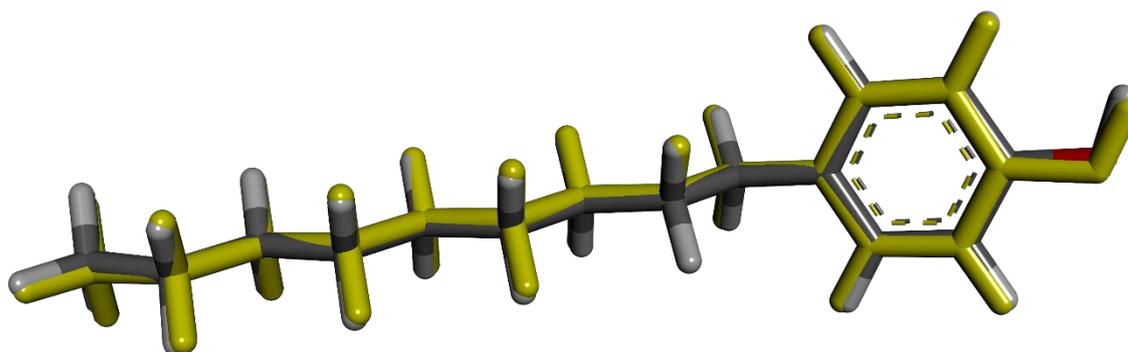


Figura 1: Sobreposição do 4-NF otimizado por método semiempírico (PM7) com o cristal de 4-NF (RMSD = 0,1079). Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos e descritores de reatividade para o 4-NF otimizado pelo PM7.

PARÂMETRO	ENERGIA
$\Delta H_f^0$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	-332,30101
HOMO (eV)	-9,179
LUMO (eV)	-0,112
GAP (LUMO – HOMO) (eV)	9,067

Fonte: dados do autor.

Tabela 4. Energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) entre a LAC-4-NF dos modelos gerados pelo *docking*.

Modelos	$\Delta G$ TEÓRICA (kcal.mol <sup>-1</sup> )
MOD1	-6,3
MOD2	-6,0
MOD3	-6,0
MOD4	-5,9
MOD5	-5,7
MOD6	-5,7
MOD7	-5,6
MOD8	-5,6
MOD9	-5,6

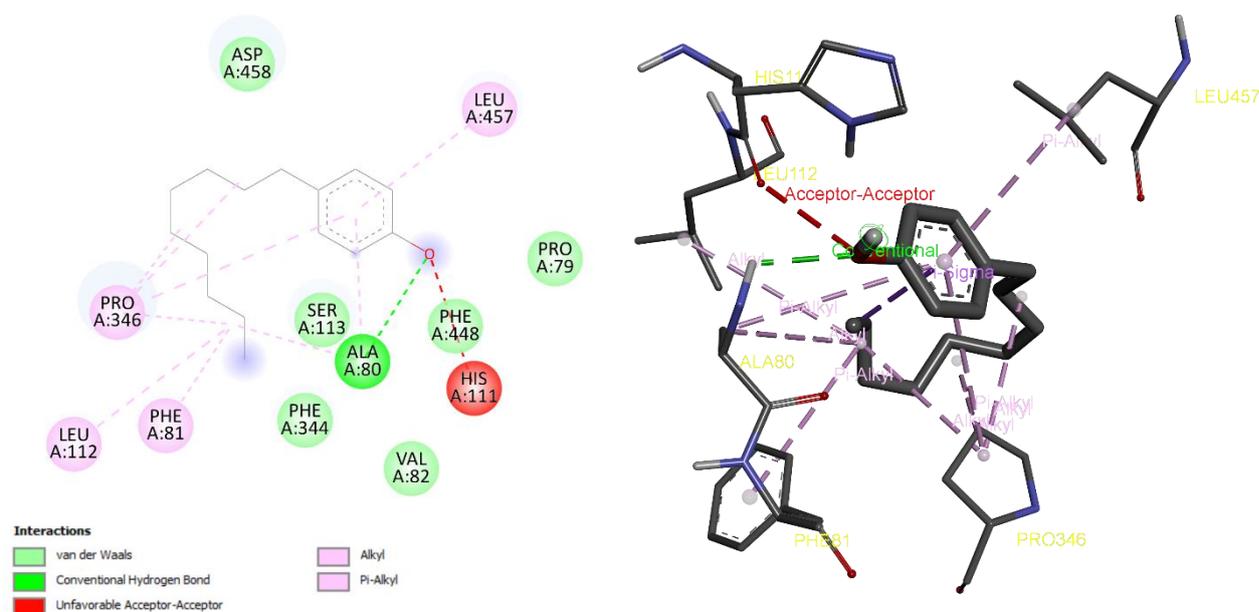
Fonte: dados do autor.

A interação do complexo LAC-4-NF formado se dá por ligações de hidrogênio, ligação aceptor-aceptor,  $\pi$ -alquil, alquil e van der waals envolvendo os aminoácidos ALA 80, HIS 111, LEU 457, PRO 346, PHE 81, LEU 112, ASP 458, PRO 79, PHE 448, SER 113, PHE 344 e VAL 82.

**Tabela 5. Resíduos de aminoácidos centrais de interação com o substrato para a formação do complexo LAC-4-NF.**

Tipo de ligação	Aminoácidos
ligações de hidrogênio	ALA 80
Ligação desfavorável aceptor-aceptor	HIS 111
$\pi$ -alquil	LEU 457; PRO 346; ALA 80
alquil	PRO 346; PHE 81; LEU 112, ALA 80
van der waals	ASP 458; PRO 79; PHE 448; SER 113; PHE 344; VAL 82

Fonte: dados do autor.



**Figura 2: Imagem 2D (esquerda) e 3d (direita) das interações do composto 4-NF com resíduos de aminoácidos do sítio oxidativo da LAC. Fonte: elaborada pelo autor.**

## ANÁLISE DOS RESULTADOS

Apesar de o menor RMSD para os métodos clássicos ter sido apresentado pelo campo de força GAFF (tabela 1), o método MMFF94s foi adotado para a pré-otimização do 4-NF por não apresentar diferença significativa com o resultado obtido pelo método de GAFF e por ser um método que fornece uma boa precisão na minimização de energia sendo então indicados para otimização de moléculas orgânicas e para obtenção de moléculas bioativas (LEWIS-ATWELL; TOWNSEND; GRAYSON, 2021).

Os métodos semiempíricos permitem a obtenção de outras conformações das moléculas adotando uma série de energias admitidas para cada átomo da molécula, admitindo uma série de dados experimentais como geometrias de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e energias de ionização (SANT'ANNA, 2009). Além disso, aplicam efeitos da mecânica quântica e propriedades eletrônicas nas interações do complexo enzima-

ligante, como transferência de carga, polarização e dispersão nos cálculos de *docking* para obtenção de resultados mais precisos (BAGHERI et al., 2020).

Dos resultados obtidos por métodos semiempíricos foi escolhido o PM7 por apresentar RMSD aceitável, abaixo de 3Å, por ser o método mais recente que o mopac disponibiliza reduzindo as possibilidades de erros quando utilizados dois métodos e por ser indicado para esse tipo de estudo, sendo adequado para modelar reações catalisadas por enzimas apresentando excelente capacidade na previsão da interação de ligantes em ambientes proteicos (BAGHERI et al., 2020)

Os orbitais HOMO e LUMO determinam como uma molécula interage com outras espécies e por isso são considerados como os orbitais de fronteira mais importantes e o cálculo de GAP evidencia as energias destes orbitais de modo que quanto mais estreito o GAP mais reativa e mais polarizável é a molécula (KARUNAKARAN; BALACHANDRAN, 2012). O valor alto do cálculo de GAP (tabela 3) indica uma alta dureza do 4-NF e reflete uma difícil degradação desse composto na natureza (MENEZES; MONTEIRO; D'ALMEIDA, 2004).

A energia livre de ligação entre a LAC e o 4-NF mostrou valor de  $\Delta G$  negativo (tabela 4) considerados favoráveis à degradação, sugerindo que a degradação do 4-NF por LAC é espontânea. Portanto, a LAC pode ser uma ótima alternativa para biodegradação do 4-NF, uma vez que, a energia de ligação obtida indica estabilidade do complexo facilitando a interação do 4-NF com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima (HONGYAN et al., 2019).

## CONCLUSÕES

Os resultados dos cálculos teóricos e do *docking* molecular evidenciam que a interação entre a LAC-4NF é favorável a degradação sugerindo viabilidade da utilização dessas enzimas para o tratamento de águas residuárias com presença de 4-NF. Além disso, a presença de aminoácidos específicos no sítio ativo da enzima como Ala80 (tabela 5 e figura 2) permite a interação através de ligações de hidrogênio com a hidroxila do 4-nonilfenol, interação do tipo alquil com a calda apolar e  $\pi$ -alquil com anel aromático. Sendo assim, Ala80 é o resíduo mais importante na estabilidade da interação receptor-ligante utilizando a lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*, uma vez que é responsável pelas interações por ligação de hidrogênio que segundo Oliveira (2015) possuem as interações intermoleculares de maior força entre as ligações não covalentes, sendo então, responsáveis pela manutenção da estabilidade de conformações bioativas da macromolécula.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, F. G. DE; BAUERFELDT, G. F.; CID, Y. P. Nonylphenol: Properties, legislation, toxicity and determination. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2 suppl 1, p. 1903–1918, ago. 2018.
2. BAGHERI, S. et al. Using the Semiempirical Quantum Mechanics in Improving the Molecular Docking: A Case Study with CDK2. **Molecular Informatics**, v. 39, n. 9, p. 2000036, 9 set. 2020.
3. CHENG, Y. et al. Effects of 4-nonylphenol in drinking water on the reproductive capacity of Japanese quails ( *Coturnix japonica* ). **Chemosphere**, v. 175, p. 219–227, maio 2017.
4. GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147–156, jan. 2015.
5. HONGYAN, L. et al. Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, v. 224, p. 743–750, jun. 2019.
6. KARUNAKARAN, V.; BALACHANDRAN, V. FT-IR, FT-Raman spectra, NBO, HOMO–LUMO and thermodynamic functions of 4-chloro-3-nitrobenzaldehyde based on ab initio HF and DFT calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 98, p. 229–239, dez. 2012.
7. LEWIS-ATWELL, T.; TOWNSEND, P. A.; GRAYSON, M. N. Comparisons of different force fields in conformational analysis and searching of organic molecules: A review. **Tetrahedron**, v. 79, p. 131865, jan. 2021.
8. MENEZES, G. W. DE; MONTEIRO, S. N.; D'ALMEIDA, J. R. M. ANÁLISE TÉRMICA DA RESINA EPOXI DGGBA/TETA PARA FORMULAÇÕES DIFERENTES DA RAZÃO. **Tecnologia em Metalurgia e Materiais**, v. 1, n. 1, p. 12–16, 2004.
9. NOVIČ, M. et al. The Comparison of Docking Search Algorithms and Scoring Functions. Em: [s.l.: s.n.]. p. 99–127.



10. OLIVEIRA, B. G. STATE OF THE ART IN HYDROGEN BOND. **Química Nova**, 2015.
11. QIU, L. et al. Emerging Pollutants – Part I: Occurrence, Fate and Transport. **Water Environment Research**, v. 88, n. 10, p. 1855–1875, 1 out. 2016.
12. SANT’ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.
13. STENHOLM, Å. et al. Removal of nonylphenol polyethoxylates by adsorption on polyurethane foam and biodegradation using immobilized *Trametes versicolor*. **Science of the Total Environment**, v. 724, 1 jul. 2020.
14. US EPA. **Water Quality Criteria**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/wqc>>. Acesso em: 31 mar. 2023.
15. VALIPOUR, M. Future of agricultural water management in Africa. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 7, p. 907–927, 3 jul. 2015.