U.PORTO
ICBAS | INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
SCHOOL OF MEDICINE AND BIOMEDICAL SCIENCES
U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

MSc
2.º CICLO
FCUP
ICBAS
2021

U.PORTO
Biotecnologias para a degradação de plásticos
Otávio Duarte Bissoli
FC

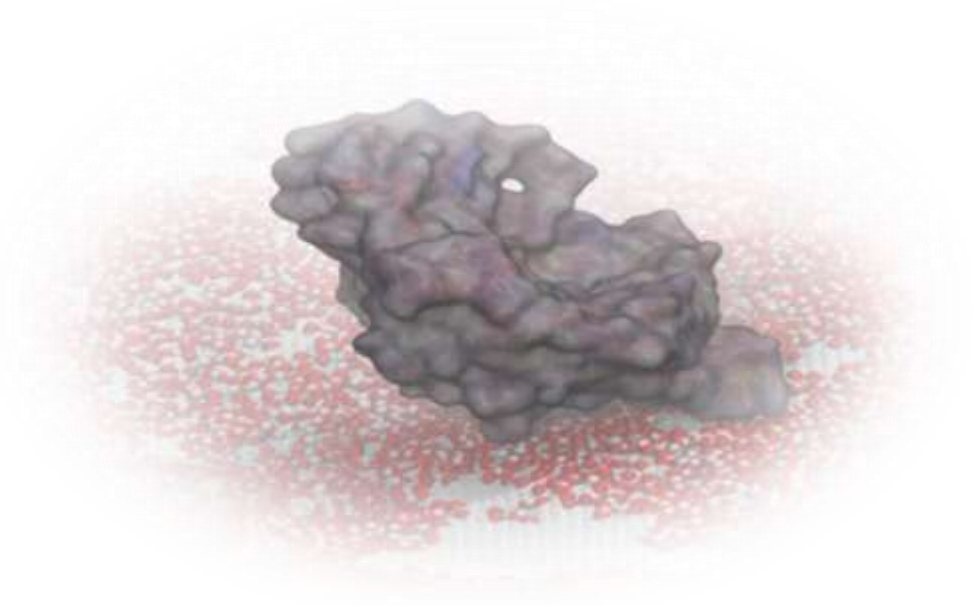
U.PORTO
ICBAS | INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
SCHOOL OF MEDICINE AND BIOMEDICAL SCIENCES
U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Biotecnologias para a degradação de plásticos

Otávio Duarte Bissoli

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Bioquímica e Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

2021



Biotecnologias para a degradação de plásticos

Otávio Duarte Bissoli

Mestrado em Bioquímica

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

2020/2021

Orientador

Alexandre Lopes Magalhães, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Maria João Ribeiro Nunes Ramos, Professor Catedrático,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, _____/_____/_____

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, o professor Alexandre Lopes Magalhães, e à minha coorientadora, a professora Maria João Ribeiro Nunes Ramos, pela oportunidade de fazer parte deste projeto e por todas orientações e revisões. Também agradeço ao Alexandre Pinto, doutorando do mesmo projeto de pesquisa ao qual estou inserido e com o qual tive o privilégio de dividir o mesmo ambiente de pesquisa. Toda sua atenção foi de grande impacto na minha jornada acadêmica.

Agradecido, também, à Faculdade de Ciências de Porto e ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, seja pela boa estrutura, seja pelos funcionários e corpo docente dedicado aos estudantes.

Reconheço e agradeço à minha mãe por toda dedicação e doação ao criar três crianças em uma situação delicada de ausências e de perdas. Aprendemos, do jeito mais difícil, o significado de “junte seus pedaços e siga em frente”.

Um agradecimento também aos meus irmãos Rodolfo e Luiza por fazerem parte da minha caminhada e sempre me ajudarem nos momentos difíceis.

Por fim, dedico este trabalho ao meu pai, de onde ele estiver, que me fez buscar muitas respostas e nunca deixar de fazer perguntas, a compreender ciclos e ritmos. Como dito por *Laurent de Lavoisier*, “Na natureza, nada se cria, e se perde, tudo se transforma”.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima” *Louis Pasteur*

Abstract

In a world where the use of plastics has become trivial, a big problem also appears, the accumulation of microplastics in the environment. This concern led to an interest in recycling it. Many methods for this have been developed. In special the biological method one being of greatest interest, due to its advantages at sustainable and industrial levels.

There are few reports on the degradation of plastics by biological method, specifically PET. But a microbial community aroused considerable interest, this being *Ideonella sakaiensis* 201-F6, which is capable of using PET hydrolized by two enzimes as its main source of energy and carbon. One of the two enzymes produced by *Ideonella sakaiensis* is the MHETase, responsible for the final step of degradation of PET. With this protein, there is a lot of interest in isolation and immobilization on the surface, for use in industrial application.

A surface that is gaining prominence, due to its applicability, is the Oxide of Graphene (GO). GO is promising for many applications, especially for enzymatic immobilization.

This concept led us to explore *in silico* the behavior of the MHETase enzyme with the graphene oxide sheet. First, we made the assembly of the graphene sheet at different rates of oxidation, in order to explore the binding of the protein in the different oxidized media along the surface. The second step was to test the adsorption of the enzyme in differentes conformations distributed on the sheets with different oxidative rates by means of Molecular Dynamics (MD) simulations.

Tests have shown that the enzyme is able to bind in all orientation over oxidized and non-oxidized parts of the surface in order to minimize the interaction energy, and kept the structural stability.

Keywords

PET, *Ideonella Sakaiensis*, MHETase, Immobilization, Surface, Oxide de Graphene (GO), Adsorption, Enzyme, Oxidation, Molecular Dynamics (MD), Simulations, Interaction Energy, Strucutural Stability

Resumo

Em um mundo onde o uso de plásticos se tornou trivial, surge também um grande problema: o acúmulo de microplásticos no meio ambiente. Essa preocupação despertou o interesse na reciclagem. Muitos métodos para isso foram desenvolvidos. Em especial, o método biológico como de maior interesse, devido às suas vantagens a nível sustentável e industrial.

Existem poucos relatos sobre a degradação de plásticos pelo método biológico, especificamente o PET. Mas, uma comunidade microbiana despertou considerável interesse, sendo esta a *Ideonella sakaiensis* 201-F6, que é capaz de utilizar o PET hidrolisado por duas enzimas como sua principal fonte de energia e carbono. Uma das duas enzimas produzidas pela *Ideonella sakaiensis* é a MHETase, responsável pela etapa final de degradação do PET. Com essa proteína, há um grande interesse no seu isolamento e imobilização em superfície, para o uso em aplicação industrial.

Uma superfície que vem ganhando destaque, devido à sua aplicabilidade, é o Óxido de Grafeno (GO). GO é promissor para muitas aplicações, especialmente para imobilização enzimática.

Este conceito nos levou a explorar *in silico* o comportamento da enzima MHETase com a folha de óxido de grafeno. Primeiramente, fizemos a montagem da folha de grafeno em diferentes taxas de oxidação, a fim de explorar a ligação da proteína nos diferentes meios oxidados ao longo da superfície. A segunda etapa foi testar a adsorção da enzima em diferentes conformações distribuida nas folhas com diferentes rácios oxidativos por meio de simulações de Dinâmica Molecular (DM).

Testes demonstraram que a enzima é capaz de se ligar em todas as orientações sobre as partes oxidadas e não oxidadas da superfície para minimizar a energia de interação, mantendo sua estabilidade estrutural.

Palavras-Chave

PET, *Ideonella Sakaiensis*, MHETase, Imobilização, Superfície, Óxido de Grafeno (GO), Adsorção, Enzima, Oxidação, Dinâmica Molecular (DM), Simulação, Energia de Interação, Estabilidade Estrutural

Índice

Agradecimentos 1
Abstract 3
Resumo 4
Lista de Figuras, Tabelas e Apêndices 7
Lista de Equações 10
Lista de Abreviaturas 11
Capítulo 1: Introdução 13
1. Plásticos 13
1.1. Reciclagem 14
1.1.1. Reciclagem Biológica 15
1.1.2. *Ideonella sakaiensis* 15
2. Imobilização Enzimática 17
2.1. Óxido de Grafeno 19
Capítulo 2: Metodologia 23
1. Mecânica Estatística 23
2. Mecânica Molecular 24
2.1. Campo de forças 25
2.1.1. Termo da Energia Potencial de Ligação 26
2.1.2. Termo da Energia Potencial Angular 26
2.1.3. Termo da Energia Potencial Torcional 27
2.1.4. Termo da Energia de *van der Waals* 27
2.1.5. Energia Eletrostática 28
2.1.6. Energia dos termos cruzados 29
2.2. Campos de forças disponíveis 29
3. Condições Iniciais e Minimização para Dinâmica Molecular 30
3.1. Steepest Descent 31
3.2. Velocidades Iniciais 32
4. Dinâmica Molecular 32
4.1. Integração das Equações do Movimento 33
4.2. Constrangimentos (*constraints*) e restrições (*restraints*) moleculares 34
4.3. Modelos de solvatação 34
4.4. Controle de temperatura de pressão 35
4.5. Condições Periódicas de Fronteiras 36
4.6. Cálculos das Forças de Longo Alcance 37

5. Programas para simular a Dinâmica Molecular 38
6. Simulação em Dinâmica Molecular da superfície de Óxido de Grafeno 39
6.1. Preparo das superfícies 39
6.2. Campo de Forças 40
6.3. Simulação com Dinâmica Molecular 41
7. Simulação em Dinâmica Molecular da MHETase 42
7.1. MHETase em água 42
7.2. Adsorção da MHETase na superfície 44
Capítulo 3: Resultados e Discussão 46
1. Análise da superfície de Óxido de Grafeno 46
1.1. Propriedades Gerais 46
1.2. Análises de temperatura, densidade, volume, pressão, energia total e RMSd. 46
1.3. Cálculo da área de superfície acessível ao solvente 48
1.4. Análise dos Cálculos de Distribuição de Funções Radial (RDF) e Densidade Parcial 50
1.5. Número de pontes de hidrogénio intramoleculares e análise de Determinação de Flutuações nas Posições Atómicas (RMSF) 54
2. Análise da MHETase em água 57
2.1. Propriedades gerais: Análises de temperatura, densidade, volume, pressão, energia total e RMSd. 57
2.2. Raio de giro 58
3. Análises das simulações de adsorção da MHETase 59
3.1. Propriedades Gerais 59
3.2. RMSF da Proteína 62
3.3. Contactos entre proteína e superfície 63
3.3.1. Ligações de Hidrogénio entre proteína e superfície 66
3.4. Cálculos de LIE (*Linear Interaction Energy*) 71
Conclusão 75
Referências 77

Lista de Figuras, Tabelas e Apêndices

Figuras

Figura 1 – Reações de degradação do PET em ácido tereftálico e etilenoglicol pela MHETase e PETase (Yoshida et al., 2016). 16
Figura 2 – Estrutura da MHETase com domínio α/β-hidrolase colorido em *salmon* e o domínio da tampa do sítio catalítico em cor *light blue* (Palm et al., 2019). 17
Figura 3 – Folha de óxido de grafeno obtida após simulação em dinâmica molecular. 19
Figura 4 – Representação da folha de grafeno oxidada e seus grupos funcionais (al-Badri, Smith, Sinclair, al-Jamal, & Lorenz, 2021) 21
Figura 5 – Número de citações dos campos de forças mais utilizados em química e bioquímica computacional (os dados foram retirados da base de dados ISI Web of Science (2007): AMBER, CHARMM, and OPLS (N. et al., 2015/2016). 30
Figura 6 – Representação de um potencial de um sistema, onde começa com uma configuração de maior energia (START) e procura um local mínimo de energia (END) (Martins, 2012). 31
Figura 7 – Representação esquemática da ideia das Condições Periódicas de Fronteiras (Petkov, 2010). 37
Figura 8 – Estruturas para análises de óxido grafeno com 5 diferentes graus de oxidações e grafeno geradas com script do makegraphitics. 40
Figura 9 – Folha de óxido de grafeno obtida através do uso da dinâmica molecular. ..42
Figura 10 – Proteína solvatada em água explicita TIP3P. 43
Figura 11 – Representação das 7 conformações distribuídas da proteína no eixo X e Y na superfície para adsorção. 44
Figura 12 – RMSd respetivo aos átomos de carbono das folhas GO com taxas de oxidações C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 parametrizadas pelo campo de forças GAFF2. 47
Figura 13 – RMSd respetivo aos átomos de carbono das folhas GO com taxas de oxidações C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 parametrizadas pelo campo de forças OPLS-AA. 47
Figura 14 – Gráfico das áreas das superfícies de GO em contacto com o solvente das estruturas com taxa de oxidação C/O 2.0 e 3.0 com o uso dos campos de força GAFF2. 48

Figura 15 – Gráfico das áreas das superfícies de GO em contacto com o solvente das estruturas com taxa de oxidação C/O 2.0 e 3.0 com o uso dos campos de força OPLS-AA. 49
Figura 16 – RDF dos oxigénios dos grupos funcionais (O) e carbonos aromáticos (sp2) respetivos as folhas de GO com taxa de oxidação C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 com uso dos campos de forças GAFF2. 50
Figura 17 – RDF dos oxigénios dos grupos funcionais (O) e carbonos aromáticos (sp2) respetivos as folhas de GO com taxa de oxidação C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 com uso dos campos de forças OPLS-AA. 51
Figura 18 – Densidade Parcial de GO com taxa de oxidação C/O 2.0 parametrizadas com GAFF2 e OPLS-AA. 52
Figura 19 – Densidade Parcial de GO com taxa de oxidação C/O 3.0 parametrizadas com GAFF2 e OPLS-AA. 53
Figura 20 – Gráfico dos cálculos dos números de pontes de hidrogénio intramoleculares das folhas com taxas de oxidação C/O 2,0, C/O 2,5 e C/O 3.0 parametrizadas com os campos de forças GAFF2 e OPLS-AA. 55
Figura 21 – Folhas GO simuladas em DM representadas pelo seus respetivos RMSF. 56
Figura 22 – RMSd respetivo da simulação da enzima MHETase solvatada em água explícita TIP3P. 57
Figura 23 – Raio de giro da MHETase com tempo de simulação em 50000 ps (50ns). 58
Figura 24 – RMSd das MHETase 2_100 sendo adsorvida em GO em 5 diferentes tipos de taxa de oxidação. 60
Figura 25 – RMSd respetivo aos GO usados para adsorção da MHETase 2_100. 61
Figura 26 – RMSd respetivo ao grafeno puro (*Pristine*) usado para adsorção da MHETase 1_000. 61
Figura 27 – Imagem retirada do VMD do sistema GO x MHETase, onde a proteína esta com rotação ao redor do eixo X e Y em 0º, com o sítio catalítico exposto virado para cima. Nesta figura estão os resíduos com valores mais altos presentes nas análises de RMSF. Resíduos; 10 ao 20 (orange), 30 ao 45 (yellow), 60 ao 70 (lime), 90 ao 100 (blue), 290 ao 310 (mauve) e 340 ao 350 (purple). 62
Figura 28 – Gráficos representativo das simulações Pristine_2_100, Pristine_2_010 e C/O 2.0_4_030 que apresentam contactos antes de 10000 ps. 63
Figura 29 – Gráficos representativo das simulações C/O 2.5_3_200, C/O 2.5_4_300, C/O 2.75_2_100 e C/O 2.75_2_010 que apresentam contactos antes de 10000 ps. 64

Figura 30 – Gráficos representativo das simulações C/O 3.0_3_200, 4_300, 2_010 e 3_020 que apresentam contactos antes de 10000 ps. 64
Figura 31 – Gráficos representativo das simulações Pristine_3_200, C/O 2.0_1_000 e C/O 3_020 que apresentam contactos antes de 10000 ps. 65
Figura 32 – Gráficos representativo das simulações Pristine_4_300, C/O 2.0_2_100 e 3_020, C/O 2.75_1_000 e C/O 3.0_1_000 que apresentam contactos após 10000 ps. 65
Figura 33 – Gráficos representativo das simulações C/O 2.25_4_030 e C/O 2.75_3_200 que apresentam um pequeno decréscimo nos contactos entre MHETase e superfície. 66
Figura 34 – Gráficos das pontes de hidrogénios de todas as conformações testadas de MHETase presente no óxido de grafeno com taxa de oxidação C/O 2.0. 67
Figura 35 – Gráficos das pontes de hidrogénios de todas as conformações testadas de MHETase presente no óxido de grafeno com taxa de oxidação C/O 2.75. 68
Figura 36 – Frames 400 (10 ns) e 1800 (45 ns) da adsorção da MHETase na folha GO C/O 2.0 4_030. 69
Figura 37 – Frames 400 (10 ns), 600 (15 ns), 1200 (30 ns) e 1800 (45 ns) da adsorção da MHETase na folha GO C/O 2.75 4_030. 69
Figura 38 – Frames 100 (2,5 ns) 400 (10 ns), 600 (15 ns), 1200 (30 ns), 1800 (45 ns) e 2000 (50 ns) da adsorção da MHETase na folha Pristine 4_030. 70
Figura 39 – LIE das simulações que mais apresentaram descréscimo de energia. 72
Figura 40 – LIE das 6 simulações que apresentaram valores de ΔG finais similares aos iniciais 73
Figura 41 – LIE das simulações com valores de ΔG aumentados. 74

Tabelas

Tabela 1 – Representação das rotações ao redor dos eixos X e Y em códigos. 59

Lista de Equações

Equação 1 – Função de partição canónica 24
Equação 2 – Função isobárico-isotérmico 24
Equação 3 – Equação geral para calcular a energia total do sistema 26
Equação 4 – Energia de deformação duma ligação 26
Equação 5 – Energia dos ângulos de ligação 26
Equação 6 – Energia de torção duma ligação química 27
Equação 7 – Potencial de Lennerd Jones 28
Equação 8 – Potencial de Coulomb 28
Equação 9 – Função para descrever os movimentos dos átomos em dinâmica molecular 32
Equação 10 – Forças representadas pela derivada negativa da função potencial 33

Lista de Abreviaturas

ACPYPE – *AnteChamber Python Parser interfacE*

BHET – Tereftalato de bis-hidroxietila

C/O – Carbono/Oxigénio

DM – Dinâmica Molecular

DMT – Tereftalato de dimetila

E_r – Energia total

FAE – Feruloil esterase

GO – Óxido de Grafeno

GROMACS – *GROningem Machine for Chemical Simulation*

LIE – *Linear Interaction Energy*

MHET – Mono(2-hidroxietil) tereftalato

MM – Mecânica molecular

NPT – *Ensemble* isobárico-isotérmico

NVT – *Ensemble* canónico

RDF – Distribuição de função radial

RMSd – Cálculo do desvio padrão nas posições atómicas

RMSF – Determinação de flutuações nas posições atómicas

SASA – Área superficial acessível ao solvente

SESP – *Scale Charge Model*

PBC – Condições periódicas de fronteiras

PDB – *Protein Data Bank*

PET – Tereftalato de polietileno

PME – *Particle Mesh Ewald*

pNP – PET ésteres p-nitrofenil

TIP – *Transferable intermolecular potentials*

TIP3P – *Transferable intermolecular potential with 3 points*

TPA – Ácido tereftálico

VMD – *Visual Molecular Dynamics*

Capítulo 1: Introdução

1. Plásticos

A humanidade, desde seus primórdios, sempre mostrou capacidade de criar tecnologias para garantir sua sobrevivência e melhorar o seu bem estar. Deste modo, observam-se constantemente avanços científicos e tecnológicos em todas as áreas. Grande parte dessa evolução tecnológica deve-se a materiais com propriedades apelativas para auxiliar nesse desenvolvimento. Isso é tão notável, que no decorrer da evolução humana, estas eras são designadas pelos materiais usados nesta época, como, Idade da Pedra, Idade do Bronze e do Ferro. Atualmente, vivemos na Idade dos Plásticos (Hage Jr., 1998). O início da produção de plásticos, em grande escala, ocorre perto de 1950, a sua difusão é marcada após a Segunda Guerra mundial (Geyer, Jambeck, & Law, 2017), e hoje em dia um mundo sem plásticos é inconcebível.

Sendo um material com muitas funcionalidades devido às suas características, os plásticos têm uma ampla gama de aplicações, podendo ser utilizados em produtos simples, como embalagens, até equipamentos com tecnologia avançada. A alta versatilidade deste polímero fez com que ele fosse difundido mundialmente. Devido à sua produção e aplicação exaustiva, veio então, a grande problemática deste material, que é o acúmulo deste nos meios terrestres e aquáticos, aliado à sua longa durabilidade.

Vários estudos fazem referência à toxicidade dos plásticos no ambiente, devido sua resistência à degradação, mas também, aos produtos químicos usados na fabricação e alguns aditivos químicos utilizados na sua integração. Um dos plásticos mais conhecidos é o Tereftalato de Polietileno (PET). Muito usado em embalagens para líquidos, ele possui extrema durabilidade, sendo isso uma das maiores vantagens do PET, devido à inércia química que resulta da hidrofobicidade da porção de ácido tereftálico (TPA). Por outro lado, esta qualidade originou um conflito ambiental a nível mundial, tendo em conta a sua decomposição lenta e, consequentemente, seu acúmulo no ambiente a nível global (Palm et al., 2019).

O PET e muitos outros plásticos sintéticos são considerados, formalmente, não tóxicos, mas, as partículas que derivam da sua erosão não são degradadas a um ritmo sustentável, e são omnipresente em habitats marinhos ou terrestres. A acumulação em organismos vivos através da ingestão leva à sua difusão pela cadeia alimentar e pode gerar problemas físicos para a vida selvagem e humana. Isso levou a preocupação

global pelo volume de plástico gerado e o seu uso não sustentável, podendo acarretar grandes impactos globais a um curto prazo (Eriksen et al., 2014; Thompson, Moore, vom Saal, & Swan, 2009).

1.1. Reciclagem

Atualmente existem vários métodos de reciclagem para combater este problema. Mas existem ainda muitos desafios. Alguns métodos, como os processos mecânicos, incluem a coleta, classificação, lavagem e trituração do material. Podem ocorrer em etapas de ordem diferente, com repetição ou não, dependendo da origem, composição, complexidade e contaminação do resíduo. A dificuldade desse processamento é também causada pelos aditivos químicos presentes na sua fabricação e fase final. Esse processo origina materiais que são então usados para produzir sacos de plásticos, calhas, tubagens etc, sendo a qualidade desse produto reciclado o principal problema desta metodologia mecânica (Al-Salem, Lettieri, & Baeyens, 2009; Ragaert, Delva, & Van Geem, 2017). No entanto, a limitação da reciclagem mecânica do plástico pode ser suprimida por processos químicos, onde são usadas tecnologias avançadas que convertem os materiais plásticos em monómeros através da despolimerização, que pode resultar num esquema industrial lucrativo e sustentável, proporcionando maior rendimento do produto e menos desperdício. Eles são adequados para uso como matéria-prima na produção de novos produtos petroquímicos e plásticos (Al-Salem et al., 2009; Mastellone, 1999).

Recentemente, tem se dado muita atenção à reciclagem química dos plásticos, em especial o Tereftalato de Polietileno (PET), realçando as vantagens da sua despolimerização eficiente (Al-Salem et al., 2009).

O Tereftlato de Polietileno, referido como PET ou simplesmente poliéster, é o nome comum para o polímero usado para fazer produtos como fibras de poliéster, filme e resina de estado sólido (garrafa). O PET é o plástico de poliéster mais abundante, com quase 70 milhões de toneladas fabricadas anualmente para cobrir a demanda mundial. A comercialização deste polímero evoluiu de forma progressiva nos últimos 10 anos, sendo seus principais impulsionadores o desenvolvimento da fibra de poliéster, bem como o uso crescente de resina PET de estado sólido para aplicações em embalagens (Markit, 2018).

Apesar de alguns avanços na reciclagem do PET terem sido notáveis, como nos processos químicos, esses esforços atuais para reciclar ainda carecem de sustentabilidade e cobrem apenas uma fração dos resíduos PET, além de gerar produtos degradados de baixo valor. Porém, foram descobertas recentemente, duas enzimas de origem biológica que degradam o PET especificamente. Essas enzimas estão presente na bactéria *Ideonella sakaiensis* (Hopewell, Dvorak, & Kosior, 2009; Palm et al., 2019).

1.1.1. Reciclagem Biológica

Existem poucos relatórios sobre a degradação biológica do PET ou a sua utilização para apoiar o crescimento de microrganismos. Exemplos raros incluem membros dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, mas estes apresentam uma produtividade limitada. Apesar de algumas descobertas e otimizações de enzimas por biotecnologia, ainda não há uma enzima que pode penetrar totalmente e degradar uma camada espessa de PET altamente cristalino, de um modo económico e rentável (Nimchua, Punnapayak, & Zimmermann, 2007; Palm et al., 2019). Mas, pesquisadores rastrearam comunidades microbianas expostas ao PET no meio ambiente, onde certas estirpes foram detetadas e, posteriormente testadas em filmes de PET, para identificar os microrganismos que são nutricionalmente dependentes deste polímero. Com essa exposição seletiva, uma bactéria específica foi descoberta e isolada, sendo esta a *Ideonella sakaiensis* 201-F6, como referida anteriormente, pois é capaz de usar este plástico específico como sua principal fonte de energia e carbono (Yoshida et al., 2016).

1.1.2. *Ideonella sakaiensis*

Esta estirpe bacteriana produz duas enzimas capazes de hidrolisar o PET. A primeira enzima da *Ideonella sakaiaensis* é a PETase, que converte o PET em mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET). E a MHETase, a segunda enzima, hidrolisa o MHET em ácido tereftálico e etilenoglicol (ver figura 1). Sendo assim, estas duas enzimas trabalham em etapas consecutivas, produzindo os blocos de construção necessários para um novo ciclo de síntese de PET (Palm et al., 2019; Yoshida et al., 2016).

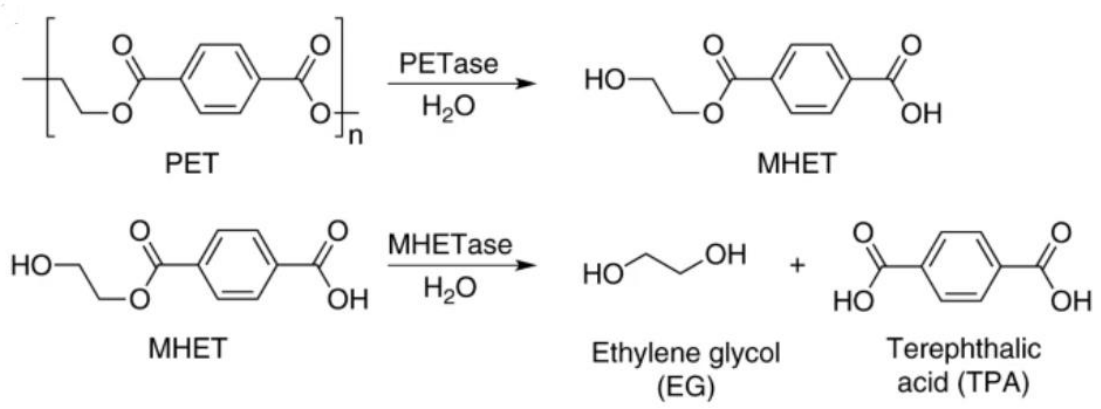


Figura 1 – Reações de degradação do PET em ácido tereftálico e etilenoglicol pela MHETase e PETase (Yoshida et al., 2016).

Especificamente, este estudo irá abordar a MHETase. Ela foi inicialmente atribuída à família de enzimas tannases, que inclui tannases fúngicas, bacterianas e feruloil esterases. A MHETase demonstrou-se capaz de hidrolisar MHET, e BHET (também usado para como matéria-prima para unidades de produção de PET baseadas em DMT ou TPA, enquanto DMT e TPA não podem ser usados alternadamente) mas em velocidades muito menores em comparação da reação com MHET; porém não é capaz de reagir com PET ésteres p-nitrofenil (pNP) alifáticos ou compostos de éster aromático, que são convertidos por outras enzimas da família das tanases, indicando uma especificidade de substrato altamente restrita (Imran, Kim, Han, Cho, & Kim, 2010; Yoshida et al., 2016).

A estrutura e função da MHETase são pouco caracterizadas, com apenas alguns estudos publicados focados na estrutura e engenharia desta. Todas enzimas que degradam o plástico conhecidas até agora exibem um *fold* α/β-hidrolase. Já a MHEtase, no entanto provavelmente possui uma estrutura sem precedentes para enzimas que degradam o plástico. Sendo esse um ponto a ser explorado, a fim de melhorar a catálise e expandir a especificidade do substrato, e assim, melhorar significativamente a degradação do polímero pela via enzimática. Análises de bioinformática sugerem que a MHETase evoluiu de uma FAE (feruloil esterase), e que por isso, esta enzima pertence à família das tanases, que consiste em FAEs fúngicas e bacterianas. Vários testes computacionais foram realizados para elucidar essa relação da MHETase e esta família das enzimas tannases. Foi constatada uma similaridade de sequência baixa (<53%) com a maioria das sequências na família. Mas, testes realizados para análises de conservação com posições de sequência da MHETase como referência, mostram que a maioria dos aminoácidos do centro ativo são altamente conservadas (ver figura 2). Salvo algumas exceções notáveis, com baixas pontuações de conservação de resíduos

de aminoácidos, e que consequentemente tornam essa enzima bastante peculiar, aumentando ainda mais o interesse em compreender o papel das suas características (Knott et al., 2020; Palm et al., 2019).

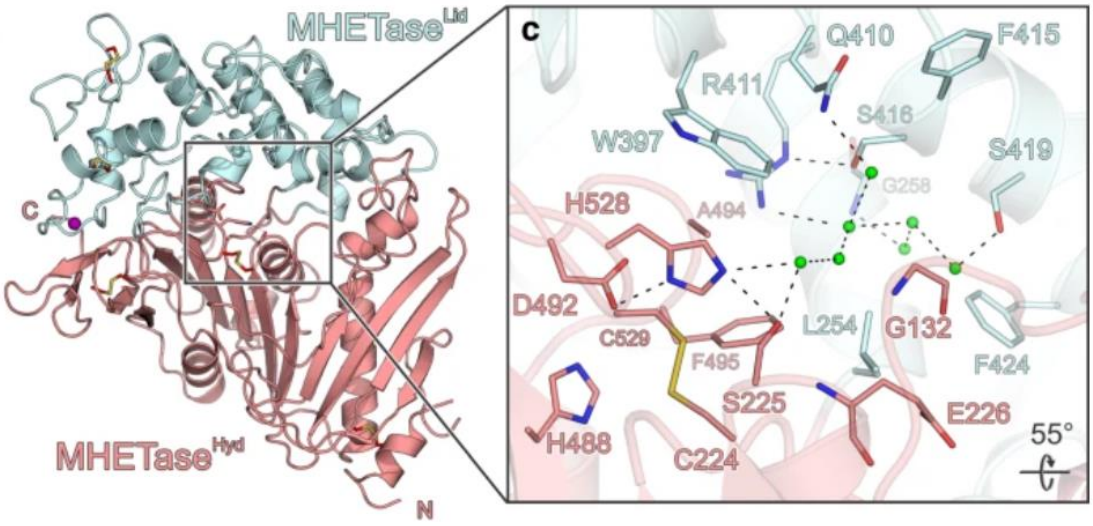


Figura 2 – Estrutura da MHETase com domínio α/β-hidrolase colorido em *salmon* e o domínio da tampa do sítio catalítico em cor *light blue* (Palm et al., 2019).

Este projeto focar-se-á no estudo de uma das enzimas produzidas pela *Ideonella sakaiensis*, a MHETase, adsorvida numa superfície sólida usando dinâmica molecular (DM).

2. Imobilização Enzimática

De um modo geral, enzimas imobilizadas em suportes sólidos, têm bastante importância devido às suas potenciais aplicações industriais e outras, como na área médica. No entanto, pode haver uma limitação na atividade da proteína quando se faz a sua imobilização. Com os avanços da biotecnologia através das escolhas de materiais para suporte, *cross-linkers,* juntamente com vários outros mecanismos que influenciam o desempenho, como estabilização e hiperativação dessa enzima, poder-se-á controlar a sua atividade. Com esses desenvolvimentos e pesquisas, as enzimas imbolizadas em comparação com as livres são mais robustas, resistentes às condições do ambiente e acompanhadas de um aumento na sua estabilidade operacional. Mais importante ainda, é a heterogeneidade desses sistemas e o fácil manuseio que permite a separação dos produtos gerados e a reutilização do sistema enzima vs. suporte novamente. Todos esses fatores contribuem para o aumento da atividade catalítica ampliando o rendimento

final e tornando apelativa a aplicação a nível industrial (Hoarau, Badieyan, & Marsh, 2017; Homaei, Sariri, Vianello, & Stevanato, 2013).

Embora uma enzima imobilizada em superfície seja frequentemente considerada a mesma em que se encontrava anteriormente, na realidade isso raramente, ou nunca é verdade. Isso ocorre porque a superfície sempre afeta as propriedades físico-químicas das moléculas próximas. Muitos efeitos influenciam as interações enzima-superfície, podendo ser efeitos da estrutura da água à superfície do adsorvente, também como efeitos de partição, e entre outros que influenciam a atividade catalítica do sistema. Além disso, a natureza do *linker* pode ter também uma grande influência, sendo que a sua ancoragem direta e mal orientada pode apresentar várias desvantagens. (Hoarau et al., 2017)

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas permanece um *hotspot* científico desde sua descoberta, feita por Nelson e Griffith em 1916. Nas duas últimas décadas as pesquisas para imobilizar proteínas sofreram um grande impulso a nível global (Gonçalves et al., 2019; Wahab, Elias, Abdullah, & Ghoshal, 2020).

A imobilização enzimática é um processo técnico pelo qual as enzimas são fixadas sobre ou dentro de suportes sólidos, criando sistemas heterogéneos. Por este meio pretende-se reproduzir o meio natural nas células, onde a maioria das proteínas presentes *in vivo* se encontram ligada a um suporte, como o citoesqueleto celular, membrana e estruturas de organelos (Homaei et al., 2013; Kress et al., 2002).

Uma enzima imobilizada é definida como um sistema que consiste em dois componentes essenciais. O primeiro é o componente estrutural não catalítco (superfície), que é projetado ou escolhido para auxiliar na melhora da atividade catalítica da enzima, separação e reutilização facilitando o controle do processo enzimático. O segundo elemento é o catalítico, sendo as enzimas escolhidas de acordo com o substrato de interesse e produtos desejados (Cao, Langen, & Sheldon, 2003).

Tradicionalmente, quatro métodos são usados para imobilização enzimática: adsorção não covalente, aprisionamento físico, imobilização covalente e bio-conjugação. O suporte pode ser uma resina sintética, um polímero inorgânico, como zeólito ou sílica, sendo esta última bastante utilizada e presente na literatura, também podem ser usado biopolímeros (Homaei et al., 2013).

2.1. Óxido de Grafeno

Há ainda muito para se desenvolver e inovar no que diz respeito ao uso das superfícies e recentemente, um suporte tem ganho destaque, o óxido de grafeno (GO). Esta estrutura é um dos materiais promissores que tem sido amplamente estudado e testado, a fim de melhorar, validar e obter informações suficientes para que possa ser aplicado em larga escala.

O óxido de grafeno, um nanomaterial derivado do grafeno, de estrutura bidimensional, condutora e com uma grande área de superfície, que o torna adequado para intercalação ou adsorção. O GO é um composto em ascensão entre nanomateriais, onde este é funcionalizado com grupos químicos contendo oxigénio, sendo promissor para diversas aplicações devido à diversidade estrutural e propriedades melhoradas em comparação ao grafeno puro (D. W. Lee et al., 2010; Li, Jiang, Zhao, & Zhang, 2015; Mouhat, Coudert, & Bocquet, 2020).

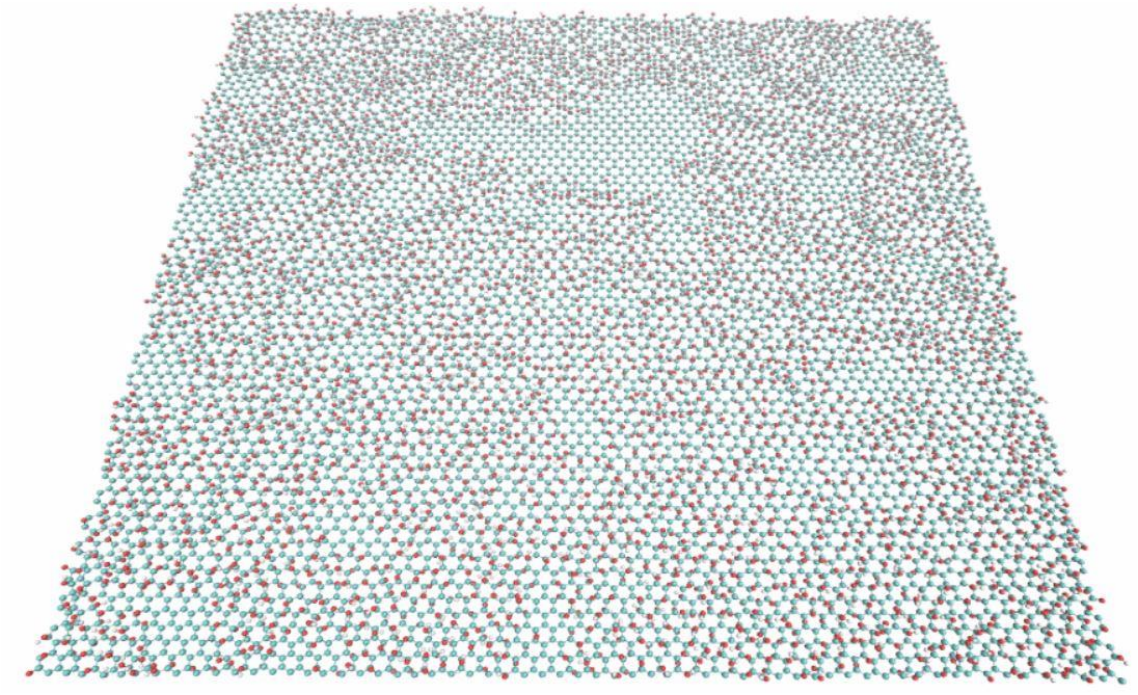


Figura 3 – Folha de óxido de grafeno obtida após simulação em dinâmica molecular.

As enzimas imobilizadas em estruturas de dimensões microscópicas apresentam novos campos de estudos. Os materiais em nanoescala fornecem características que determinam a eficiência dos biocatalisadores, incluindo sua área de

superfície, baixa resistência à transferência de massa, carregamento eficaz e estabilidade das enzimas. Devido a isto, nanomateriais oferecem alta carga de enzima, sendo um fator que aumenta a capacidade biocatalítica (Kim, Grate, & Wang, 2006; Wang, 2006). A inserção de grupos funcionais que possuem oxigénio no grafeno, alteram suas propriedades nomeadamente mecânicas, elétricas e térmicas. A fácil obtenção é uma das qualidades mais importantes, existindo vários métodos para gerar, tanto o grafeno, como o grafeno modificado a partir de grafite e os seus derivados (Park & Ruoff, 2009). No entanto, nenhuma dessas vantagens da modificação química mencionadas podem ser alcançadas com sucesso sem o conhecimento do controlo da proporção da cobertura de grupos funcionais contendo oxigénio, sendo necessário conhecer o seu nível de ordem e homogeneidade. Este conhecimento não é totalmente compreendido devido às divergências existentes entre as previsões teóricas e os experimentos práticos (Fonseca, Zhang, & Cho, 2015).

O óxido de grafeno (GO) e seus derivados foram estudados experimentalmente por ressonância magnética nuclear (^{13}C e ^{1}H NMR) (A. Lerf, H. He, M. Forster, & J. Klinowski, 1998). Acredita-se que o GO tem principalmente grupos hidroxilo (-OH) e epóxido (-O-) no plano basal, as folhas apresentam enrugamento e grupos de ácido carboxílico (-COOH) nas bordas e defeitos estruturais. O GO contém dois tipos de regiões: regiões aromáticas não oxidadas e regiões com oxidação considerável (ver figura 4). O tamanho relativo dessas duas porções depende do grau de oxidação (geralmente avaliado pelo rácio C/O). Muitos modelos teóricos para descrição da superfície de GO foram propostos até hoje, sendo o modelo mais utilizado proposto por Lerf e Klinowski (Anton Lerf, Heyong He, Michael Forster, & Jacek Klinowski, 1998).

Uma conclusão importante através de diferentes trabalhos, é que uma vez que uma parte da folha de grafeno é oxidada, é muito provável que esta região apresente uma taxa de oxidação mais elevada em comparação com a outra região, formando, assim, uma área de nucleação, ou “ilhas” de oxidação a partir do qual mais reações oxidativas podem ocorrer (Yang, Shi, Tu, & Fang, 2014).

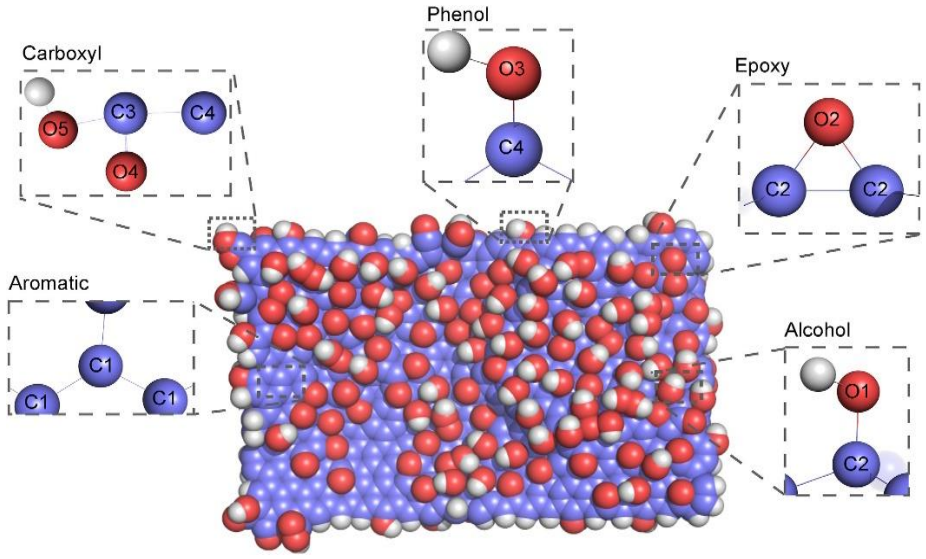


Figura 4 – Representação da folha de grafeno oxidada e seus grupos funcionais (al-Badri, Smith, Sinclair, al-Jamal, & Lorenz, 2021) .

Um estudo sobre a estabilidade de GO foi feito por (Mouhat et al., 2020), onde foram usados modelos semi-ordenados e desordenados com grupos funcionais hidroxilo e epóxido numa proporção 2:1. A funcionalização com grupos ácidos carboxílicos foram descartados pois são experimentalmente conhecidas por estarem em baixa proporção quando comparadas aos epóxidos e hidroxilos. Primeiro foram construídos modelos semi-ordenados, onde os grupos funcionais foram concentrados em uma das metades da folha de grafeno, e para o modelo aleatório, as posições dos grupos hidroxilo e epóxido foram escolhidas aleatoriamente entre todos os átomos de carbono. Os resultados obtidos foram mais estáveis para o GO semi-ordenado, sendo apresentadas duas explicações para este facto. Primeiro, um grupo funcional ligado a um átomo de carbono induz alguma tensão nos átomos vizinhos. No modelo aleatório, uma parte significativa do grafeno é perturbado, em contraste com o modelo semi-ordenado, onde existem porções mais extensas sem oxidação, portanto, possuindo energia mais baixa; e segundo, a proximidade dos grupos funcionais na estrutura semi-ordenada leva a um maior número de ligações de hidrogénio intramoleculares, estabilizando o óxido de grafeno (Mouhat et al., 2020).

Apesar da determinação da estrutura de GO ser essencial para a realização de futuras aplicações tecnológicas, o óxido de grafeno possui um modelo estrutural amorfo. No entanto alguns cálculos revelaram uma tendência para essas estruturas, que possuem regiões localmente ordenadas, mas ao longo de toda superfície, são desordenadas, criando assim regiões aleatórias arómaticas e oxidadas. Estes

resultados estão em consonância com as observações experimentais de GOs amorfos, e também ajuda a compreender os modelos teóricos anteriores (Liu et al., 2012).

Com essa dificuldade explícita de controlar a produção de GOs, as propriedades eletrónicas e estruturais dos GOs tem sido extensivamente estudadas tanto a nível experimental como computacional. Métodos computacionais constituem um forte aliado para a percepção e modelação, com a finalidade de auxiliar a produção dessas estruturas, um processo cada vez mais otimizado para que se consigam ter resultados concordantes entre estudos experimentais e computacionais (Fonseca et al., 2015).

Depois de uma melhor compreenssão das superfícies para imobilização e a estrutura da MHETase, é de extrema importância dar continuidade aos estudos que dizem respeito à ligação de biomacromoléculas. Como mencionado, a folha de GO é enriquecida com grupos contendo oxigénio, tornando possível imobilizar enzimas sem qualquer modificação superficial ou reagentes de acoplamento, mas há outros fatores que precisam de ser ajustados como a nutureza do *linker*, um ponto muito importante a explorar (Zhang et al., 2010).

Revisões recentes das interações enzimas vs. superfícies contribuem para entender essa o processo de imobilização, sendo ajustadas de modo que a atividade e estabilidade possam ser aumentadas. Estes avanços sugerem que uma variedade muito maior de enzimas podem eventualmente ser passíveis de imobilização como catalisadores verdes. Isto foi alcançado por técnicas de espectroscopia de superfície sensível que permitem monitorização de variações na estrutura, conformação e propriedades eletrónicas das enzimas (Hoarau et al., 2017).

Toda a informação referida, auxiliou nas pesquisas e estudos descritos a seguir, seguindo literaturas validadas como base para as análises computacionais no que toca a interações entre superfície e proteína.

Capítulo 2: Metodologia

1. Mecânica Estatística

O objetivo principal da mecânica estatística é relacionar as propriedades microscópicas de sistemas físicos com suas propriedades macroscópicas tal como a termodinâmica clássica (Física, 2003/2004; Teixeira, 2012).

Considere-se um sistema qualquer de partículas como átomos, moléculas, gás, osciladores harmónicos e etc. com energia total E_r, e em que existem várias maneiras dessas partículas do sistema terem essa energia total E_r. Chamamos isto de um "estado do sistema" particular de entre muitos que, podem ser enumerados. Classicamente, o estado de uma partícula é descrito pela sua posição e momento linear. De acordo com as leis de mecânica clássica (leis de Newton), uma vez que este estado é especificado, podemos saber como ele evolui no tempo (Teixeira, 2012). Com o conhecimento de cada propriedade individual das partícula que constituem o sistema, torna-se possível antever as propriedades do sistema como um todo (N., S., P.A., & M.J., 2015/2016).

A dimensão macroscópica, o estado termodinâmico de um sistema (macroestado) pode ser caracterizado através da especificação de um pequeno conjunto de propriedades, designadas funções de estados: como volume, temperatura, pressão e o número de partículas por exemplo. Cada macroestado possui um número enorme de microestados associados, um número infinito na aproximação clássica, e nessa aproximação, cada um desses microestados pode ser caracterizado através de um conhecimento das posições e quantidade de movimento de cada uma das partículas do sistema (N. et al., 2015/2016). Com isso surge o *ensemble*, com uma propriedade termodinâmica observável, que é uma média desses estados microscópicos de um sistema. E a escolha apropriada de um *ensemble* está associada às condições de contorno impostas ao sistema em estudo. Os sistemas mais comuns, estudados por simulações de dinâmica molecular (DM), estão sob as condições do *ensemble* canónico, com temperatura T, volume V e número N de moléculas constantes sendo a sigla associada NVT. Outro *ensemble* é o isobárico-isotérmico (NPT), onde P é a pressão do sistema (Barlette, 1999).

A função de partição canónica (NVT) é dada por (N. et al., 2015/2016):

$$\Pi(r,p)=\frac{e^{-\beta H(r,p)}}{h^{3N}N!Q_{(NVT)}} \quad (1)$$

E a função isobárico-isotérmico é representada pela seguinte equação (N. et al., 2015/2016):

$$Q_{(NPT)}=\frac{1}{h^{3N}N!V_0}\int_r\int_p\int_V e^{-\beta(H(r,p)+PV)}\,drdpdV=\int_V e^{-\beta PV}Q_{(NVT)}dV \quad (2)$$

2. Mecânica Molecular

Este método calcula a estrutura e a energia das moléculas com base nas posições relativas dos núcleos. Os elétrões não são considerados explicitamente, e é assumido que eles encontram uma distribuição ótima ao redor do núcleo, onde este se encontra em uma posição conhecida. Esta ideia é baseada na aproximação de *Born-Oppenheimer*, que estabelece que os núcleos são mais pesados e, com isso se movem mais lentamente que os eletrões. Assim, os movimentos nucleares, vibrações e as rotações podem ser estudadas separadamente, admitindo que os elétrões acompanham rapidamente e se ajustando aos movimentos do núcleo, com isso, afirma-se que a densidade eletrónica se ajusta instantâneamente a qualquer alteração na configuração geométrica do núcleo e estes possuem movimento livre (Coelho, 1999; Rodrigues, 2001). A superfície de *Born-Oppenheimer*, conhecida na mecânica molecular (MM) como superfície de energia potencial, é multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares (Coelho, 1999).

Cálculos de MM utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de *Born-Oppenheimer*, cujo formalismo matemático está baseado num modelo de mecânica clássica de estrutura molecular (Coelho, 1999).

A mecânica molecular é abordada como sinónimo de campo de força, um método de cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de pontecial empíricos, tratando as moléculas como um conjunto de partículas com determinada massa que estão ligadas entre si por um conjunto de molas (N. et al., 2015/2016; C. M. R. Sant'Anna, 2002). Informações sobre distâncias e ângulos “normais” ou “naturais” de ligação determinadas experimentalmente são facilmente encontradas na literatura; assim, os campos de forças desenvolvidos envolvem um conjunto de funções de energia que determinam penalizações energéticas para o afastamento da estrutura desses valores “normais” (C. Sant'Anna, 2009). Estes campos de forças são constituídos pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema, como as distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de *van der Waals*, ligações por ponte de hidrogénio e interações eletrostáticas principalmente. Para descrever o seu movimento/interações, são utilizadas as leis da mecânica clássica. A principal vantagem da MM reside na sua rapidez na avaliação de sistemas moleculares complexos, pois não incluem explicitamente os eletrões nos cálculos, sendo considerados apenas os núcleos dos átomos. Desta forma, não são calculadas quantidades absolutas, mas, sim, diferenças de energia entre duas ou mais conformações (Barreiro, 1997; Pessôa, Correia, Carauta, & Silva, 2018).

2.1. Campo de forças

Um campo de força consiste numa equação que calcula a energia do sistema em função das posições atómicas e também o conjunto de parâmetros que permitem a aplicação da equação, ou seja, ele representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas. Esta energia da molécula é calculada pela diferença entre a energia da molécula real com a energia da molécula hipotética, onde nesta última todos os parâmetros estruturais são exatamente os valores ideias ou “naturais”, definidos para uma situação hipotética onde não existem quaisquer tensões entre as coordenadas internas do sistema molecular (N. et al., 2015/2016; C. M. R. Sant'Anna, 2002). Existe uma literatura vasta sobre campos de forças diferentes, mas, de modo geral, eles tem em comum uma forma geral pela qual a energia total do sistema é decomposta em vários termos independentes, e a energia do campo de força é escrita como uma soma desses termos, cada um

descrevendo a energia requerida para distorcer a molécula em um modo específico (Segalin, 2008). Sendo então essa equação geral descrita como (N. et al., 2015/2016):

$$V_t = V_{lig} + V_\theta + V_\omega + V_{vdw} + V_{el} + V_{cruz} \quad (3)$$

2.1.1. Termo da Energia Potencial de Ligação

Descreve a interação entre dois átomos ligados, seguindo as regras da mecânica clássica, e representa o movimento vibracional entre os pares através de um potencial harmónico. A energia da deformação da ligação, seja enlongamento ou compressão, é caracterizada pela seguinte equação (N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008):

$$V_{lig} = \frac{1}{2} K_{lig} (l - l_{eq})^2 \quad (4)$$

2.1.2. Termo da Energia Potencial Angular

A deformação dos ângulos de ligação, composto por 3 átomos ligados em sequência, também pode ser descrita segundo uma aproximação harmónica como no caso anterior pela equação (N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008):

$$V_\theta = \frac{1}{2} V_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad (5)$$

2.1.3. Termo da Energia Potencial Torcional

O termo referente aos diedros próprios é constituído por quatros átomos em sequência, e a energia de torção corresponde à variação de energia associada à rotação da ligação desse diedro. Os 3 primeiros átomos formam um plano com um certo ângulo entre outro plano formado pelos 3 últimos. Assim esses ângulos podem assumir posições preferenciais, associadas às possíveis configurações que o conjunto de átomos podem adquirir (N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008).

A função matemática que pode descrever este tipo de torção é dada por:

$$V_{\omega} = \frac{1}{2}\sum_{i} k_{died}\left[1+\cos(n\omega-\gamma)\right] \tag{6}$$

2.1.4. Termo da Energia de *van der Waals*

Faz parte dos termos de energias não ligados, ou seja, os átomos não diretamente ligados entre si. Este termo descreve a função da distância entre os núcleos e as interações não ligadas entre átomos separados por mais do que duas ligações e representa forças de curto alcance. Em grandes distâncias inter-atómicas, elas são consideradas igual a zero e, para distâncias mínimas, tornam-se repulsivas devido à sobreposição excessiva das nuvens eletrónicas (Barreiro, 1997; N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008). Em distâncias intermédias há, contudo, uma certa atração entre as nuvens eletrónicas promovida pelas interações dipolo instantâneo-dipolo induzido (N. et al., 2015/2016). Ou seja, as interações de *van der Waals* ocorrem quando dois átomos não ligados são aproximados, e a atração entre eles aumenta (decréscimo na energia). Quando a distância entre eles é igual à soma dos raios de *van der Waals*, a atração é máxima. Se estes são aproximados ainda mais, ocorre uma repulsão forte (Rodrigues, 2001). A energia potencial total das interações entre um par de átomos é a soma das energias das forças atrativas (forças de dispersão de *London*) e das forças repulsivas (repulsões de *van der Waals* ou de *Pauli*) (Barreiro, 1997).

Como em mecânica molecular os átomos são descritos com simetria esférica, os potenciais inter-atómicos tornam-se dependentes apenas da distância entre os átomos em questão, e uma das equações mais utilizadas para estes potenciais é (N. et al., 2015/2016):

$$V_{vdw}(i,j) = 4\varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] \quad (7)$$

O potencial mais utilizado em dinâmica molecular é o de *Lennard-Jones*, mas não é o que oferece o resultado mais rigoroso, porém, representa um bom compromisso em relação à sua exatidão e aos recursos computacionais utilizados (N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008).

2.1.5. Energia Eletrostática

A energia eletrostática também não possui átomos diretamente ligados entre si e descreve interações que resultam das cargas ou dipolos permanentes das moléculas. Esta interação é calculada pela soma das interações entre as partes positivas e negativas da molécula, onde normalmente se utiliza o potencial de *Coulomb* para tratar deste cálculo (N. et al., 2015/2016; Segalin, 2008):

$$V_{el}(i,j) = \frac{1}{4\pi\varepsilon}\frac{q_i q_j}{r_{i,j}} \quad (8)$$

2.1.6. Energia dos termos cruzados

Por fim, este termo permite correlacionar todos os termos presentes no campo de forças, onde basicamente relaciona termos distintos, tais como, comprimento-comprimento, comprimento-ângulo, além de incluir mais do que duas coordenadas internas, como ângulo-ângulo-torção por exemplo (N. et al., 2015/2016). Este termo ainda náo é amplamente utilizado, pois sua implementação gera um alto custo computacional, consequentemente, aumentando muito o tempo de simulação (Segalin, 2008).

2.2. Campos de forças disponíveis

Há vários campos de força presentes que são amplamente utilizados e validados na literatura disponível. Estes campos de forças são desenvolvidos de acordo com a necessidade de se estudar uma determinada classe de compostos e suas respetivas interações, pelo que deve ser escolhido o campo de forças mais específico e cuja parametrização mais se adapta aos sistemas moleculares em estudo. (Pessôa et al., 2018).

Com o tempo, foram surgindo outros campos de forças com parametrizações mais generalizadas, com parâmetros para todos os átomos do sistema, incluindo também os hidrogénios, sendo estes campos de forças denominado "*All-Atom*", buscando, assim, descrever um conjunto maior de classes de compostos (N. et al., 2015/2016; Pessôa et al., 2018). Vale a pena apontar que, por não incluir os eletrões nos cálculos, não é possivel desenvolver a formação e quebra de ligações químicas, por isso a escolha do método é importante, onde as parametrizações do campo de forças escolhido seja ideal com o tipo de estudo a ser executado, para que se obtenha os resultados desejados (Pessôa et al., 2018).

Em caso de sistema biomoleculares, os campos de forças mais utilizados são: o CHARMM, GROMOS, AMBER, OPLS, CVFF entre outros (Namba, Silva, & Silva, 2008).

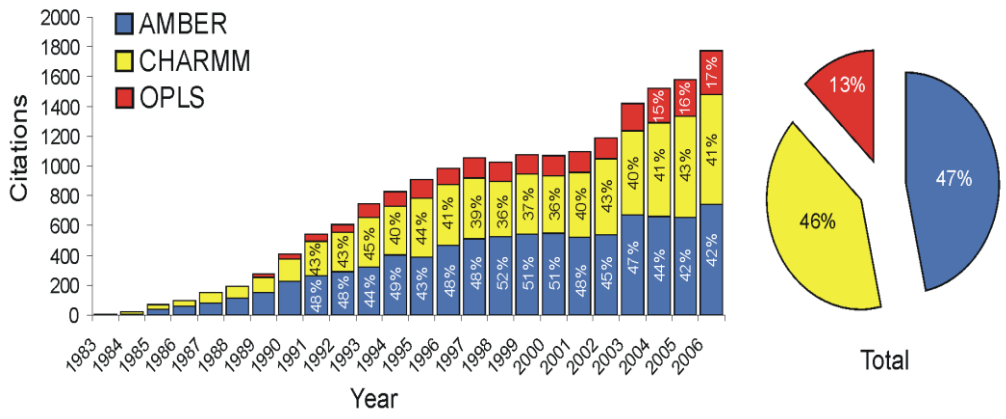


Figura 5 – Número de citações dos campos de forças mais utilizados em química e bioquímica computacional (os dados foram retirados da base de dados ISI Web of Science (2007): AMBER, CHARMM, and OPLS (N. et al., 2015/2016).

3. Condições Iniciais e Minimização para Dinâmica Molecular

Para se realizar uma simulação de DM é importante especificar as posições iniciais das partículas que constituem o sistema, além de ser conveniente situar, inicialmente, as partículas nas posições de uma rede cristalina, evitando a sobreposição indesejada entre elas, gerando uma caixa de simulação que pode adotar diferentes geometrias (Namba et al., 2008).

A minimização de energia ou otimização da geometria é extremamente necessária antes de se efetuar a simulação por DM, principalmente quando se efetua alguma modificação no sistema, podendo essas alterações serem solvatação, inserção de íons, temperatura ou alguma modificação de outros parâmetros da simulação (Segalin, 2008).

A otimização de geometria de uma estrutura molecular ocorre pela modificação dos ângulos e dos comprimentos das ligações dos átomos originais, eliminando maus contactos entre átomos e fornecendo novas conformações, com objetivo de minimizar a energia potencial do sistema de interesse. Assim, é removida qualquer tensão local para impedir a existência de forças grandes, que provocaria um valor elevado na aceleração e velocidade local, implicando grandes deslocamentos das partículas do sistema e não satisfazendo as condições para a simulação (Namba et al., 2008; Pessôa et al., 2018; Segalin, 2008). Sendo uma técnica que visa encontrar o conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema, o procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce. Desta forma o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo,

através de ajustes nas posições atómicas, relaxamento das distorções nas ligações químicas e também nos termos de energias não ligados, como as de *van der Waals* por exemplo (Namba et al., 2008).

Quando o processo de otimização de geomotria atinge os critérios estabelecidos, a estrutura gerada encontra-se num mínimo de energia local e o processo de minimização é finalizado (Pessôa et al., 2018).

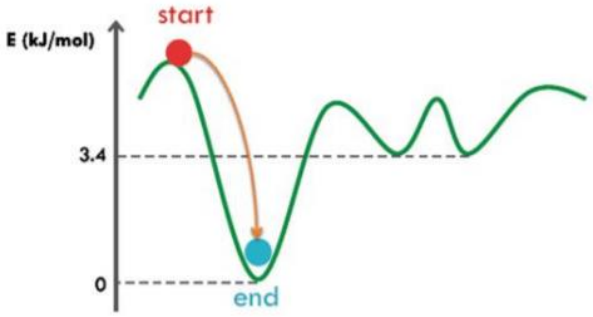


Figura 6 – Representação do potencial de um sistema, onde começa com uma configuração de maior energia (START) e procura um local mínimo de energia (END) (Martins, 2012).

3.1. *Steepest Descent*

Este algoritmo utiliza como procedimento a determinação da direção do mínimo de energia pela primeira derivada, geralmente usada no início de uma minimização quando as estruturas estão longe de um ponto mínimo. Um método com uma grande desvantagem para funções que tem estruturas de mínimos longas e estreitas, exigindo um grande número de iterações fazendo que a convergência seja demorada (Pessôa et al., 2018). Não é o método mais eficiente a nível de procura do mínimo de energia, mas, é o mais rápido e robusto, tendo em consideração que deve ser usado em sistemas pequenos e simples (Martins, 2012).

3.2. Velocidades Iniciais

Além das posições iniciais do sistema, este deve ter velocidades iniciais associadas para a solução da equação do movimento. O sistema pode ser iniciado a partir do repouso, atribuindo velocidades iniciais nula às partículas do sistema, ou usar a distribuição de *Maxwell-Boltzman* para atribuir as velocidades (GONCALVES, 2012).

4. Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular é uma ferramenta computacional poderosa, muito versátil para estudos de macromoléculas biológicas, sendo esta uma extensão da mecânica molecular, onde o comportamento dinâmico de um sistema molecular é simulado através da integração numérica das equações de movimento. Para obter propriedades macroscópicas de interesse, a aplicação da mecânica estatística também é requerida, com a função de calcular propriedades macroscópicas como pressão, energia interna, volume e temperatura a partir de outras microscópicas (Namba et al., 2008).

É um procedimento que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou átomos individuais, de acordo com as leis de Newton, mais especificamente a 2ª lei, onde a intensidade e a direção do movimento (velocidade) são regidas por forças que os átomos exercem uns sobre os outros. As forças que agem nos átomos, necessárias para simular os seus movimentos, são calculadas usando campo de forças da mecânica molecular (C. M. R. Sant'Anna, 2002).

Assim, as simulações com DM resolvem as equações do movimento de Newton, usando a metodologia baseada na MM clássica, para descrever o movimento dos átomos. Para um sistema de N partículas em interação temos (Segalin, 2008):

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \tag{9}$$

As forças são representadas pela derivada negativa da função potencial $V(r_1, r_2, \ldots r_N)$ (Segalin, 2008):

$$\vec{F}_i = -\frac{dV}{d\vec{r}_i} \tag{10}$$

Essas equações são resolvidas, simultaneamente, em sucessivos e pequenos intervalos de tempo, com um *time-step* finito (Δt), onde, na evolução temporal dos sistemas, as coordenadas das partículas são registadas para cada um desses intervalos, resultando na trajetória do sistema. O tratamento estatístico desses dados fornecem as propriedades macroscópicas (Segalin, 2008).

Com isso, a DM permite o acompanhamento da evolução de um sistema molecular em função do tempo. O tempo de simulação é sempre um aspeto crítico quando se fala de dinâmica molecular. A escolha do valor de Δt é fundamental porque, se for pequeno, o sistema não explora o espaço conformacional extensivamente e, se for grande, as constantes de movimento podem manter-se invariantes, pois uma molécula pode adotar diferentes movimentos com escalas de tempos distintas; de movimentos rápidos como flutuações atómicas até os mais lentos como associação/dissociação de subunidades e rearranjos no sistema total, então este tempo de simulação escolhido deve ser adequado aos tipos de movimentos que se deseja estudar (N. et al., 2015/2016; Rino & Studart, 2001).

4.1. Integração das Equações do Movimento

Após determinar as posições e velocidades iniciais, a próxima etapa consiste em calcular estas no passo seguinte (t + Δt) integrando as equações de movimento de Newton, sendo esta uma equação diferencial de segunda ordem acoplada (GONCALVES, 2012).

Em prática, a dinâmica molecular constitui um método de gerar um *ensemble* de microestados, a partir do qual se pode extrair informação sobre o sistema em estudo. O método calcula a trajetória de todas as partículas do sistema para obter um conjunto de

microestados ordenado cronologicamente. Para isto, a força resultante que atua em cada átomo é calculada e integra-se nas equações do movimento de forma a conhecer as suas posições em função do tempo (N. et al., 2015/2016).

4.2. Constrangimentos (*constraints*) e restrições (*restraints*) moleculares

Os sistemas moleculares apresentam movimentos que acontecem em diferentes escalas temporais. Como dito mais acima, movimentos vibracionais são muito mais rápidos do que os translacionais ou rotacionais. Uma técnica bastante comum no estudo por DM de moléculas flexíveis é a escolha de um *time-step* que seja, pelo menos, uma ordem de grandeza menor que a escala temporal associada ao movimento mais rápido que se encontra nesse sistema. E uma solução comum para que possamos aumentar esse *time-step* sem comprometer a estabilidade numérica da simulação, consiste em constrangir as ligações correspondentes ao seus valores de equilíbrio, sem afetar os outros graus de liberdade dos átomos envolvidos. Estes constrangimentos dos graus de liberdade correspondentes aos movimentos de maior frequência, como por exemplo as ligações que contêm átomos de hidrogénio fazem com que as vibrações das ligações que envolvem átomos mais pesados passem a ser as frequências ativas mais elevadas, permitindo a utilização de um *time-step* de 2 fs. Mas este *time-step* mais adequado também depende da temperatura usada na simulação, sendo que esta influencia diretamente no movimento atómico. Com um passo temporal maior na integração dos movimentos pode-se conseguir uma maior eficiência, além de reduzir consideravelmente o custo computacional (Frenkel & Smit, 2002; N. et al., 2015/2016).

4.3. Modelos de solvatação

Simular uma molécula em vácuo é geralmente não convencional, pois na maioria dos casos o efeito do ambiente molecular (por exemplo, uma proteína que está presente dentro de uma célula) é extremamente relevante. Com essa ideia, dois modelos de solvatação são os mais utilizados; modelos explícitos e implícitos (García-Iriepa, Zemmouche, Ponce-Vargas, & Navizet, 2019).

Em modelos explícitos, centenas ou milhares de moléculas de solvente (geralmente H_2O) são introduzidas no sistema como um componente adicional e a representação atomística das moléculas de solvente é mantida e, portanto, as interações soluto-solvente são consideradas (Bizzarri & Cannistraro, 2002; García-Iriepa et al., 2019). Isso permite uma simulação mais fiel e precisa do ambiente natural, em comparação com os modelos de solvatação implícitos (García-Iriepa et al., 2019). Vários potenciais foram desenvolvidos e parametrizados para descrever as moléculas de água explícitas, sendo os mais utilizados da família TIP (*Transferable Intermolecular Potentials)* (Namba et al., 2008).

O modelo implícito de solvatação considera a influência média do solvente, através da estimativa direta, da energia livre de solvatação, definida como o trabalho reversível necessário para transferir o soluto em uma configuração fixa do vácuo para a solução. O método de solvatação implícita não considera os graus de liberdade do solvente explicitamente, mas trata-o como um meio contínuo. Este modelo é usado em casos quando o sistema de proteína é tão grande, que torna-se necessário usá-lo para que seja reduzido o custo computacional das simulações (Namba et al., 2008).

4.4. Controle de temperatura de pressão

O controlo da temperatura em simulações de DM tem influências significativas na fidelidade a respeito dos fenómenos de transporte. A temperatura do sistema é controlada por termostatos com base num *feedback* global, e dissipam a energia de maneira uniforme por todo o sistema. Estes termostatos dispersam a energia na escala espacialmente localizada de um ponto de vista estocástico. As partículas mais “frias” recebem mais energia, enquanto as mais “quentes” são arrefecidas (Yong & Zhang, 2013).

Os termostatos desenvolvidos atualmente apresentam diferentes algoritmos, e dependendo do propósito da simulação, a escolha destes é fundamental. Exemplos de termostatos bastante utilizados são o de *Langevin*, *Nosé-Hoover* e de *Berendsen* (Berendsen, Postma, van Gunsteren, DiNola, & Haak, 1984; Yong & Zhang, 2013).

Os barostatos, de um modo geral, lidam com controlo da pressão, onde o objetivo do método de acoplamento barostático é alterar o tensor de pressão instantâneo de modo que, em média, a tensão externa seja recuperada. Este efeito é

quantificado pelo tempo de relaxamento barostático. Este parâmetro de entrada introduz uma escala de tempo para o sistema responder a uma pressão externa. Assim, um baixo tempo de relaxamento do barostato indica um barostato muito violento, que interfere fortemente na dinâmica do sistema. E no outro extremo, com alto tempo de relaxamento influenciam o sistema de forma muito menos abrupta, e o sistema precisará de mais tempo para se adaptar a nova condição de pressão (Rogge et al., 2015). Os barostatos de *Berendsen* e *Parrinelo-Raham* são um dos mais utilizados.

4.5. Condições Periódicas de Fronteiras

Os sistemas simulados são, geralmente, constituídos por 1000 a 300000 átomos contidos em um modelo de caixa para simulação de forma cúbica, paralelepípeda ou octaédrica geralmente (N. et al., 2015/2016).

Condições Periódicas de Fronteiras (PBC) são usadas para minimizar os efeitos de fronteira do sistema. Neste método, os átomos são inseridos numa caixa com certas dimensões, que é rodeada por cópias de si mesma ("Chapter 2 - Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS," 2019). Assim, quando um átomo se move na caixa original, a sua imagem periódica, em uma das caixas replicadas, move-se da mesma maneira, ou seja, se um átomo sai da caixa original, outro átomo, oriundo da caixa replicada, entra pela face oposta com a mesma velocidade com que o outro saiu (ver figura 7) (Namba et al., 2008).

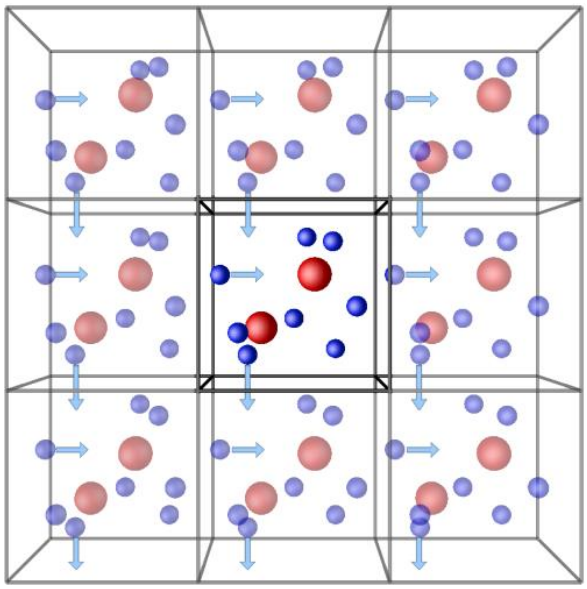


Figura 7 – Representação esquemática da ideia das Condições Periódicas de Fronteiras (Petkov, 2010).

Se esta condição não for imposta, a geometria molecular simulada desenvolverá interfase com o ambiente. Fisicamente, esta situação implica que a fase estará em contacto com o meio ambiente. E para os critérios de simulação, o ambiente seria o vácuo, o que exigiria condições de fronteira adicionais a serem aplicadas e possivelmente produziria resultados erróneos ("Chapter 2 - Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS," 2019).

As condições periódicas de fronteira permitem, assim, ultrapassar os efeitos de superfície, representando um método artificial de aumentar a dimensão do sistema em estudo. No entanto, também torna necessário que a caixa de simulação seja grande o suficiente para que cada molécula interaja, de uma forma pouco significativa, com cada repetição periódica das moléculas mais próximas (N. et al., 2015/2016).

4.6. Cálculos das Forças de Longo Alcance

A utilização das condições periódicas de fronteira, necessárias para evitar o problema de efeito de fronteira, gera a necessidade de contabilizar as interações eletrostáticas de todas as partículas na caixa de simulação com todas as réplicas periódicas do sistema. O custo computacional referente ao cálculo do potencial eletrostático para o sistema inteiro varia com o quadrado do número de partículas, N^2. Para tentar otimizar o tempo computacional, pode ser realizado um ponto de corte,

desprezando as interações superiores a essa distância, além de ter em conta que a interação dessas partículas com suas próprias imagens nas PBC sejam evitadas. Sendo esta uma das várias formas de aproximar o cálculo das interações de longo alcance (SILVA, 2019).

Várias metodologias foram desenvolvidas para permitir o uso do raio de corte, mantendo, de certa forma, as interações realizadas entre um átomo de interesse e aqueles que estão a sua volta, sendo um dos métodos mais utilizados os baseados nas somas de *Ewald*, como o PME (*Particle Mesh-Ewald*) (SILVA, 2019).

5. Programas para simular a Dinâmica Molecular

Estão disponíveis diversos programas para os vários métodos utilizados. Sendo a escolha de qual *softwares* usar, ser bastante pessoal e claro, compatível com o objeto de estudo, além do recurso financeiro disponível, pois alguns pacotes tem um custo elevado. Porém, muitos encontram-se disponíveis gratuitamente e com boa validação em referências bibliográficas, e essas revisões da literatura são de grande ajuda na escolha de qual programa que irá melhor auxiliar na pesquisa a qual esta sendo desenvolvida (Pessôa et al., 2018).

O GROMACS (*GROningem Machine for Chemical Simulation*) é um pacote de *software*, usado para criar sistemas físicos consistindo de partículas, de centenas a milhões, e resolver as equações de movimentos newtonianas. O GROMACS é um código muito adequado, servindo para melhorar a compreensão sobre o comportamento da matéria a nível molecular, sendo este, um dos códigos abertos amplamente aceito e construído principalmente para simulações dinâmicas de biomoléculas e movimentos complexo de partículas ("Chapter 2 - Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS," 2019).

Entre este citado acima, há vários outros que também possuem boa credibilidade e amplo uso, como o AMBER e o CHARMM por exemplo.

6. Simulação em Dinâmica Molecular da superfície de Óxido de Grafeno

Após apresentadas as metodologias para uma simulação usando dinâmica molecular, o primeiro passo foi a escolha dos métodos mais adequados através de revisão da literatura para simular as superfícies de GO usadas na adsorção da enzima MHETase.

6.1. Preparo das superfícies

Para isso, foram feitas folhas periódicas com 5 graus diferentes de oxidações C/0 (2.0 2.25 2.5 2.75 3.0) e folha pura (*Pristine*), ao qual não apresenta nenhuma oxidação (ver figura 8). Através de uma extensa revisão de literatura, as estruturas foram feitas por um *script* (GO_sheet.py) presente no *site* *https://github.com/velocirobbie/make-graphitics* *(Github, 2018)* publicado em (Sinclair, Suter, & Coveney, 2018), sendo este um algoritmo que utiliza parâmetros de reatividade oxidativa, baseado em cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (Yang et al., 2014). Todas as folhas apresentam um tamanho de 150 Å x 150 Å, cada. Estes diferentes graus de oxidação tem o intuito de analisar a relação entre o grau de saturação de grupos funcionais com a geometria das folhas, e verificar o efeito desses grupos na adsorção da proteína.

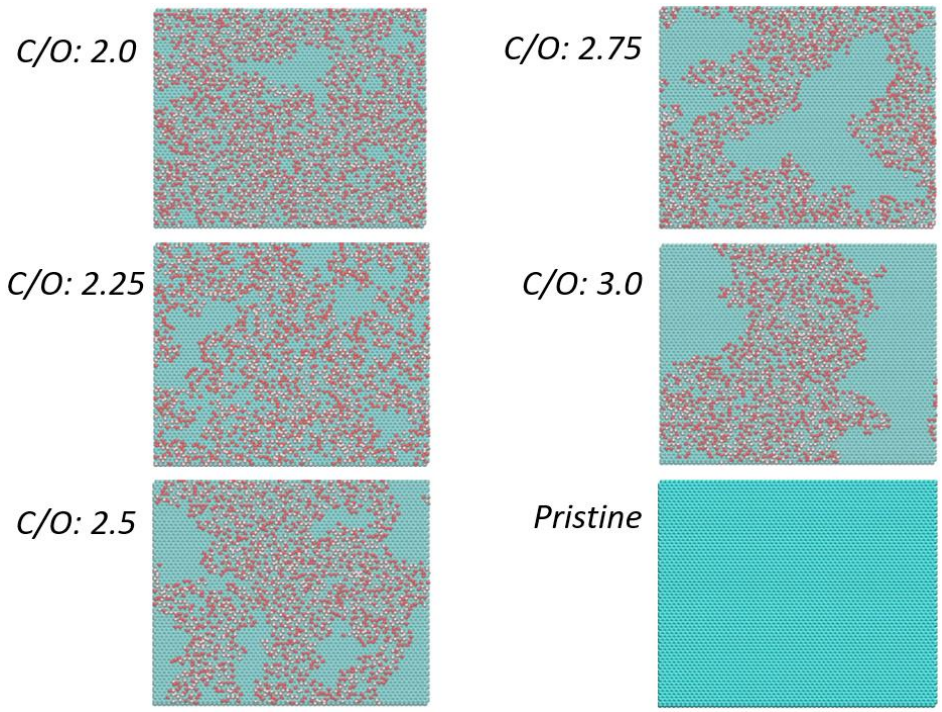


Figura 8 – Estruturas para análises de óxido grafeno com 5 diferentes graus de oxidações e grafeno geradas com um *script* presente no makegraphitics.

6.2. Campo de Forças

A escolha do campo de forças é bastante importante para as simulações, tendo em conta a literatura. Foram usados dois campos de força, escolhidos devido seus amplos usos e principalmente sua validação na literatura. Sendo estes o GAFF2 do Amber e o OPLS-AA do GROMACS.

Nesta primeira parte do projeto, em que ocorrerem as simulações das estruturas para adsorção da proteína, é necessário validá-las para, assim, poder dar continuidade com a segunda parte.

Como a ferramenta utilizada para simular a dinâmica molecular foi o GROMACS, foi preciso reparametrizar as folhas que são obtidas do *makegraphitics* em formato do LAMMPS. Para isso, foram gerados modelos reduzidos das estruturas e submetidos ao servidor online do ACPYPE. Isto permitiu a construção de uma libraria de parâmetros GAFF2 a ser lido pelo GROMACS. Para as cargas parciais foi usado um *Scale Charge Model* (SESP), retirado do artigo de (Stauffer et al., 2014), sendo, este, mais adequado para as interações eletrostáticas. Na parametrização com OPLS-AA utilizaram-se os mesmo tipos de átomos e cargas presentes na topologia em formato LAMMPS do

makegraphitics. Após a criação de uma topologia primitiva pela ferramenta *x2top*, com parâmetros *bond*, *angles*, *dihedrals* e *impropers* implícitos, a conectividade da molécula é substituída pela presente no ficheiro de topologia do LAMMPS. A topologia modificada é submetida á ferramenta *grompp*, e é gerada uma topologia processada com os novos parâmetros GAFF2 e OPLS-AA escritos explicitamente.

Com esses procedimentos geramos 12 folhas: 6 folhas para cada campo de força usado. Com isso cada campo de força gerou 5 estruturas oxidadas usando os diferentes graus de oxidações C/O (2.0 2.25 2.5 2.75 3.0) e a folha pura (*Pristine*).

6.3. Simulação com Dinâmica Molecular

Todas simulações das folhas em água foram corridas com os mesmos parâmetros, a diferença entra elas foi o uso do campo de força GAFF2 e o OPLS-AA.

Com as folhas parametrizadas, inicialmente, elas foram analisadas em solvente aquoso com DM, para apurar as interações com esta solução e obter validação dos modelos. Para isso, essas superfícies de óxido de grafeno foram solvatadas explicitamente com o modelo de água TIP3P, numa caixa com 80 Å de altura.

O sistema foi relaxado energeticamente através de duas minimizações, a primeira, com restrições posicionais de 1000 kj/mol para o solvente e a segunda, sem nenhuma restrição, ocorrendo uma relaxação do sistema total. Geralmente, as minimizações ocorrem nas águas primeiro, mas como as estruturas iniciais do GO são muito irrealistas, as superfícies foram minimizadas primeiro. Estas duas etapas aconteceram com o algoritmo *steepest-descent* utilizando um critério limite de 1000.0 kj/mol/nm.

A seguir, estes sistemas minimizados foram submetidos a duas etapas de equilibração, começando com NVT durante 100 ps, com *time-step* de 2 fs, em uma temperatura crescente de 0 a 303.15 K com o termostato *V-rescale*. Ainda na equilibração, após atingir a temperatura máxima dita acima, foi corrida uma simulação em NPT, onde o sistema foi equilibrado durante 1000 ps com *time-step* 2 fs, para levar o sistema a pressão de referência (1 bar) controlada pelo barostato *Parrinelo-Rahman* e a temperatura mantida constante em 303.15 K, mas usando o termostato *Nosé-Hoover*.

Atingindo o equilíbrio, os sistemas foram submetidos à fase de produção, onde foi usado um *time-step* de 2 fs durante 50000 ps (50 ns), a uma temperatura de 303.15 K pelo termostáto *Nosé-Hoover* e pressão 1 bar equilibrada pelo barostato *Parrinelo-Rahman*. Os cálculos de equilíbrio e produção foram todos realizados com *Periodic Boundary Conditions*, e utilizou-se um *cutoff* de 1.0 (nm) para *short-range electrostatic cutoff* e 1.0 (nm) em *short-range van der Waals cutoff*. As interações de longo alcance foram tratadas com método PME (*Particle Mesh Ewald*).

Com as dinâmicas moleculares em solvente aquoso, foram obtidas estruturas similares à que se encontra em baixo (ver figura 9).

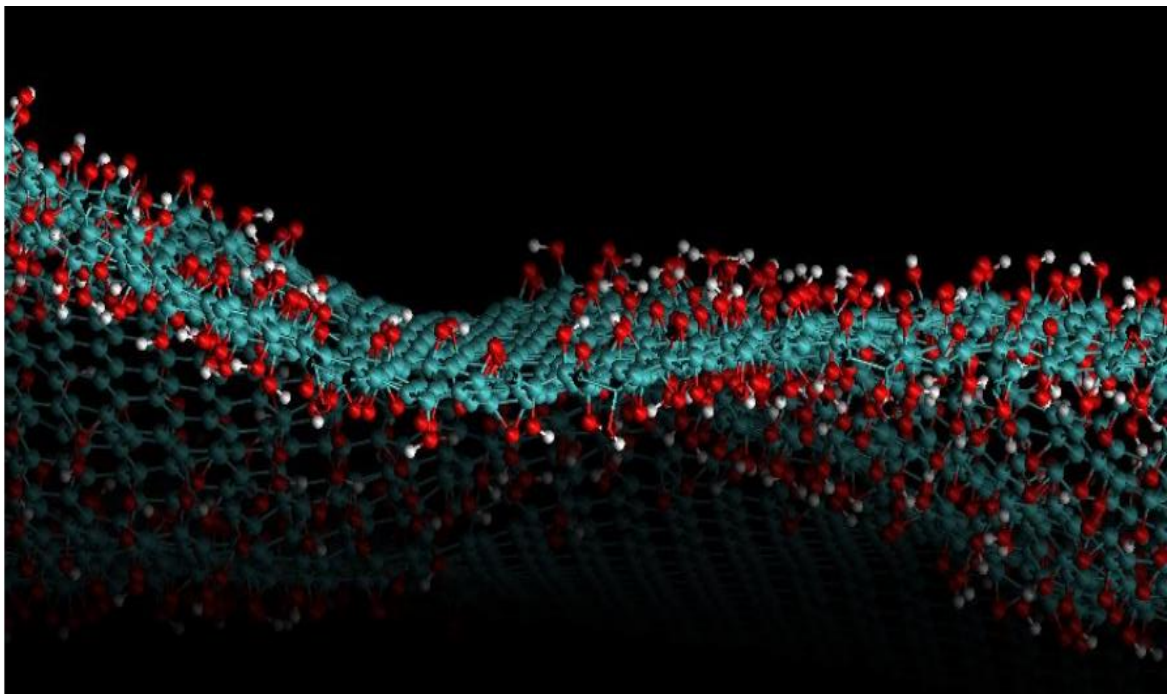


Figura 9 – Folha de óxido de grafeno obtida através do uso da dinâmica molecular.

7. Simulação em Dinâmica Molecular da MHETase

7.1. MHETase em água

Antes da realização das simulação da MHETase com as superfícies de grafeno e óxido de grafeno, é interessante realizar uma simulação dessa proteína em água, com intenção de validação da mesma e comparação destes resultados com os testes realizados na adsorção da protéina na superfície.

Com a obtenção da estrutura da MHETase pelo *site* https://www.rcsb.org/ através do código PDB: 6QGA (RCSB PDB, 2019), que é um *Protein Data Bank* (PDB), um banco de dados em 3D de proteínas e ácidos nucléicos. A parametrização dessa molécula foi feita com o campo de forças *Amber ff99 SB*-ILDN, que tem boa notabilidade em análises de proteínas, sendo este campo de forças usado, extensivamente, para estas análises devido sua validação na literatura. Feita essa escolha, procedemos à solvatação com água explícita TIP3P, a mesma usada com as estruturas de GO, mas com altura de 100 Å. Foram também adicionados 7 contra-iões Na^+ para neutralizar a carga do sistema devido aos resíduos carregados da proteína.

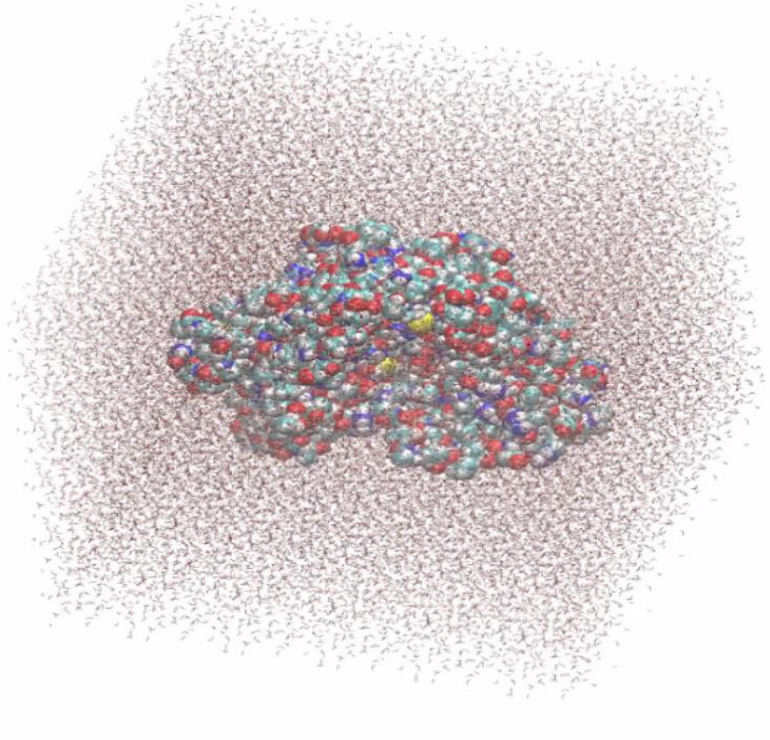


Figura 10 – Proteína solvatada em água explicita TIP3P.

Solvatada a molécula, seguimos para a minimização, onde esta ocorreu com o *steepest-descent*, com um critério limite de 1000.0 kj/mol/nm, em apenas uma etapa sem nenhuma restrição. Com o sistema minimizado, seguiram-se duas etapas de equilibração, onde o NVT correu durante 100 ps, com *time-step* de 2 fs, em uma temperatura crescente de 0 a 303.15 K com o termostato *V-rescale*. E em seguida NPT, onde o sistema foi equilibrado durante 1000 ps com *time-step* 2 fs, para levar o sistema a pressão de referência (1 bar) controlada pelo barostato *Parrinelo-Rahman* e a temperatura mantida constante em 303.15 K, mas usando o termostato *Nosé-Hoover*.

Após equilibrado o sistema, a etapa de produção foi feita com *time-step* de 2 fs em 50000 ps (50 ns), a uma temperatura controlada de 303.15 K, pelo termostáto *Nosé-Hoover,* e pressão 1 bar equilibrada, pelo barostato *Parrinelo-Rahman*. Também se utilizaram nestes cálculos *Periodic Boundary Conditions*, e um *cutoff* de 1.0 (nm) para *short-range electrostatic cutoff* e *short-range van der Waals cutoff*, e as interações de longo alcance tratadas com método PME (*Particle Mesh Ewald*).

7.2. Adsorção da MHETase na superfície

Finalmente, apresentamos a segunda parte do projeto, que consiste num estudo extensivo sobre a adsorção da proteína na superfície de GO. A proteína é simulada em 7 conformações para cada folha, com rotação da enzima ao longo dos eixos X e Y (ver figura 11), com objetivo de analisar as diferenças na adsorção para as conformações, junto com os diferentes graus de oxidações.

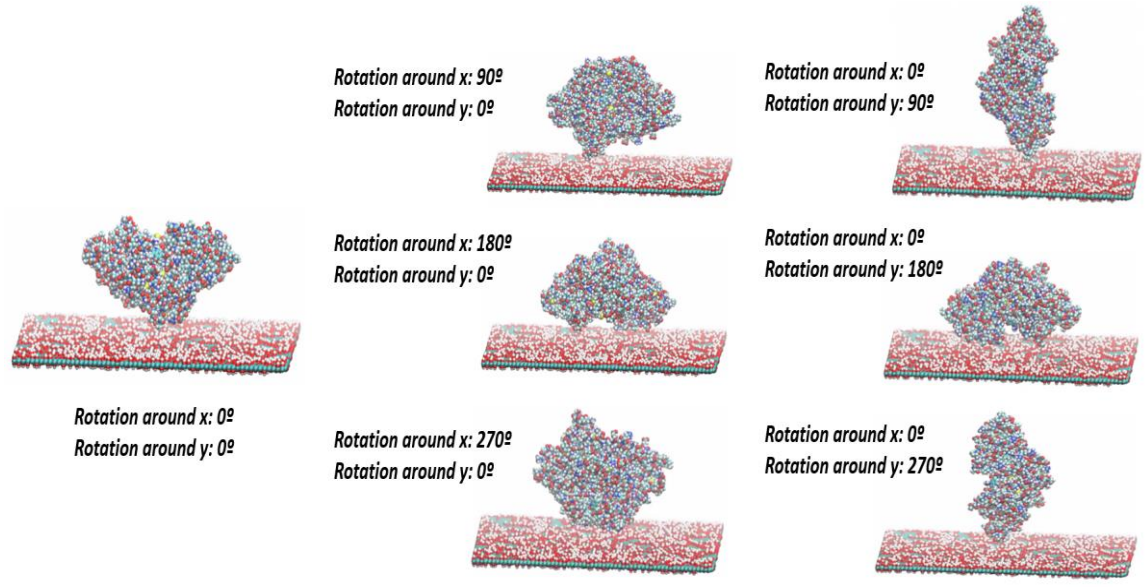


Figura 11 – Representação das 7 conformações distribuídas da proteína no eixo X e Y na superfície para adsorção.

Foi usado, novamente, o campo de força *Amber99sb-ILDN* para a proteína, e todos os sistemas simulados foram solvatados com água explícita TIP3P, em uma caixa com altura de 150 Å. Foram adicionados 7 contra-iões Na^+ para equilibrar a carga do sistema. Nesta etapa de adsorção foi apenas utilizado o campo de forças GAFF2 para

as folhas de GO, sendo que apresenta resultados comparáveis aos do OPLS-AA e é mais compatível com o campo de forças utilizados para a proteína.

A minimização foi feita em 4 etapas por ser um sistema mais complexo. A primeira aconteceu com restrições para a totalidade da proteína; a segunda apenas para os átomos pesados da MHETase; a terceira para a *backbone* da proteína; e, por fim, a quarta minimização foi feita sem nenhuma restrição. Todas essas etapas ocorreram com *steepest-descent* usando um critério limite de 1000.0 kj/mol/nm.

Na equilibração, começou-se com NVT durante 100 ps, com *time-step* 2 fs, em uma temperatura crescente de 0 a 303.15 K, com termostato *V-rescale*. Ainda na equilibração, utilizamos NPT durante 1000 ps com *time-step* 2 fs para levar o sistema à pressão de referência (1 bar) controlado pelo barostato *Parrinelo-Rahman* e a temperatura de 303.15 K, mas, usando o *Nosé-Hoover* como tesmostato. A fase de produção correu também com 2 fs de *time-step* em 50000 ps (50 ns), em uma temperatura controlada de 303.15 K e pressão 1 bar. Os cálculos foram realizados com *Periodic Boundary Conditions*, utilizando um *cutoff* de 1.0 (nm) para *short-range electrostatic cutoff* e 1.0 (nm) em *short-range van der Waals cutoff*, e interações de longo alcance tratadas com método PME (*Particle Mesh Ewald*).

Capítulo 3: Resultados e Discussão

1. Análise da superfície de Óxido de Grafeno

1.1. Propriedades Gerais

No final de cada simulação foram realizadas análises das propriedades do sistema em função do tempo, sendo um procedimento padrão para confirmar o equilíbrio do sistema. Nesta fase é esperado que o valor médio de certas propriedades se mantenha constante ao longo do tempo. Todos os sistema avaliados atingiram o equilíbrio, e a partir dessa etapa foram analisados várias propriedades químicas, como a influência da solvatação e interações não-covalentes.

1.2. Análises de temperatura, densidade, volume, pressão, energia total e RMSd.

Todas as folhas, independentemente da escolha de campos forças GAFF2 e OPLS-AA, apresentaram resultados satisfatórios. Os dados das simulações (por exemplo: temperatura, densidade, volume, pressão e energia total), foram extraídos através de várias aplicações que o GROMACS disponibiliza.

Como esperado, as condições do sistema na fase de produção (por exemplo: temperatura, densidade, volume, pressão e energia total) encontram-se equilibradas, independentemente do campo de força utilizado.

Outro ponto a ter em conta é o valor de RMSd (Cálculo do desvio padrão nas posições atómicas), pois este é indicativo de alterações conformacionais nas folhas relativamente a uma refêrencia. O RMSd compara duas conformações de um dado conjunto de pontos no espaço tridimensional, neste caso átomos, através de medição da diferença de distâncias nas posições desse conjunto de átomos, portanto, quanto maior a variação do valor de RMSd maior é a diferença entre as conformações. Como

observado nas figuras 12 e 13, a média do RMSd é constante, podendo-se dizer-se que a estrutura atingiu uma conformação estável.

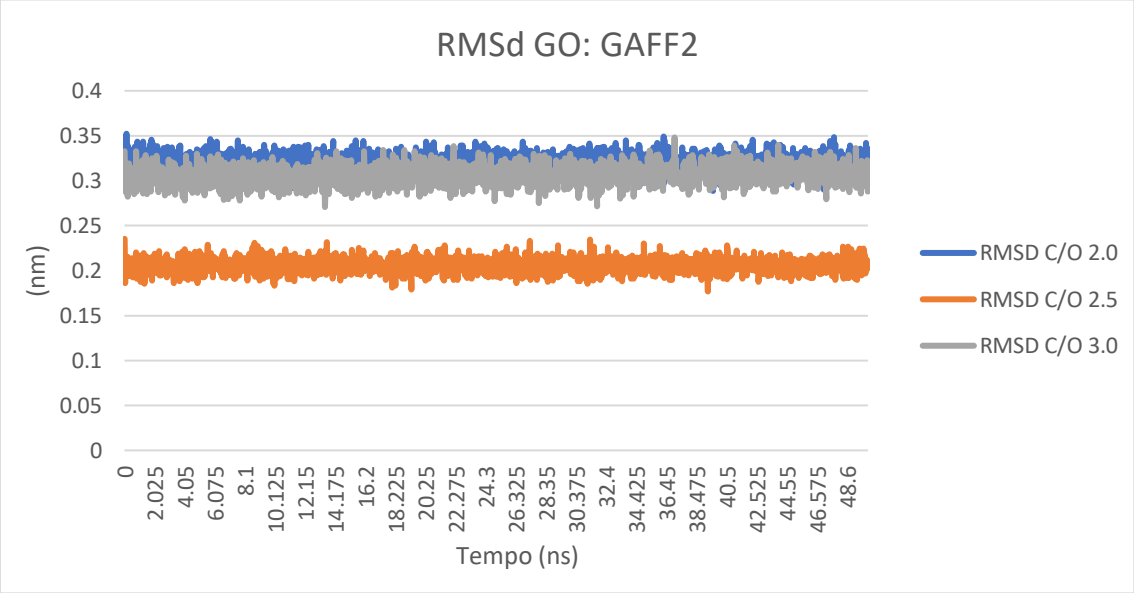


Figura 12 – RMSd respetivo aos átomos de carbono das folhas GO com taxas de oxidações C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 parametrizadas pelo campo de forças GAFF2.

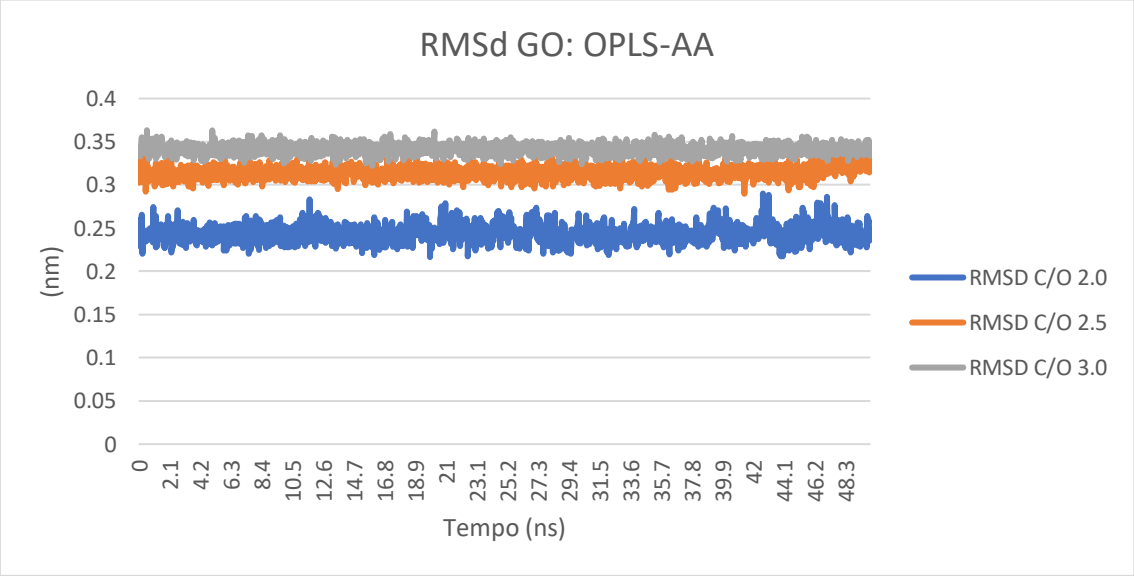


Figura 13 – RMSd respetivo aos átomos de carbono das folhas GO com taxas de oxidações C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 parametrizadas pelo campo de forças OPLS-AA.

Neste caso, a referência usada é a estrutura inicial obtida do *script* presente no *makegraphitics*, onde cada tipo de átomo se encontra num plano paralelo ao eixo do Z,

o que explica o valor de RMSd, próximo de 0,3 nm. No entanto, todas a simulações apresentam um valor médio de RMSd constante. Observando as folhas parametrizadas, com OPLS-AA existe uma tendência para as folhas com maior rácio C/O apresentarem valores de RMSd mais altos, que poderá estar relacionada com a presença de interfaces de tamanho considéravel entre regiões aromáticas e oxidadas. Mas não se aplica as feitas com GAFF2.

1.3. Cálculo da área de superfície acessível ao solvente

Estas análises pretendem avaliar a área de contacto entre a superfície e o solvente SASA (Área superficial acessível ao solvente), de modo a compreender o impacto de diferentes graus de oxidação na exposição ao solvente. Nas figuras 14 e 15 encontram-se os gráficos das simulações de GO relativos à área de superfície acessível ao solvente.

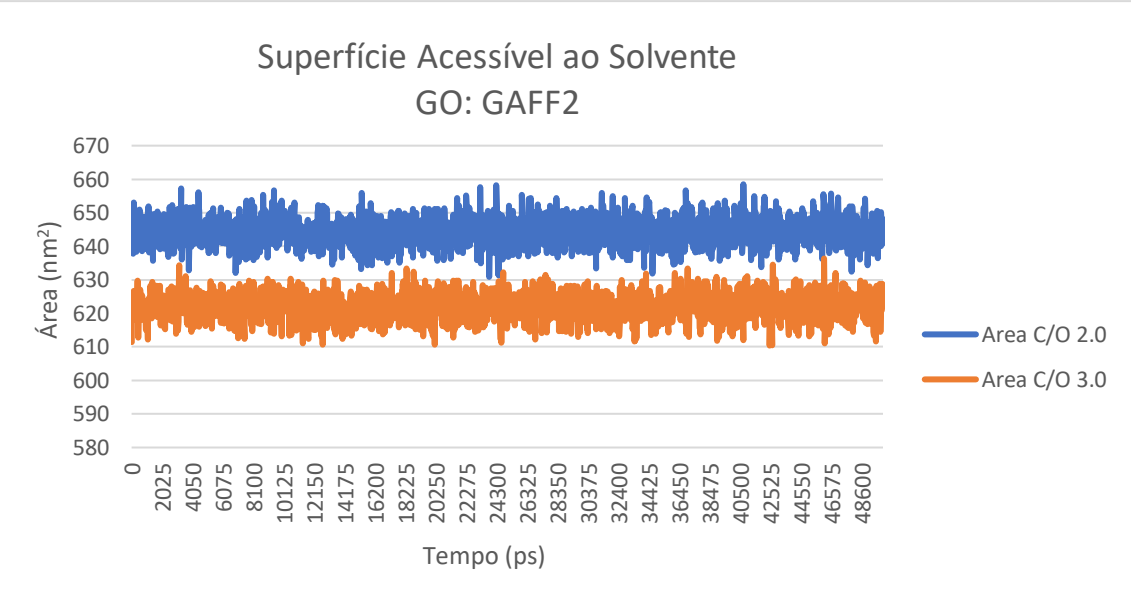


Figura 14 – Gráfico das áreas das superfícies de GO em contacto com o solvente das estruturas com taxa de oxidação C/O 2.0 e 3.0 com o uso dos campos de força GAFF2.

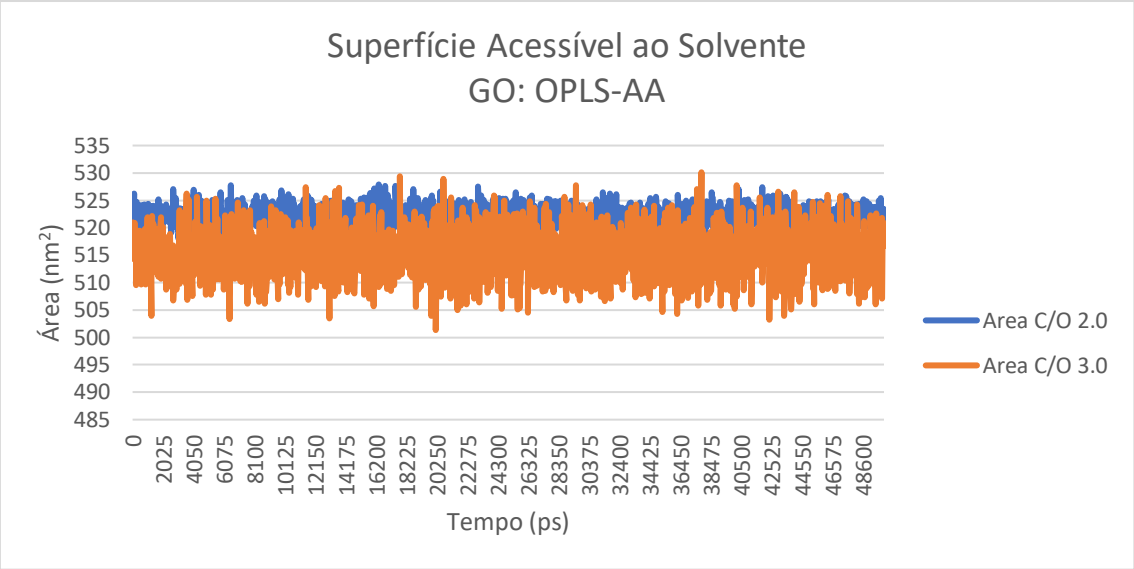


Figura 15 – Gráfico das áreas das superfícies de GO em contacto com o solvente das estruturas com taxa de oxidação C/O 2.0 e 3.0 com o uso dos campos de força OPLS-AA.

É visível uma redução da área de superfície acessível ao solvente com a diminuição da taxa de oxidação. Isto acontece porque a introdução de grupos funcionais aumentam a área superficial a nível local, mas, também, induzem a distorções na estrutura capazes de influenciar este parâmetro. Estas observações da diferença de propriedades com variação do grau de funcionalização estão em concordância com os estudos de (Peng, Todorova, & Yarovsky, 2018). É importante, também, registar que os resultados da SASA dos dois campos de forças são bastante diferentes. Isto pode ser explicado pelo facto de os parâmetros de *van der Waals* dos átomos de hidrogénio terem valores nulos no OPLS-AA, sendo a sua contribuição considerada nos parâmetros de *van der Waals* dos átomos pesados a que estão ligados, enquanto que no GAFF2 os parâmetros dos átomos de hidrogénio são dados explicitamente.

1.4. Análise dos Cálculos de Distribuição de Funções Radial (RDF) e Densidade Parcial

O RDF é uma das análises de maior importância em dinâmica molecular, pois permite examinar a organização estrutural do solvente na superfície das folhas de GO. Quanto mais intensa for a interação entre dois grupos de átomos maior será a influência do átomo central ou referência sobre a organização dos átomos que o circundam. Ou seja, o RDF mede a densidade de átomos presentes numa esfera centrada a determinada distância desse átomo de referência, e portanto, indica a densidade de átomos que podemos encontrar neste espaço (N. et al., 2015/2016). Nas simulações do sistema GO em água, foi investigado principalmente como átomos de oxigénio e carbono das folhas de GO influenciam a organização das moléculas de água.

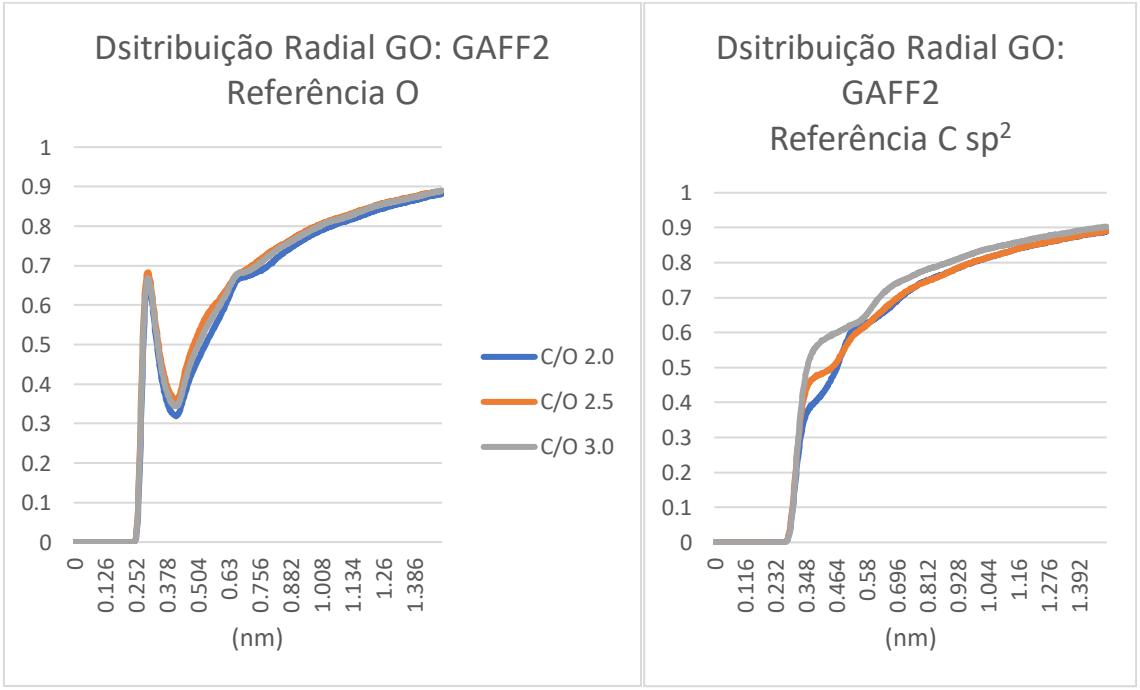


Figura 16 – RDF dos oxigénios dos grupos funcionais (O) e carbonos aromáticos (sp2) respetivos as folhas de GO com taxa de oxidação C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 com uso dos campos de forças GAFF2.

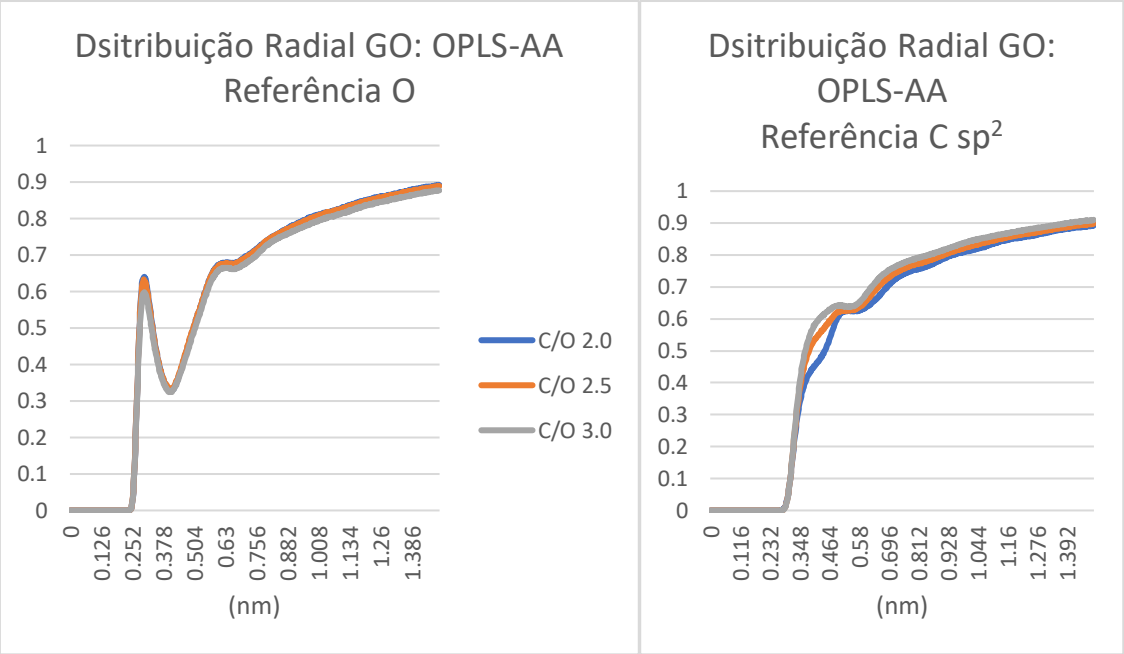


Figura 17 – RDF dos oxigénios dos grupos funcionais (O) e carbonos aromáticos (sp2) respetivos as folhas de GO com taxa de oxidação C/O 2.0, C/O 2.5 e C/O 3.0 com uso dos campos de forças OPLS-AA.

Como observado nos gráficos (ver figuras 16 e 17), as funções de distribuição radial (RDFs) mostram que os átomos de oxigénios das funcionalizações influenciam bastante a organização da camada de solvatação aquosa, sendo a representação da primeira esfera de solvatação muito clara, entre 0,25 e 0,4 nm. Em comparação com os carbonos aromáticos estes apresentam uma estruturação de solvente fraca em torno, onde é vista uma primeira esfera de solvatação pouco clara entre 0,28 e 0,54 nm e depois muito difusa nas outras. Com isso, é concluído que as moléculas de água estabelecem interações fortes com os oxigénios dos grupos funcionais, e interações fracas com os átomos de carbonos.

É também interessante calcular a densidade parcial, que é uma propriedade macroscópica calculada com DM. Esta ferramenta calcula as densidades relativas de cada elemento presente no sistema (ver figuras 18 e 19) criando um histograma em relação ao centro de um grupo arbitrário com as coordenadas da caixa de solvatação.

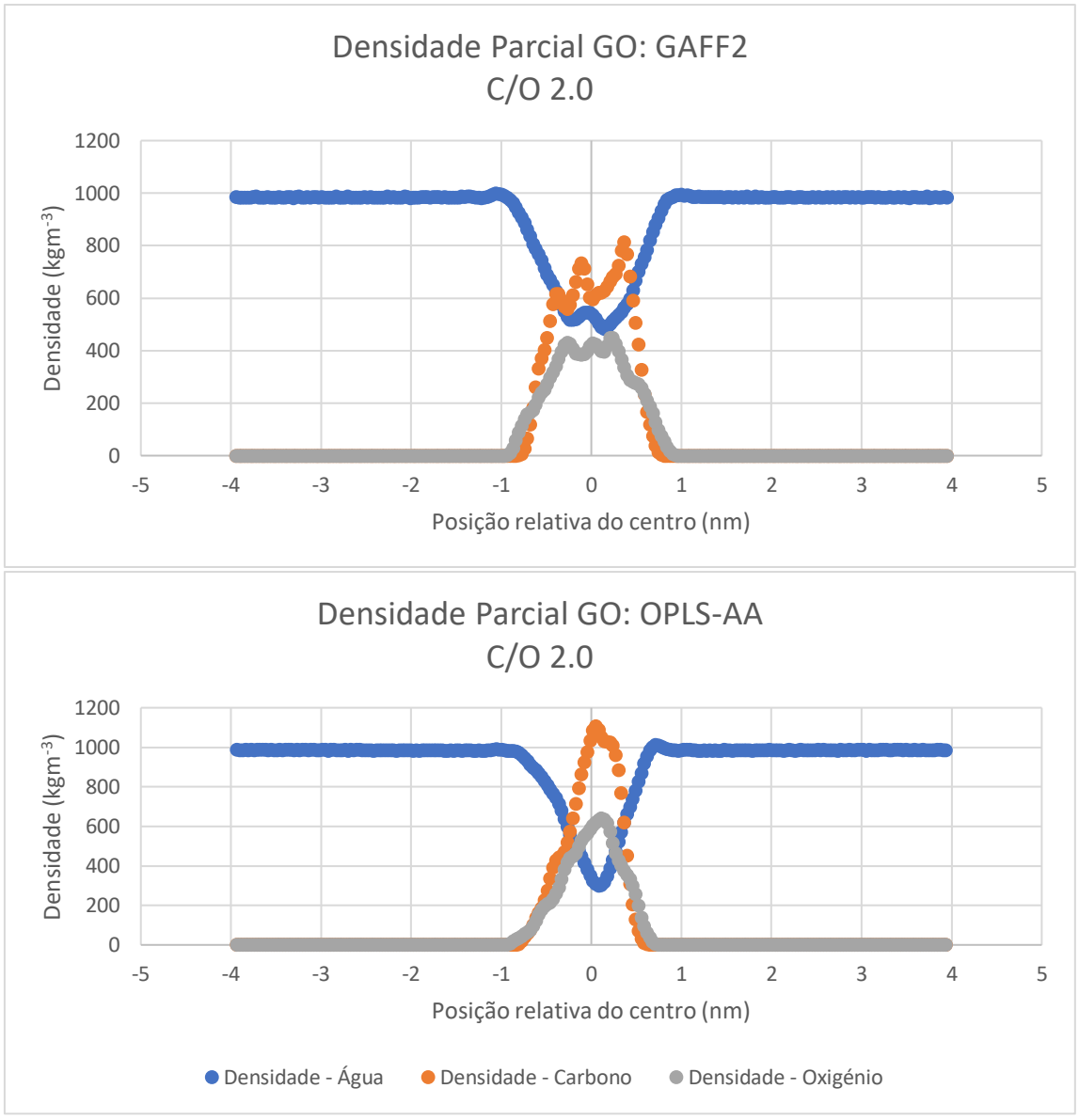


Figura 18 – Densidade Parcial de GO com taxa de oxidação C/O 2.0 parametrizadas com GAFF2 e OPLS-AA.

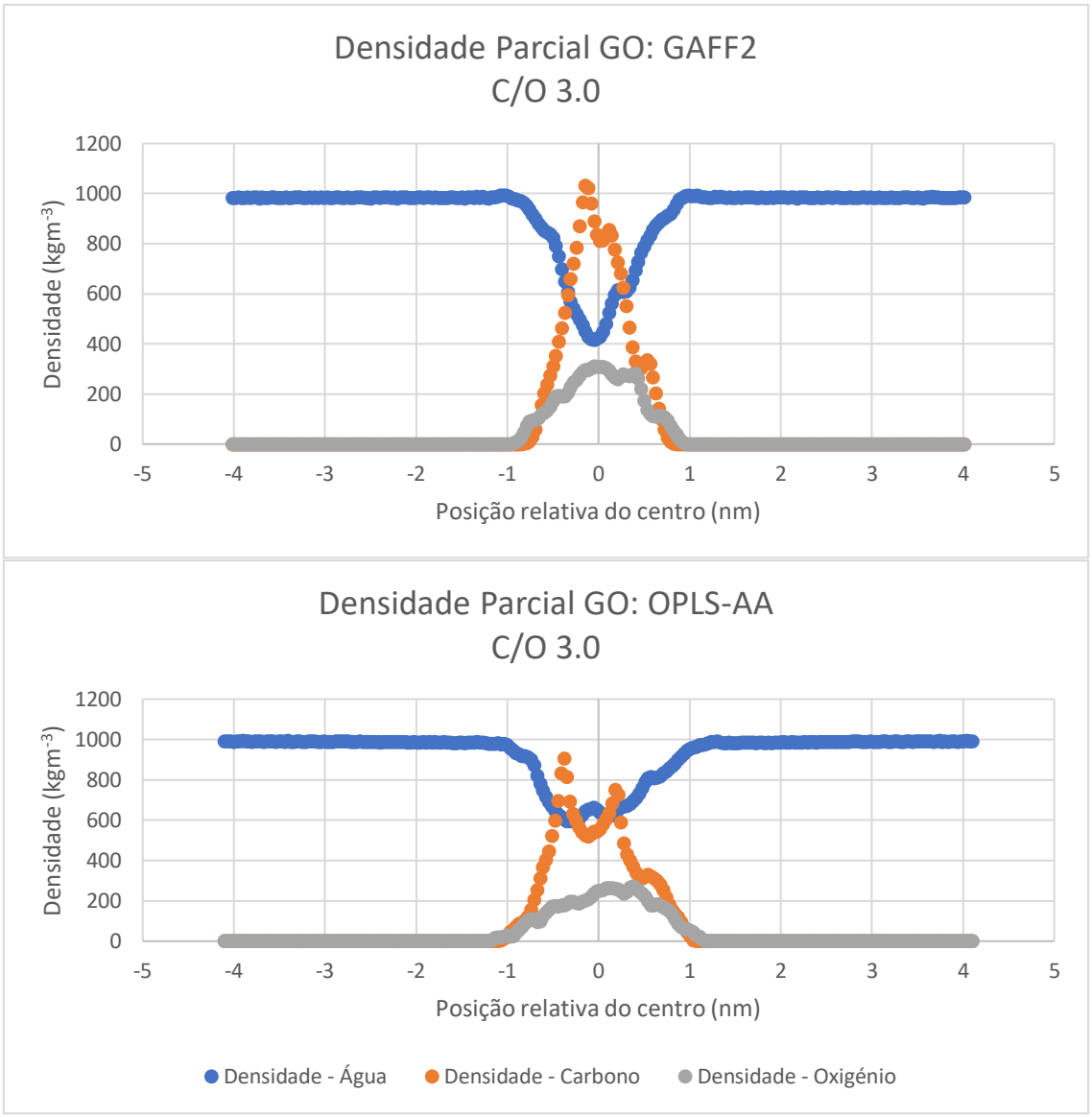


Figura 19 – Densidade Parcial de GO com taxa de oxidação C/O 3.0 parametrizadas com GAFF2 e OPLS-AA.

A análise dos resultados mostra as estruturas de GO no meio da caixa, com águas acima e abaixo. As estruturas de GO mostram alguma irregularidade assimétrica no seu perfil de densidade relativa, o que reflete o papel das ilhas oxidativas na estrutura do nanomaterial. A densidade da água é ligeiramente abaixo de 1000 kg/m^3 e, portanto, de acordo com o valor de referência. É também interessante observar que a convergência da densidade da água, aproxima-se da densidade de carbono e oxigénio do GO perto de 0,4 nm, que é o valor da primeira esfera de solvatação e que entra em concordância com os valores obtidos nos RDFs. Comparando os rácios C/O 2.0 com C/O 3.0, é percebido a redução da densidade de oxigénio nesta ultima, que corresponde a diminuição dos grupos funcionais presentes.

1.5. Número de pontes de hidrogénio intramoleculares e análise de Determinação de Flutuações nas Posições Atómicas (RMSF)

Um outro ponto muito interessante a ser analisado é a relação das quantidades de pontes de hidrogénios intramoleculares com o RMSF, que é uma análise na dinâmica molecular que identifica as partes da molécula que mais variam de posição, podendo-se dizer que é uma observação das partes mais flexíveis da estrutura a ser estudada.

Essas pontes de hidrogénio intramoleculares ocorrem entre os grupos funcionais presentes na estrutura, com os óxigénios dos grupos epóxido a atuarem como aceitadores, e os grupos hidróxilo como aceitadores e dadores. Sendo assim, quanto maior a taxa de oxidação da folha de grafeno, maior é o seu número de pontes de hidrogénio intramoleculares, e vice-versa. Abaixo (ver figura 20) podemos ver um gráfico com as contagens do número de pontes de hidrogénio intramoleculares, para ambos os campos de forças.

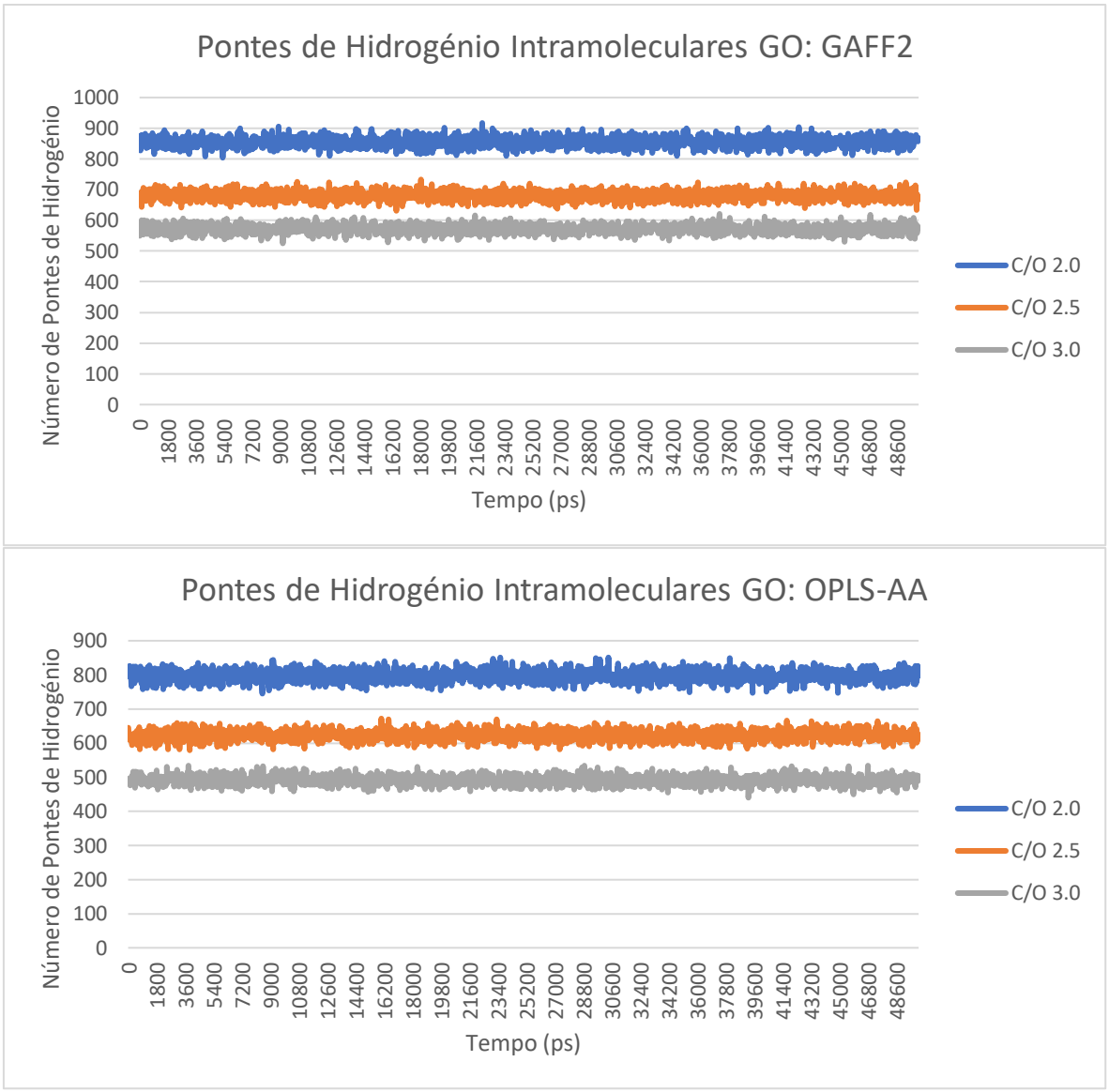


Figura 20 – Gráfico dos cálculos dos números de pontes de hidrogénio intramoleculares das folhas com taxas de oxidação C/O 2,0, C/O 2,5 e C/O 3.0 parametrizadas com os campos de forças GAFF2 e OPLS-AA.

A seguir, foram analisados os resultados do RMSF em 3 tipos de folhas com diferentes rácios de C/O, sendo percebido uma diferença na flexibilidade estrutural entre elas (ver figura 21).

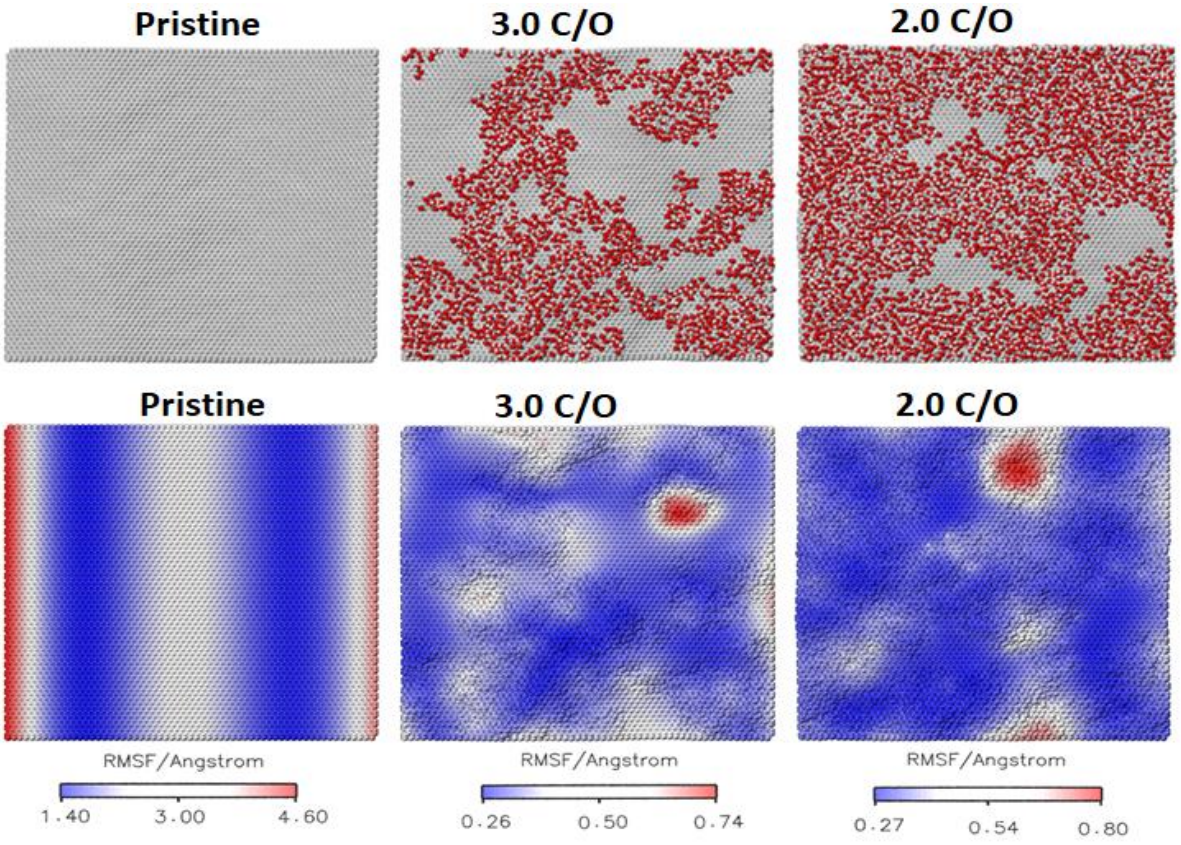


Figura 21 – Folhas GO simuladas em DM representadas pelo seus respetivos RMSF.

Ao observar a figura acima, é possivel perceber algum aumento da flexibilidade da folha com a diminuição de oxidação. Esta redução do rácio C/O está associada ao decréscimo de pontes de hidrogénio intramoleculares como visto na figura 20. Um estudo feito por (Mouhat et al., 2020) demonstra que o impacto da distribuição dos grupos funcionais em GO em modelos semi-ordenados apresentam estruturas mais estáveis, pois esta funcionalização ajuda a estabilizar a estrutura devido as pontes de hidrogénio intramoleculares entres eles.

Apesar dessas análises de RMSF apresentarem resultados com mais flexibilidades com o descréscimo do rácio oxidativo e entrarem em concordância com a literatura acima, é preciso mais provas para explicar esta diferença. Pois este resultado deriva de vários fatores, como as distorções estruturais, interações com o solvente e entre outros, sendo ainda cedo para uma conclusão objetiva, mas que pode auxíliar futuras pesquisas sobre esta flexibilidade.

2. Análise da MHETase em água

Antes das simulações de adsorção da MHETase, foi necessário simular a proteína em solvente aquoso. Esta validação é necessária e também fornece dados cruciais para os cálculos de LIE (*Linear Interaction Energy*) da proteína com o adsorvente.

2.1. Propriedades gerais: Análises de temperatura, densidade, volume, pressão, energia total e RMSd.

Como procedimento padrão, são feitas análises de propriedades gerais. Como esperado, as análises feitas após o término da produção, todas estas observações sobre temperatura, densidade, volume e energia total se encontraram em um valor linear constante, indicando estabilização do sistema.

O valor do RMSd é muito importante, sendo que no decorrer da simulação em DM a proteína pode desnaturar. Geralmente é aceitável obter um valor linear constante médio até 0,3nm para proteínas.

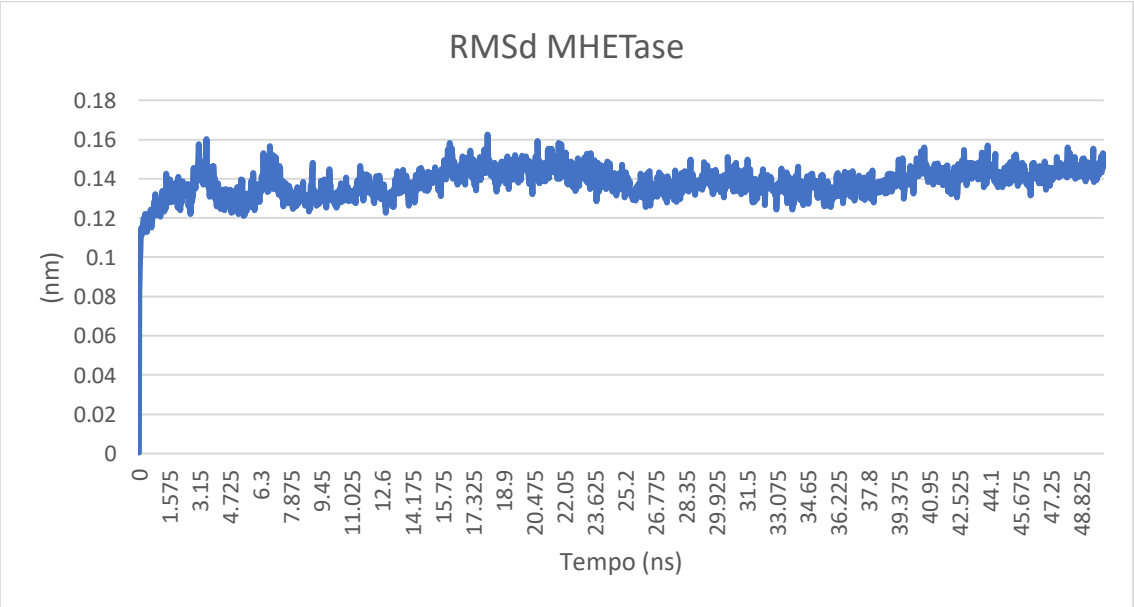


Figura 22 – RMSd respetivo da simulação da enzima MHETase solvatada em água explícita TIP3P.

Ao observar o gráfico na figura 22, representativo do RMSd, percebe-se que a proteína apresentou um valor ótimo, abaixo de 0,3nm e constante sem alterações bruscas, indicando que a estrutura foi preservada no decorrer da experiência.

2.2. Raio de giro

Há outra análise que pode ser feita também, complementar ao RMSd. O raio de giração é uma análise que calcula o raio de giro de uma molécula e os raios de giro em torno dos eixos X, Y e Z em função do tempo da simulação. Os átomos são explicitamente ponderados em massa. Ou seja, o raio de giro é uma medida que analisa se a proteína perdeu a estrutura tridimensional, sendo seu valor esperado razoavelmente invariante, indicando que a molécula se manteve estável e assim não foi desnaturada no decorrer da simulação.

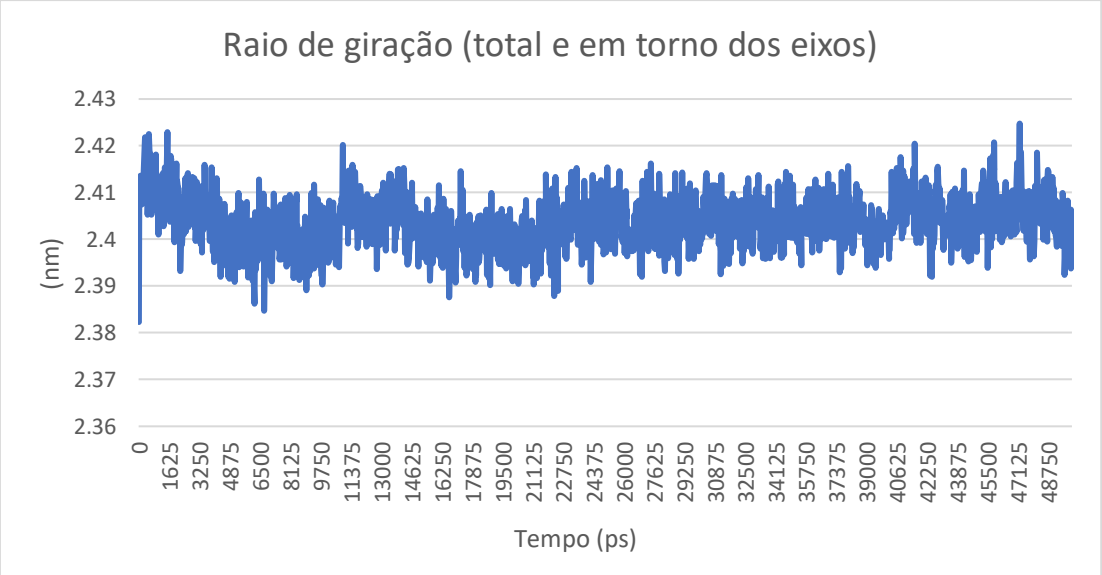


Figura 23 – Raio de giro da MHETase com tempo de simulação em 50000 ps (50ns).

Como observado na figura 23 acima, esta análise ajuda a confirmar a estabilização da proteína no decorrer da simulação, onde seu valor não apresenta grandes variações, e após 25000 ps este valor se mantém com variação menor ainda, abrindo margem a uma interpretação que esta proteína não sofreu desdobramento neste experimento.

3. Análises das simulações de adsorção da MHETase

Nesta etapa são feitas simulações de adsorção da MHETase nas estruturas de GO, alcançando-se o objetivo principal do projeto. Foram feitas uma série de simulações de adsorção da proteína com 7 diferentes conformações (ver figura 11), através da rotação da proteína no eixo do X e Y, para cada estrutura de óxido de grafeno. Para melhor representar essas conformações, cada uma será representadas por códigos (ver tabela 1). Foram feitas ainda simulações com diferentes conformações em grafeno puro com a intenção de comparar e perceber o impacto conformacional e da oxidação na adsorção. Ao todo foram feitas 42 simulações que serão discutidas adiante.

Tabela 1 – Representação das rotações ao redor dos eixos X e Y em códigos.

Conformação da Proteína	Código
Rotação ao redor do eixo X e Y em 0º	1_000
Rotação ao redor do eixo X em 90º	2_100
Rotação ao redor do eixo X em 180º	3_200
Rotação ao redor do eixo X em 270º	4_300
Rotação ao redor do eixo Y em 90º	2_010
Rotação ao redor do eixo Y em 180º	3_020
Rotação ao redor do eixo Y em 270º	4_030

3.1. Propriedades Gerais

Análises de propriedades gerais indicaram estabilização do sistema. Sobre o RMSd, por se tratar de um sistema que possui duas moléculas, MHETase e a superfície, foram feitos cálculos de RMSd para ambos. Abaixo na figura 24, podemos ver os RMSd da MHETase com rotação ao redor do eixo X em 90º com grau de oxidação C/O 2.0 – 2.25 – 2.5 – 2.75 – 3.0.

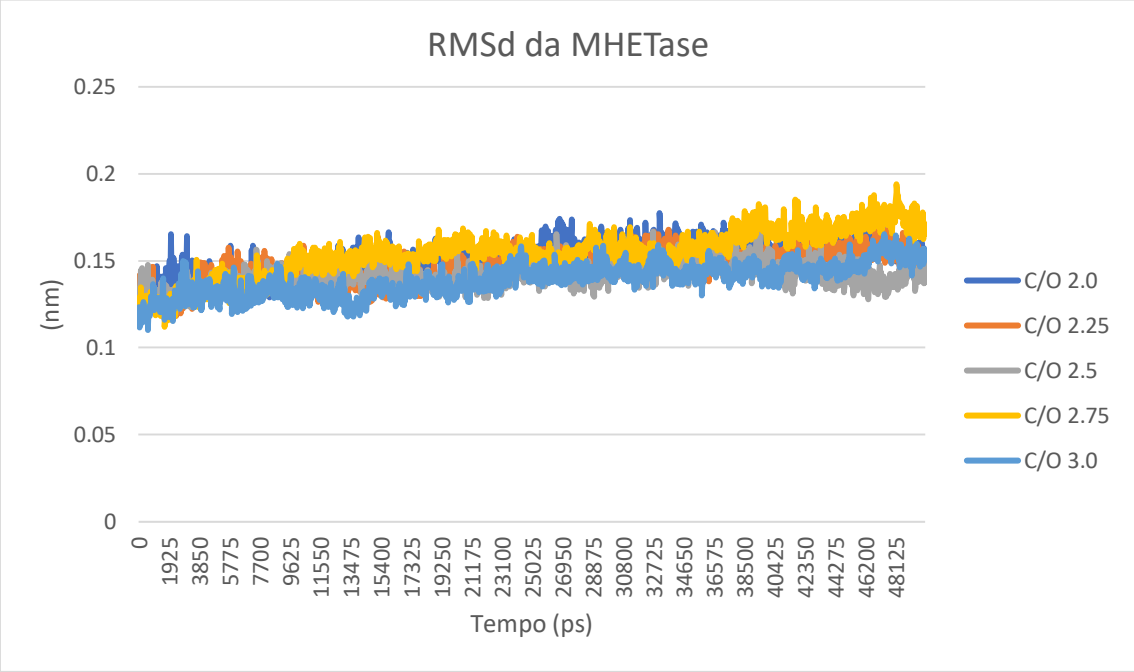


Figura 24 – RMSd das MHETase 2_100 sendo adsorvida em GO em 5 diferentes tipos de taxa de oxidação.

Os resultados mostram alguns valores ligeiramente diferentes, mas nenhum deles apresenta grandes variações, mantendo-se dentro do limite aceitável e indicando que a estrutura da enzima foi preservada durante sua adsorção.

Para as estruturas de óxido de grafeno, os RMSd apresentaram valores linearmente constantes (ver figura 25). Mas estes apresentaram diferenças nas médias entre as folhas com os diferentes graus de oxidação como visto nas análises de RMSd de GO em água apenas.

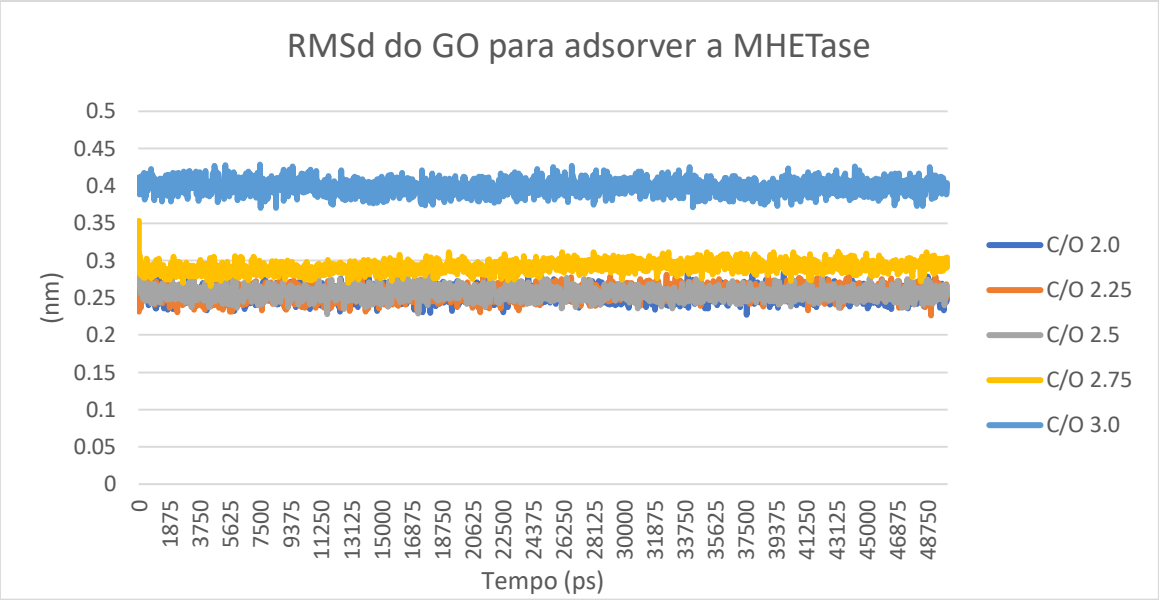


Figura 25 – RMSd respetivo aos GO usados para adsorção da MHETase 2_100.

Os resultado obtidos na folha *Pristine* são interessantes (ver figura 26), pois estes apresentaram uma variação relevante dentro de um linear constante por ser uma folha sem oxidação. Sua interação com o solvente não é tão favorável, principalmente pela ausência dos grupos funcionais que fazem fortes interações com a água. Sem estes, as colisões repulsivas entre água e a estrutura levam a esta oscilação.

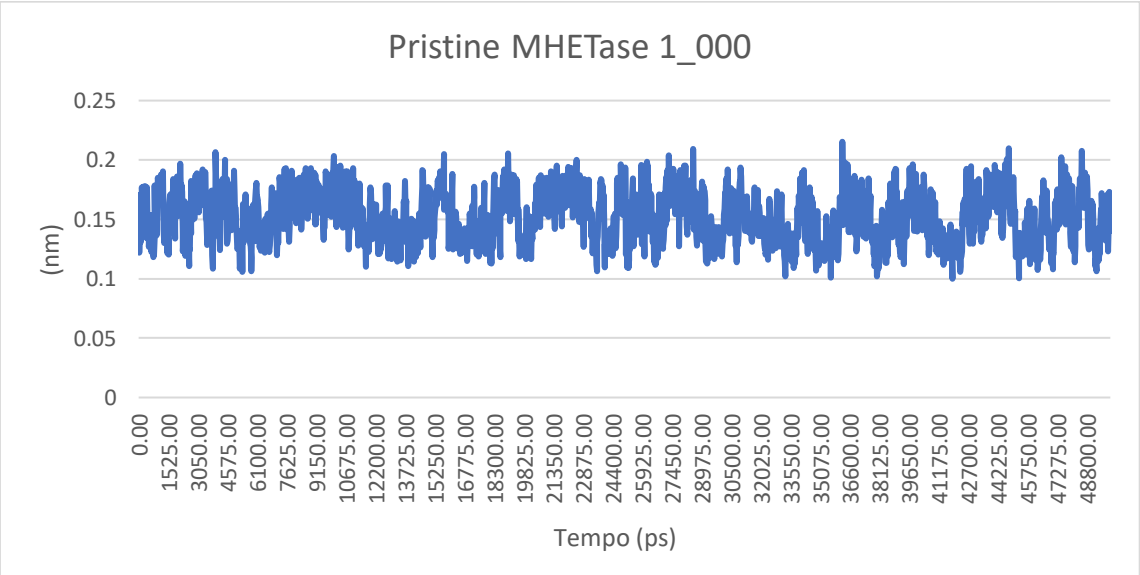


Figura 26 – RMSd respetivo ao grafeno puro (*Pristine*) usado para adsorção da MHETase 1_000.

3.2. RMSF da Proteína

As análises do RMSF da MHETase nas 42 simulações de adsorção em dinâmica molecular mostram que existem três regiões com valor alto, sendo os resíduos do 10-20, 30-45 e 290-310. Seguindo uma ordem descrescente observa-se (ver figura 27) a seguir, as regiões pertencentes aos resíduos 90-100, muito presentes nas análises, e adiante destes, os resíduos 60-70 e 340-350 apresentam uma flexibilidade considerável. São percebidos outros resíduos com variações no RMSF em algumas simulações isoladas, mas estas não aconteceram regularmente em relação as 42 simulações, sendo estes resíduos acima apresentados, os que mais tiveram ocorrência ao longo de todas essas simulações.

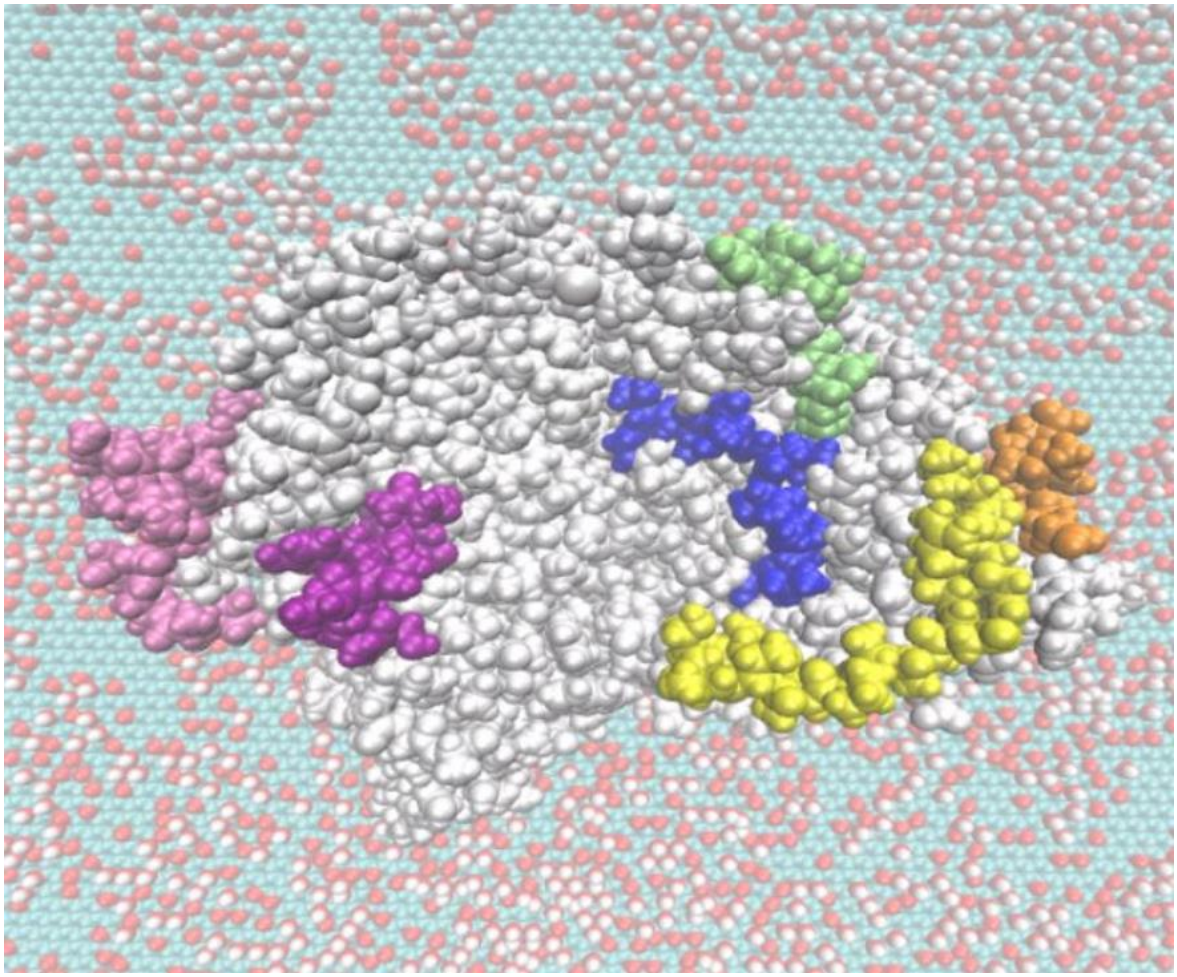


Figura 27 – Imagem retirada do VMD do sistema GO x MHETase, onde a proteína esta com rotação ao redor do eixo X e Y em 0º, com o sítio catalítico exposto virado para cima. Nesta figura estão os resíduos com valores mais altos presentes nas análises de RMSF. Resíduos; 10 ao 20 (orange), 30 ao 45 (yellow), 60 ao 70 (lime), 90 ao 100 (blue), 290 ao 310 (mauve) e 340 ao 350 (purple).

É interessante notar que a maioria das regiões flexíveis estão perto do centro ativo. Por esta ser uma região onde se forma um complexo com o substrato, o MHET, precisa ser uma região flexível para que esta molécula seja facilmente englobada e que possibilite um melhor ambiente para que ocorra a reação enzimática e a libertação do produto desta reação. Os resíduos 290-310 que se encontram fora do sítio catalítico, estão presentes em uma região periférica exposta, e provavelmente é esta a causa da sua flexibilidade.

3.3. Contactos entre proteína e superfície

Foram analisados os contactos entre proteína e superfície com o decorrer do tempo de simulação. É interessante notar que estes dizem muito sobre a adsorção da proteína na superfície. Observa-se que muitos destes contactos já estão presentes antes da fase de produção, acontecendo em quase metade das simulações. Nesta fase de produção, 14 simulações apresentam contactos até 10000 ps após o início desta fase (ver figuras 28, 29, 30 e 31).

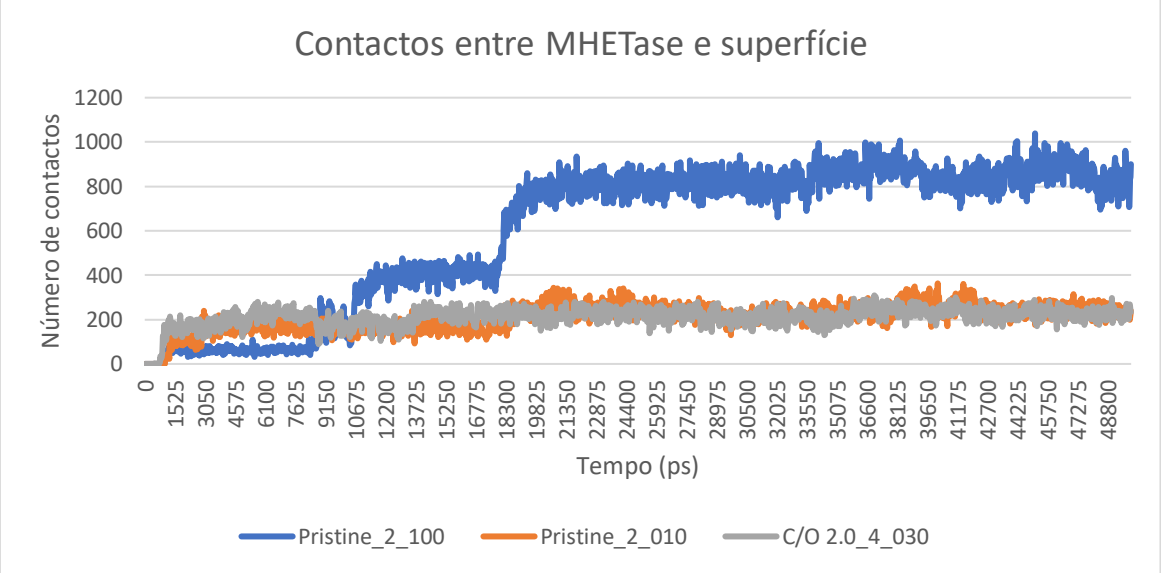


Figura 28 – Gráficos representativo das simulações Pristine_2_100, Pristine_2_010 e C/O 2.0_4_030 que apresentam contactos antes de 10000 ps.

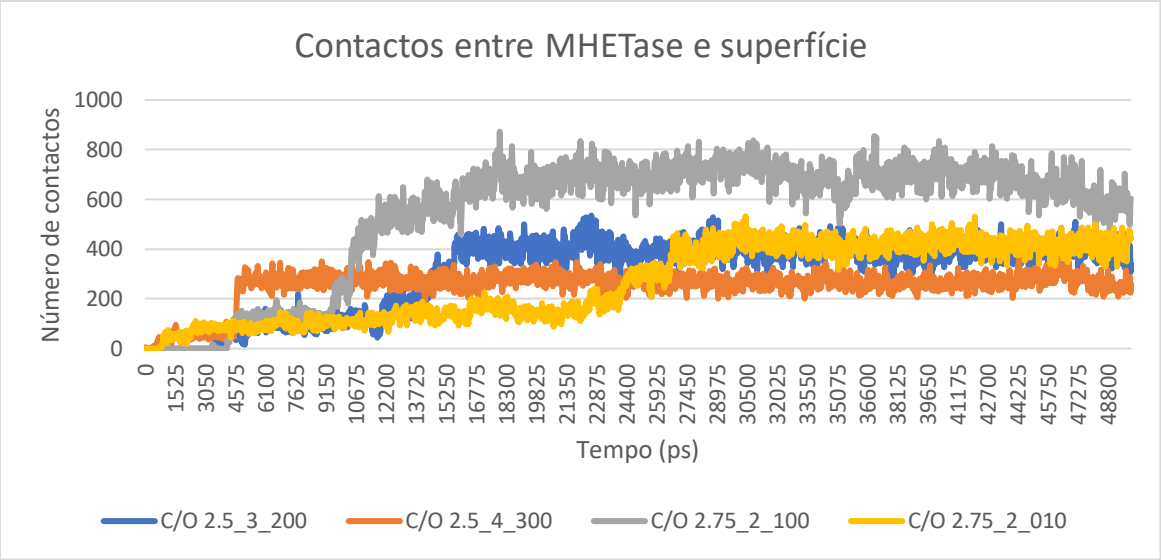


Figura 29 – Gráficos representativo das simulações C/O 2.5_3_200, C/O 2.5_4_300, C/O 2.75_2_100 e C/O 2.75_2_010 que apresentam contactos antes de 10000 ps.

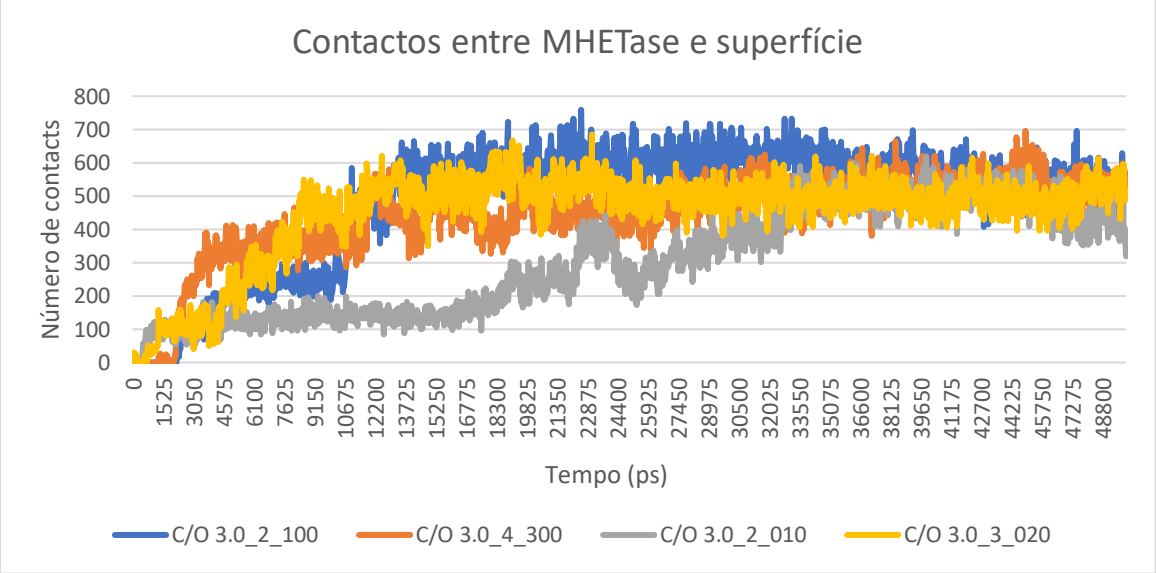


Figura 30 – Gráficos representativo das simulações C/O 3.0_3_200, 4_300, 2_010 e 3_020 que apresentam contactos antes de 10000 ps.

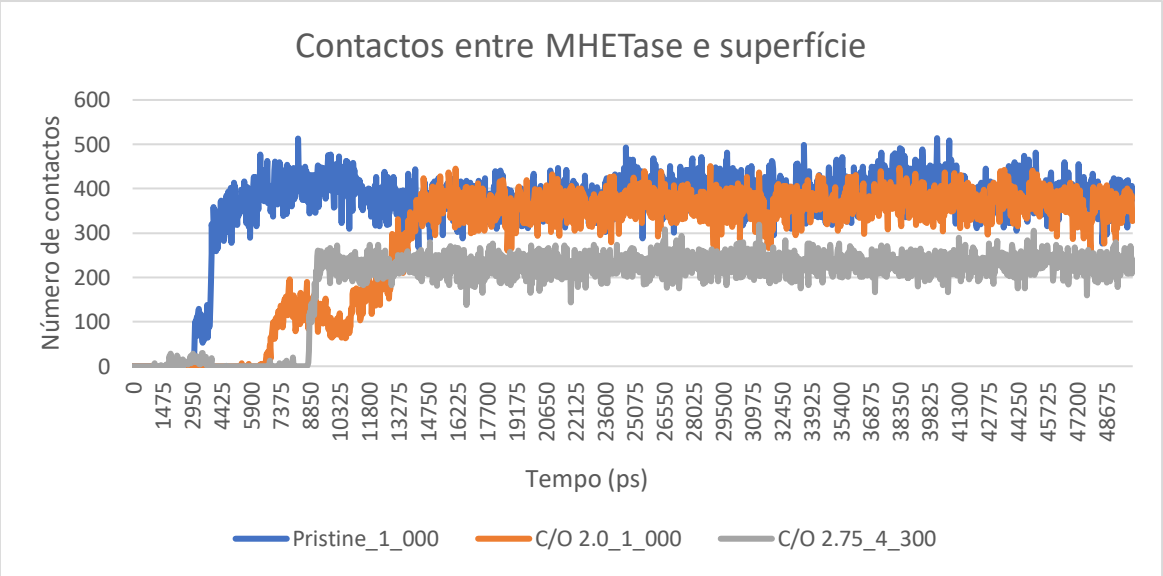


Figura 31 – Gráficos representativo das simulações Pristine_3_200, C/O 2.0_1_000 e C/O 3_020 que apresentam contactos antes de 10000 ps.

Especificamente, 3 simulações acontecem estes contactos logo após 5000 ps e 11 antes. Há 5 simulações que ocorrem estes contactos um pouco após 10000 ps, sendo as simulações respetivas ao C/O 2.0_2_100, C/O 2.0_3_020, C/O 2.75_1_000, C/O 3.0_1_000 e Pristine_4_300 (ver figura 32), vale ressaltar que a simulação C/O 2.0_2_100 apresenta alguma interação antes, mas logo é perdida e só após 10000 ps que ela volta com ligações mais definidas.

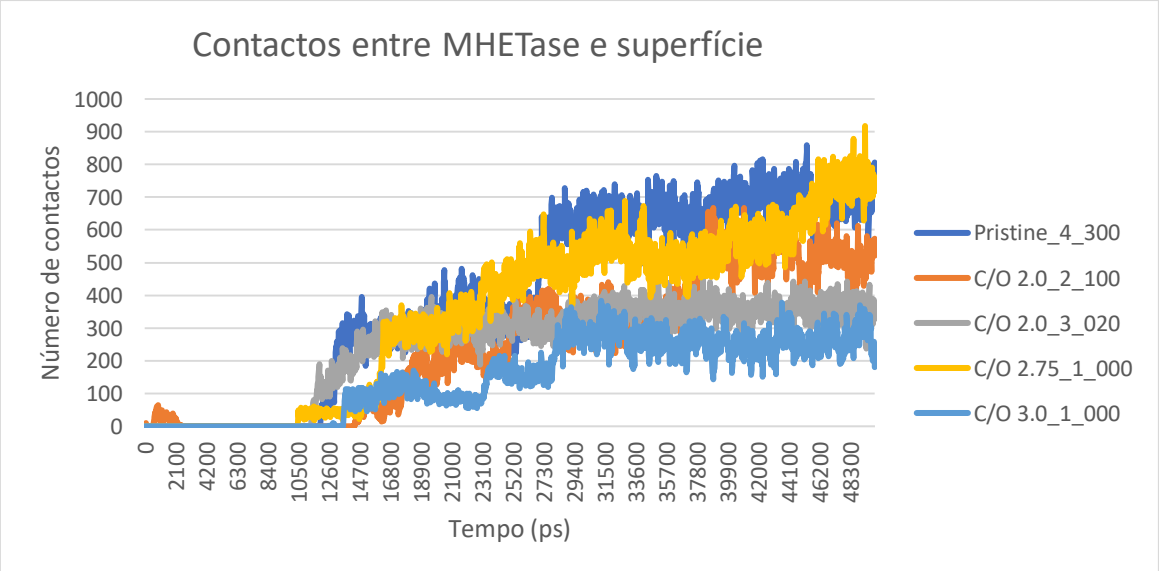


Figura 32 – Gráficos representativo das simulações Pristine_4_300, C/O 2.0_2_100 e 3_020, C/O 2.75_1_000 e C/O 3.0_1_000 que apresentam contactos após 10000 ps.

Muitos desses contactos após estabelecidos, apresentam valores constantes até ao final da simulação, geralmente após 25000 ps da fase produção. Várias simulações apresentam uma estabilização rápida após os primeiros contactos, onde estes se mantém até o final da dinâmica molecular, refletindo uma ligação equilibrada entre MHETase e adsorvente.

Também acontecem exceções onde o número de contactos apresentam oscilações significativas, que parecem resultar de interações repulsivas entre a proteína e a superfície, e que podem indicar que a adsorção atingiu equilíbrios metaestáveis. De qualquer forma, não altera a intepretação de que esta relação entre proteína e superfície se mantém estáveis (ver figura 33).

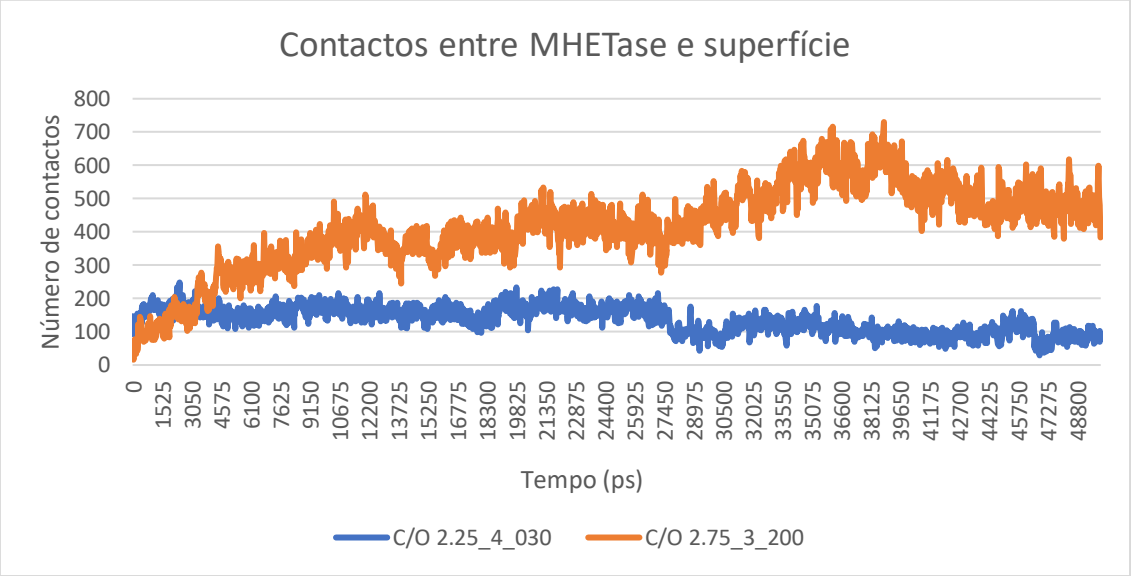


Figura 33 – Gráficos representativo das simulações C/O 2.25_4_030 e C/O 2.75_3_200 que apresentam um pequeno decréscimo nos contactos entre MHETase e superfície.

3.3.1. Ligações de Hidrogénio entre proteína e superfície

Pontes de hidrogénio entre a MHETase e a superfície só ocorrem nos sistemas com grafeno oxidado, sendo esta oxidação capaz de gerar grupos químicos funcionais contendo oxigénio nesta estrutura que é de grande interesse. Estudos sobre esta superfície aumentaram, acentuadamente, para explorar toda alteração nessa estrutura

que já era promissora, que através dessa oxidação, suas excelentes propriedades são melhoradas. Sendo uma desta a adsorção de enzimas.

Como referido, é de esperar pontes de hidrogénio entre a proteína e o GO, e com esse estudo foi possível analisar as quantidades presentes dessas pontes entre esses dois componentes no sistema.

Com o extenso estudo sobre as simulações das folhas de grafeno com diferentes graus de oxidação e também sem oxidação, com variadas conformações da proteína sobre esta superfície, os resultados extraídos apresentados as seguir (ver figura 34 e 35) são de extrema importância, e interessantes.

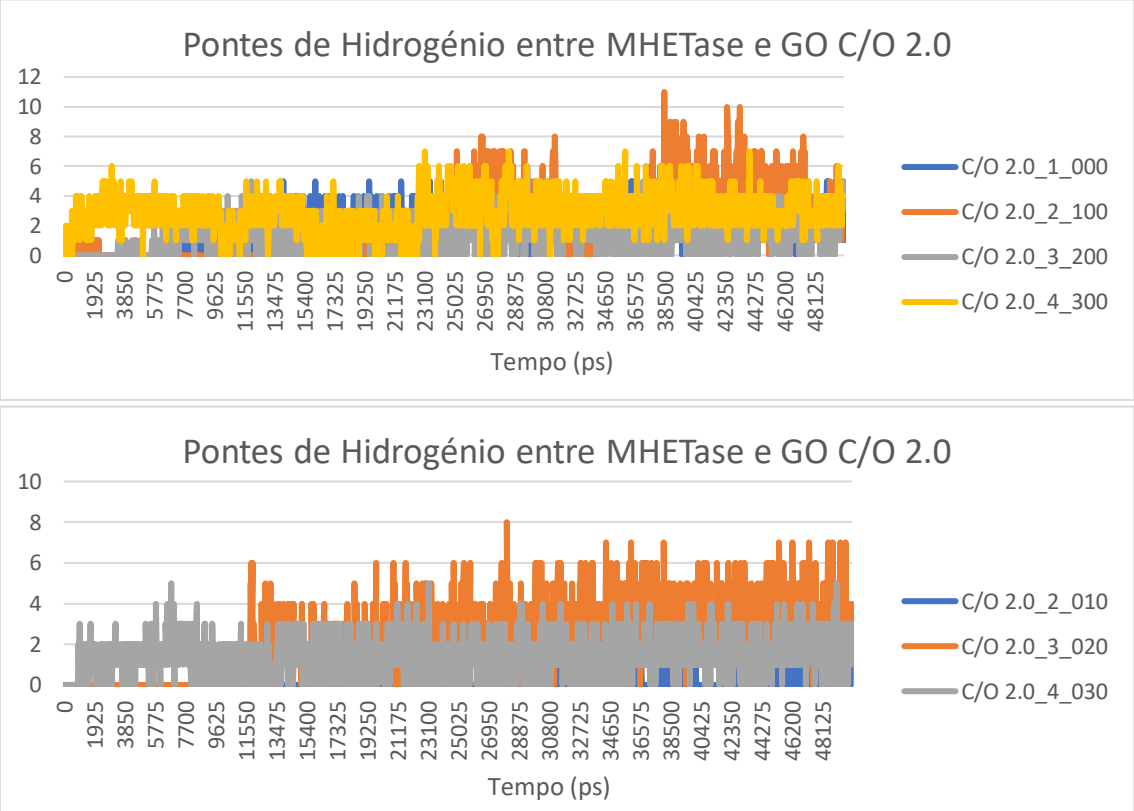


Figura 34 – Gráficos das pontes de hidrogénios de todas as conformações testadas de MHETase presente no óxido de grafeno com taxa de oxidação C/O 2.0.

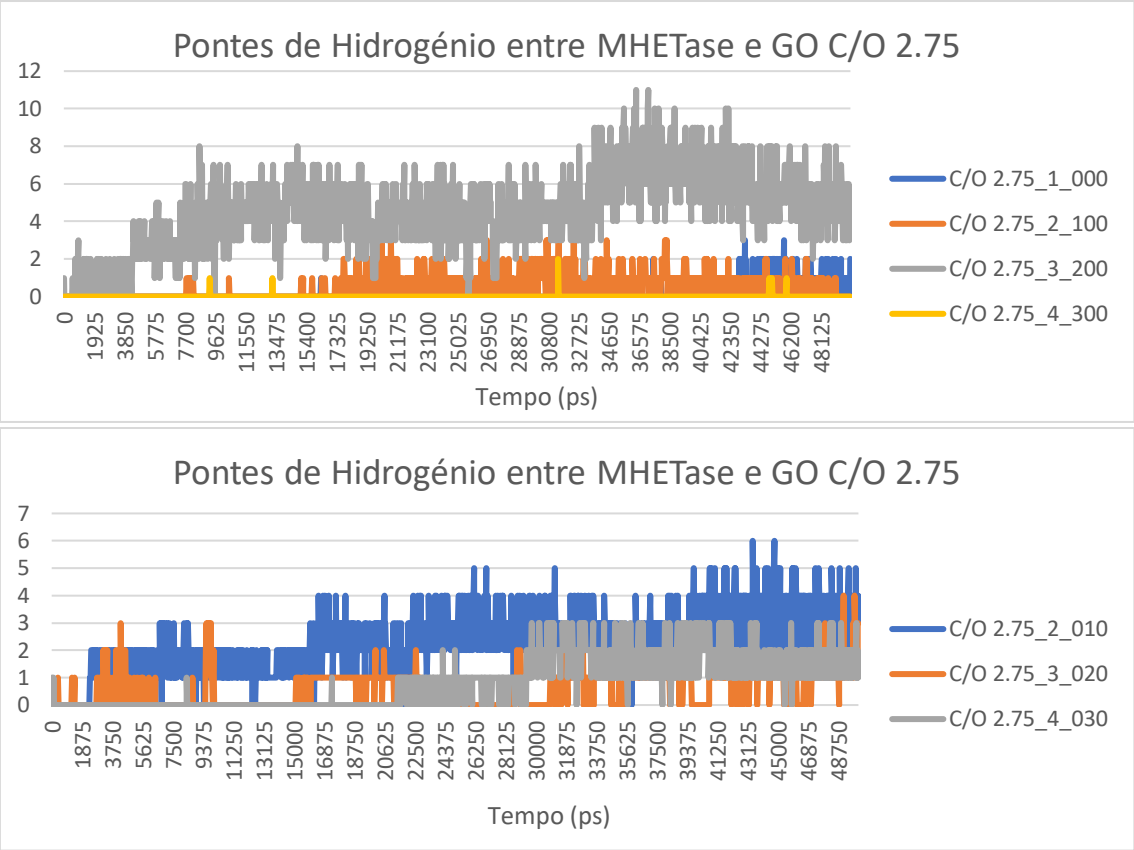


Figura 35 – Gráficos das pontes de hidrogénios de todas as conformações testadas de MHETase presente no óxido de grafeno com taxa de oxidação C/O 2.75.

Como visto, os resultados estão de acordo com o esperado, onde as estruturas menos oxidadas apresentam menos pontes de hidrogénio. Mas era de ser expectável um menor número de pontes de hidrogénio com a MHETase na folha com rácio C/O 3.0, mas isto aconteceu na folha com rácio C/O 2.75, mesmo comparando estas duas por quantidades pontes de hidrogénio intramoleculares, intermoleculares com o solvente, além da observação no VMD das folhas com rácio C/O 2.75 e 3.0, e constatar que a folha com rácio C/O 3.0 era menos oxidada. Isto ocorreu pois a folha com rácio C/O 2.75 ao ser gerada, apresentou uma grande “ilha” não oxidada no meio da folha de óxido de grafeno, exatamente na direção onde a proteína é inserida. E devido a este resultado ocorreram as maiores diferenças entre os números de pontes de hidrogénio com MHETase com a folha de rácio C/O 2.75, como podemos ver nas figuras 34 e 35.

Através de uma análise visual com o VMD (*Visual Molecular Dynamics*), observou-se que a proteína na folha com grau de oxidação C/O 2.75 apresentou movimentos translacionais ao longo da superfície devido a uma grande “ilha” sem oxidação, e ao chegar as partes oxidadas, ficou fixada pelas interações atrativas. Para efeito comparativo, temos a fixação da proteína na superfície de GO com taxa de oxidação C/O 2.0 (ver figuras 36 e 37).

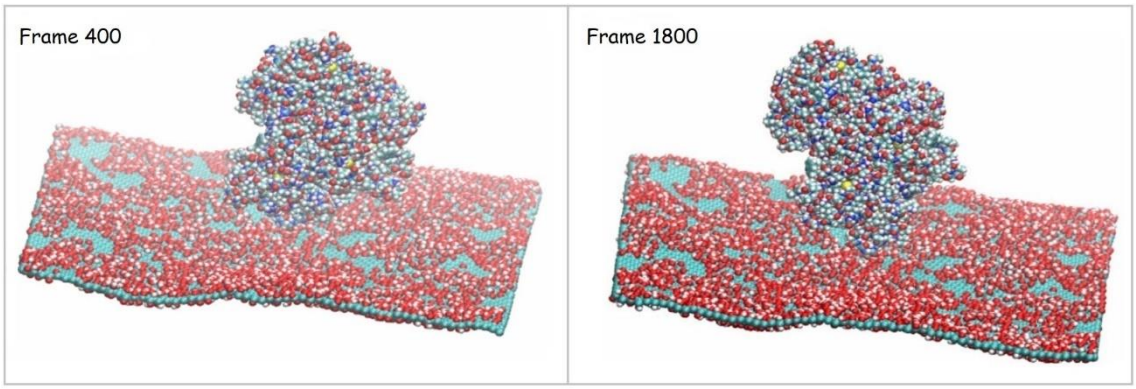


Figura 36 – Frames 400 (10 ns) e 1800 (45 ns) da adsorção da MHETase na folha GO C/O 2.0 4_030.

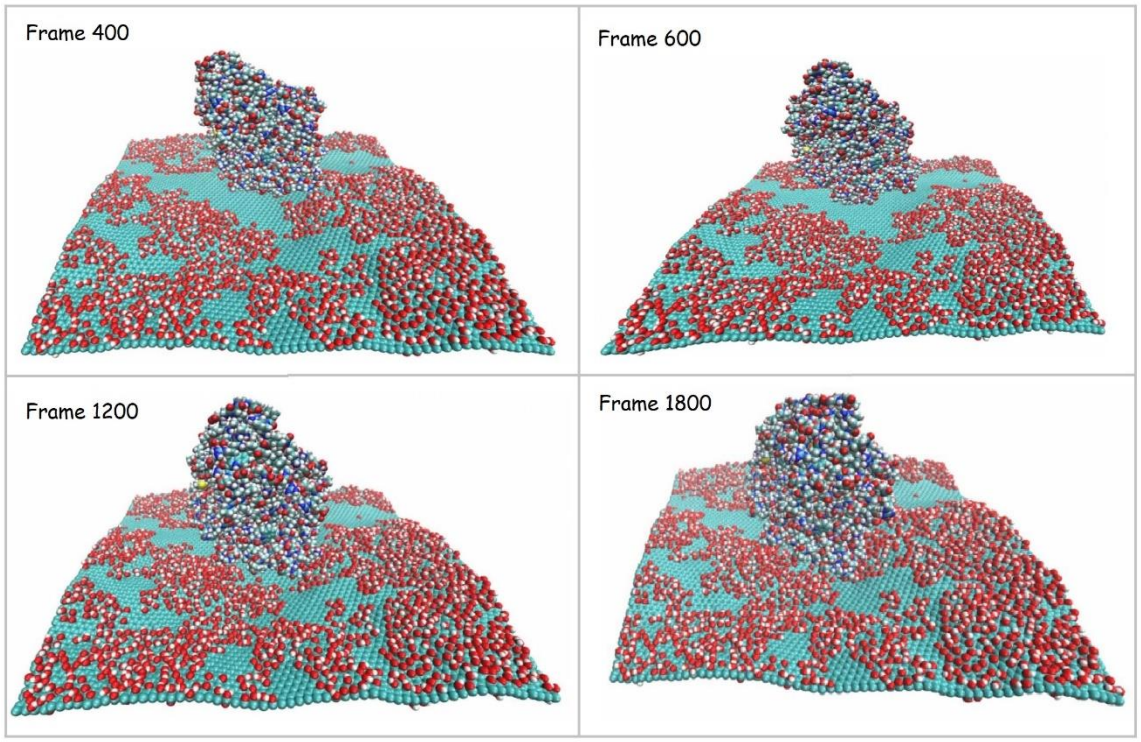


Figura 37 – Frames 400 (10 ns), 600 (15 ns), 1200 (30 ns) e 1800 (45 ns) da adsorção da MHETase na folha GO C/O 2.75 4_030.

As simulações que ocorreram na *Pristine*, como esperado, apresentaram zero ligações de hidrogénio entre MHETase e a estrutura, devido à ausência de grupos funcionais com a presença de oxigénio. Ao visualizar estas simulações no VMD, todas as 7 simulações com diferentes conformações sobre a superfície apresentaram demasiado movimento através do grafeno até o final da simulação (ver figura 38).

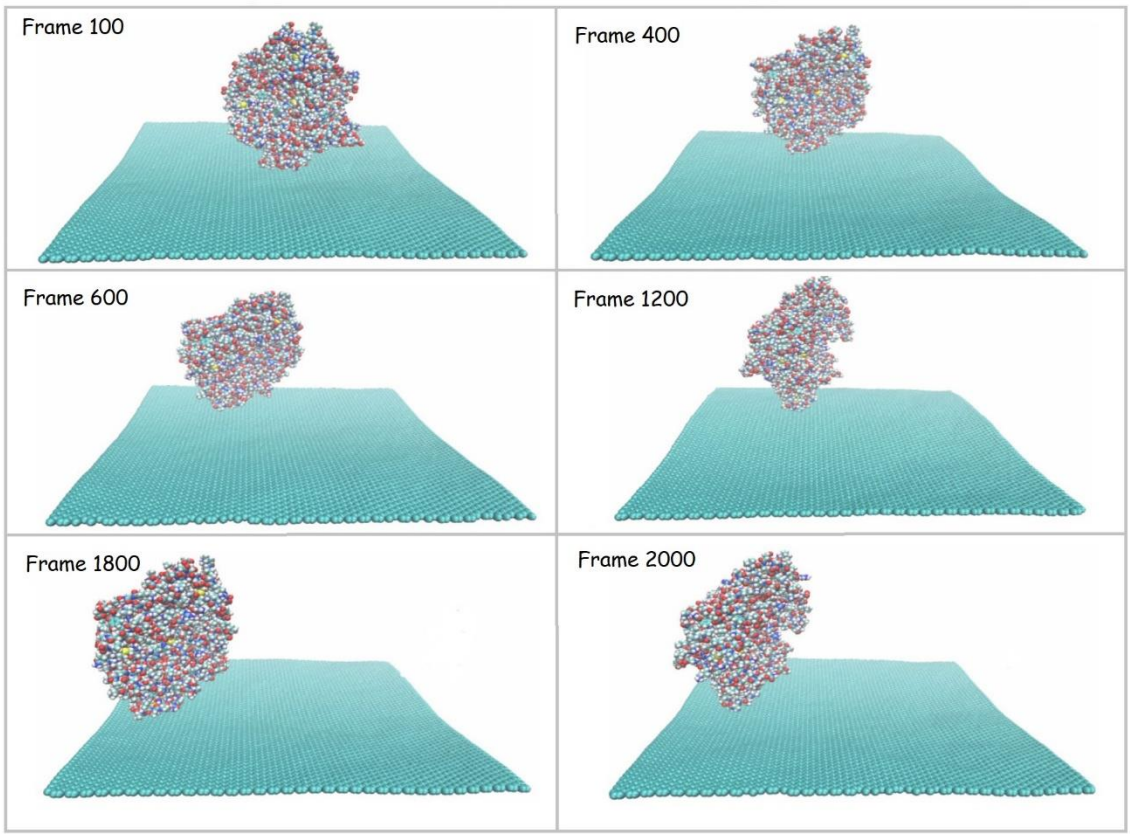


Figura 38 – Frames 100 (2,5 ns) 400 (10 ns), 600 (15 ns), 1200 (30 ns), 1800 (45 ns) e 2000 (50 ns) da adsorção da MHETase na folha Pristine 4_030.

Com estes resultados, é possível interpretar que a oxidação da folha de grafeno é muito vantajosa para a imobilização da MHETase, pois a enzima adsorvida mantém-se no sítio em que ocorreu sua adsorção devido as fortes interações atrativas com os grupos funcionais, em comparação com as ligações fracas de *van der Waals,* que acontecem entre proteína e adsorvente nas partes não oxidadas.

Com esses resultados, lança luz para novas pesquisas com outras enzimas nessa superfície de GO, principalmente para área industrial, onde com essa fixação, estas enzimas fiquem imobilizadas no sítio estipulado, sem se movimentar através desta, de acordo com o gradiente do ambiente que se encontra, onde sem a funcionalização, essas mesmas enzimas possam saturar em um ponto da estrutura.

3.4. Cálculos de LIE (*Linear Interaction Energy*)

Este é um método semi-empírico para calcular as energias livres de ligação a partir de simulações de DM criado por Aqvist el al. (Aqvist, Medina, & Samuelsson, 1994). O LIE é derivado do *Linear Response Approximation* (LRA) (F. S. Lee, Chu, Bolger, & Warshel, 1992). Um método de ponto final, que calcula as afinidades de ligação (estados ligados a proteínas e não ligado por ligando) que exigem um ajuste empírico de parâmetros de escala (Rifai, van Dijk, & Geerke, 2020). Estes calculos são feitos através das contribuições eletrostáticas que são experimentalmente calibradas pela simulação de MHETase em água, sendo estas as forças de *Coulomb* e de *Lennerd Jones*, onde foram obtidas a média destas para computarem com precisão e eficiência do ΔG da ligação.

Com estes valores eletrostáticos parametrizados, foram sucedidas as análises de LIE.

Metade das simulações apresentaram $\Delta G < 0$, um indicativo de reações exergónicas, ocorrendo espontaneamente. Seis simulações (ver figura 40) mantiveram o mesmo ΔG inicial, apesar de demonstrarem variações até o final da simulação, 4 simulações (ver figura 41) tiveram o valor de ΔG aumentado, sendo o $\Delta G > 0$ significativo de reações endergónicas, sendo não espontâneas. Onze simulações obtiveram valores decrescente, mas que não alcançaram o $\Delta G < 0$. Sendo possível que com um maior tempo de simulação estas consigam alcançar um resultado desejado.

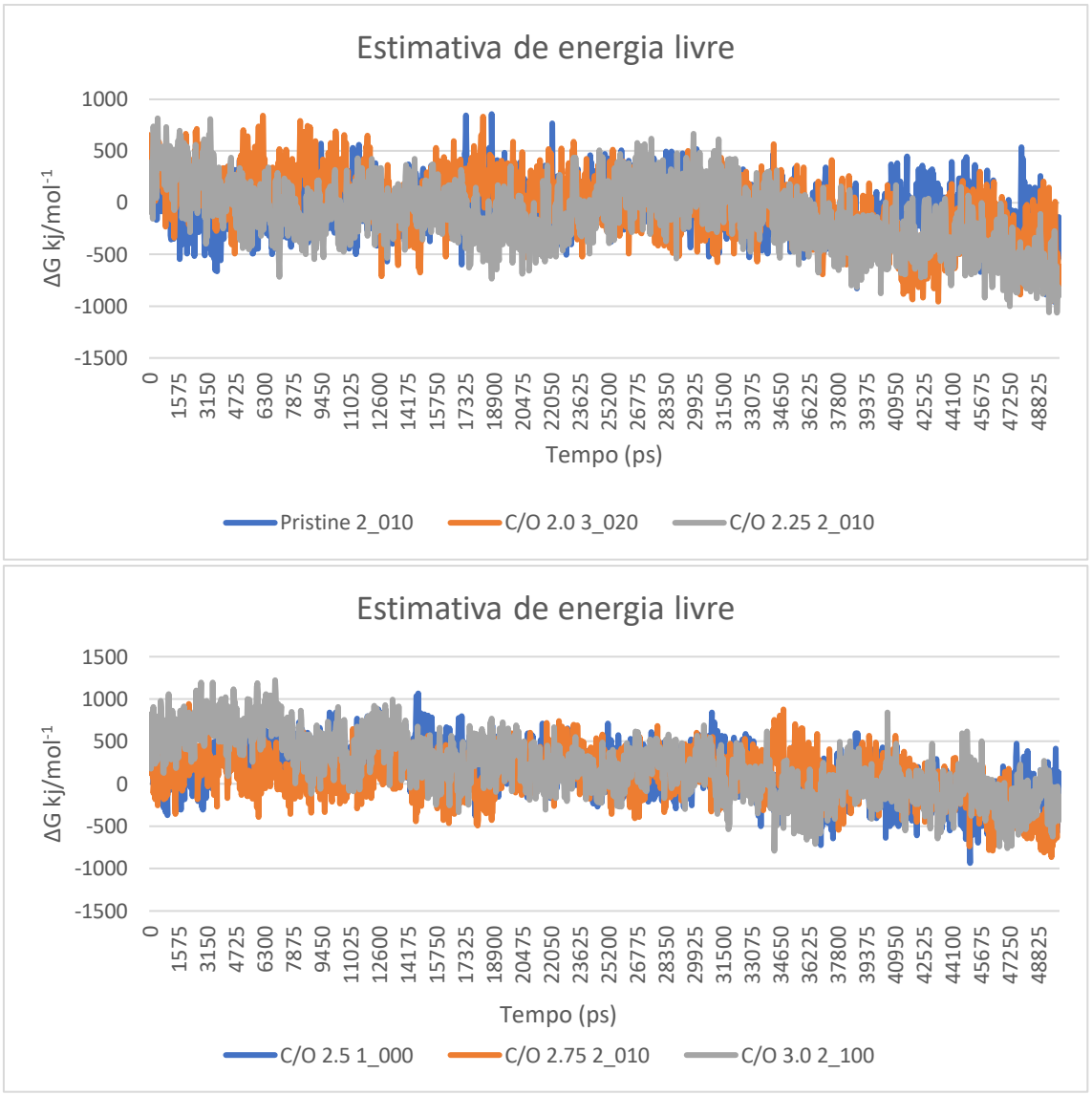


Figura 39 – LIE das simulações que mais apresentaram descréscimo de energia.

Os gráficos apresentados acima, representam o valor de LIE das 6 simulações que mais apresentaram decréscimo em seus valores, essa variante parece envolver uma interação atrativa que compete com as forças repulsivas e que obtiveram uma redução entre 1000 kj/mol neste ΔG.

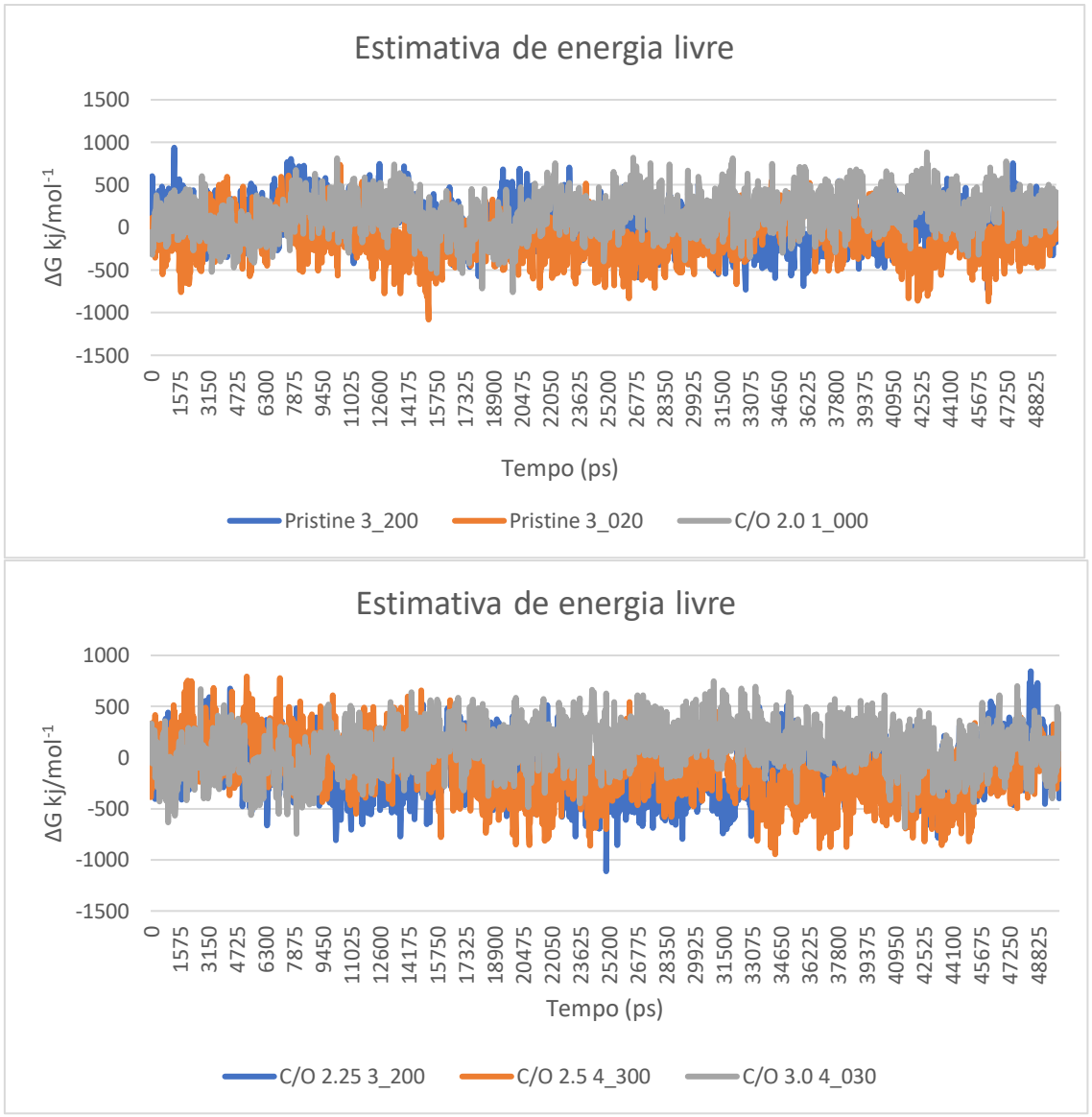


Figura 40 – LIE das 6 simulações que apresentaram valores de ΔG finais similares aos iniciais.

A seguir, serão apresentadas 4 simulações que tiveram um aumento nesta energia de interação ao final da simulação (ver figura 41).

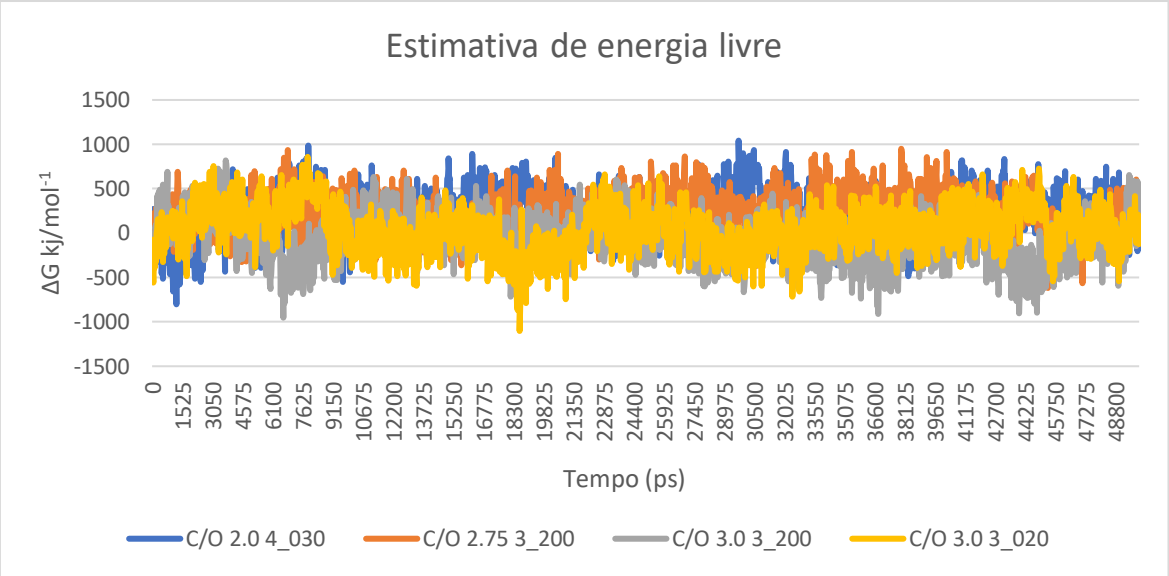


Figura 41 – LIE das simulações com valores de ΔG aumentados.

Visto a figura 41, é percebido uma oscilação no gráfico, uma característica da disputa das forças atrativas com as repulsivas. Mas, infelizmente, contra o esperado ao realizar essa análise, elas apresentaram valores finais acima ou quase o mesmo que os iniciais.

De modo geral, das 42 simulações, 10 apresentaram resultados em que estes tiveram valores não esperável. Mas as outras 32 simulações obtiveram valores decrescente. Mesmo muitos destes valores não serem de grande variação e alguns não terem chegado ao $\Delta G < 0$. É observado uma ligeira constante da diminuição deste valor até o final das simulações, abrindo margem a interpretação de que uma estabilização entre a superfície e a proteína pode estar começando a ocorrer.

Ainda é cedo para afirmar esta estabilidade, para isso é necessário mais estudos, com um tempo maior na fase de produção para serem produzidos valores que poderão afirmar tal estabilização, ou não. De modo geral, os resultados foram positivos e, independente com a conformação da proteína, não ocorreu diferenças entre essas, para que se possa dizer qual é a melhor conformação para a adsorção.

Conclusão

Os estudos realizados ajudam a entender os efeitos da funcionalização do grafeno na adsorção da MHETase, principalmente o impacto que estes grupos funcionais, contendo oxigénio, fazem nessa estrutura e também a conformação da enzima nesta superfície.

As análises em GO são de extrema importância, pois sua validação é essencial para proceder a etapa em que se simula esta com a enzima. Os resultados apresentados pela simulação do óxido de grafeno com dinâmica molecular usando os campos de forças OPLS-AA e GAFF2 entram em concordância com as literaturas revisadas. As análises sugerem, portanto, que folhas com rácios de oxidações maiores apresentam melhorias em suas propriedades.

Alguns resultados são mais relevantes que outros, sendo um destes relacionados a área da superfície em contacto com o solvente. Um estudo estudo feito por (Peng et al., 2018), indica que a aumento do rácio C/O melhora a afinidade do GO com água, pois as proporções de áreas hidrofílicas devido a presença desses grupos funcionais com oxigénio aumentam as pontes de hidrogénios intermoleculares com as moléculas de água. Mas, é importante fixar que os resultados da SASA apresentam diferenças entre os campos de forças usados. Em OPLS-AA os parâmetros de *van der Waals* dos átomos de hidrogénio apresentam valores nulos, sendo sua contribuição considerada nos parâmetros dos átomos pesados aos quais estão ligados, enquanto no GAFF2 esses parâmetros dos átomos de hidrogénio são dados explicitamente. Outra análise muito interessante, é sobre o RMSF, onde este aumentou com o decorrer da diminuição do rácio oxidativo. Isso ocorre devido ao impacto da distribuição dos grupos funcionais próximos, onde ocorre pontes de hidrogénio intramoleculares entre eles, estabilizando a estrutura, tornando-a mais rígida (Mouhat et al., 2020). Mas, ainda é cedo para afirmar este resultado, mesmo em conformidade com o artigo referido, pois este deriva de vários fatores, como a distorção da estrutura, e a interação com o solvente.

Com as estruturas para adsorção da MHETase validadas, a segunda fase deste projeto ocorreu com um extenso estudo sobre 5 rácios diferentes de oxidação da estrutura óxido de grafeno e em grafeno puro com diferentes conformações da proteína. Uma primeira análise do RMSd de todas as simulações mostra que a proteína não foi destruída neste processo de adsorção.

A adsorção da MHETase ocorreu em todas 42 simulações, e quase metade das simulações, essa adsorção aconteceu antes de entrar na fase de produção, ultrapassando as expetativas. Apenas em 5 simulações a adsorção ocorreu após 10000 ps, em que fizeram os primeiros contactos definitivos. A maioria desses contactos ao chegarem em um valor máximo, se mantiveram constantes até o final da simulação, poucas folhas apresentaram um leve decréscimo deste valor final.

Entre esses contactos, foram analisadas as pontes de hidrogénio entre superfície e MHETase. Como esperado, folhas com mais oxidações obtiveram mais pontes de hidrogénio com a enzima, e comparando esses resultados com análises observacionais no VMD, é percebido que contactos em regiões oxidadas oferecem melhor imobilização, pois estas ao serem adsorvidas, se fixam no mesmo sítio do primeiro contacto, sem se moverem através da superfície, um movimento ocorrido principalmente na folha *Pristine*, que não possui oxidação. Este resultado lança luz para novas pesquisas a respeito do uso dessa superfície de óxido de grafeno para adsorção enzimática. Em aplicação industrial isso é de grande vantagem, pois ao imobilizar enzima neste suporte, esta se fixa firmemente onde foi inserida, sem se locomover através deste, e por sua vez evitando saturar com outras enzimas presentes neste suporte.

Os resultados do LIE não foram tão otimistas, mas não foram ruins, pois era de se esperar um decaimento maior na energia de interação, que é um indicativo de estabilidade entre MHETase vs. superfície. Mas, vale ressaltar que estes resultados até ao final da simulação tendem a um decaimento neste valor. Como dito, ainda não foi possível afirmar a estabilização dessa ligação, mas é observado tal tendência.

Seguindos os métodos já revisados, as amostras estão em processo otimista de validação, onde os resultados são esperados, de acordo com a literatura. Mas, há muito o que explorar, além de um extenso estudo com tempos maiores de simulação entre MHETase e GO principalmente. Cabendo a futuras pesquisas criar um melhor equilíbrio entre energia livre e a contagem de pontes de hidrogénio.

Referências

1. Al-Salem, S. M., Lettieri, P., & Baeyens, J. (2009). Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review. *Waste Management, 29*(10), 2625-2643. doi:https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.06.004
2. Aqvist, J., Medina, C., & Samuelsson, J. E. (1994). A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng, 7*(3), 385-391. doi:10.1093/protein/7.3.385
3. Barlette, V. E. e. F., Luiz Carlos Gomide. (1999). Termodinâmica estatística de líquidos com o método de Monte Carlo. I. Metodologia. Química Nova [online]. *v. 22, n. 2*. Retrieved from https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000200017
4. Barreiro, E. J. e. a. (1997). Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *v. 20, n. 3*, 300-310. Retrieved from https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011
5. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics, 81*(8), 3684-3690. doi:10.1063/1.448118
6. Bizzarri, A. R., & Cannistraro, S. (2002). Molecular Dynamics of Water at the Protein−Solvent Interface. *The Journal of Physical Chemistry B, 106*(26), 6617-6633. doi:10.1021/jp020100m
7. Cao, L., Langen, L. v., & Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology, 14*(4), 387-394. doi:https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00096-X
8. Chapter 2 - Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS. (2019). In S. Sharma (Ed.), *Molecular Dynamics Simulation of Nanocomposites Using BIOVIA Materials Studio, Lammps and Gromacs* (pp. 39-100): Elsevier.
9. Coelho, L. W. e. a. (1999). Molecular mechanics application in inorganic Chemistry. *Química Nova [online], v. 22, n. 3*, pp. 396-404. doi:https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000300018
10. Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., . . . Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One, 9*(12), e111913. doi:10.1371/journal.pone.0111913
11. Física, U. d. C.-D. d. (2003/2004). Mecânica Estatística. Retrieved from http://fis.uc.pt/data/20032004/apontamentos/apnt_100_27.pdf. Retrieved 24, Jun. 2021 http://fis.uc.pt/data/20032004/apontamentos/apnt_100_27.pdf

12. Fonseca, A. F., Zhang, H., & Cho, K. (2015). Formation energy of graphene oxide structures: A molecular dynamics study on distortion and thermal effects. *Carbon, 84*, 365-374. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.12.026
13. Frenkel, D., & Smit, B. (2002). Chapter 15 - Tackling Time-Scale Problems. In D. Frenkel & B. Smit (Eds.), *Understanding Molecular Simulation (Second Edition)* (pp. 409-429). San Diego: Academic Press.
14. García-Iriepa, C., Zemmouche, M., Ponce-Vargas, M., & Navizet, I. (2019). The role of solvation models on the computed absorption and emission spectra: the case of fireflies oxyluciferin. *Physical Chemistry Chemical Physics, 21*(8), 4613-4623. doi:10.1039/C8CP07352J
15. Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv, 3*(7), e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782
16. Github. (2018). velocirobbie/make-graphitics. Retrieved from https://github.com/velocirobbie/make-graphitics
17. Gonçalves, M. C. P., Kieckbusch, T. G., Perna, R. F., Fujimoto, J. T., Morales, S. A. V., & Romanelli, J. P. (2019). Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. *Process Biochemistry, 76*, 95-110. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.016
18. GONCALVES, R. B. (2012). *MODELAGEM TEÓRICA E COMPUTACIONAL DE DENDRÍMEROS PARA O TRANSPORTE DE TUBERCULOSTÁTICOS.* Retrieved from https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/Busca_etds.php?strSecao=resultado&nrSeq=21310@1https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/Busca_etds.php?strSecao=resultado&nrSeq=21310@2
19. Hage Jr., E. (1998). Aspectos históricos sobre o desenvolvimento da ciência e da tecnologia de polímeros. *Polímeros, 8*, 6-9. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14281998000200003&nrm=iso
20. Hoarau, M., Badieyan, S., & Marsh, E. N. G. (2017). Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level. *Organic & Biomolecular Chemistry, 15*(45), 9539-9551. doi:10.1039/C7OB01880K
21. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology, 6*(4), 185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9
22. Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 364*(1526), 2115-2126. doi:10.1098/rstb.2008.0311

23. Imran, M., Kim, B.-K., Han, M., Cho, B. G., & Kim, D. H. (2010). Sub- and supercritical glycolysis of polyethylene terephthalate (PET) into the monomer bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET). *Polymer Degradation and Stability, 95*(9), 1686-1693. doi:https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.05.026

24. Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science, 61*(3), 1017-1026. doi:https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.05.067

25. Knott, B. C., Erickson, E., Allen, M. D., Gado, J. E., Graham, R., Kearns, F. L., . . . McGeehan, J. E. (2020). Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 117*(41), 25476. doi:10.1073/pnas.2006753117

26. Kress, J., Zanaletti, R., Amour, A., Ladlow, M., Frey, J. G., & Bradley, M. (2002). Enzyme Accessibility and Solid Supports: Which Molecular Weight Enzymes Can Be Used on Solid Supports? An Investigation Using Confocal Raman Microscopy. *Chemistry – A European Journal, 8*(16), 3769-3772. doi:https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020816)8:16<3769::AID-CHEM3769>3.0.CO;2-V

27. Lee, D. W., De Los Santos V, L., Seo, J. W., Felix, L. L., Bustamante D, A., Cole, J. M., & Barnes, C. H. W. (2010). The Structure of Graphite Oxide: Investigation of Its Surface Chemical Groups. *The Journal of Physical Chemistry B, 114*(17), 5723-5728. doi:10.1021/jp1002275

28. Lee, F. S., Chu, Z. T., Bolger, M. B., & Warshel, A. (1992). Calculations of antibody-antigen interactions: microscopic and semi-microscopic evaluation of the free energies of binding of phosphorylcholine analogs to McPC603. *Protein Eng, 5*(3), 215-228. doi:10.1093/protein/5.3.215

29. Lerf, A., He, H., Forster, M., & Klinowski, J. (1998). Structure of Graphite Oxide Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B, 102*(23), 4477-4482. doi:10.1021/jp9731821

30. Li, F., Jiang, X., Zhao, J., & Zhang, S. (2015). Graphene oxide: A promising nanomaterial for energy and environmental applications. *Nano Energy, 16*, 488-515. doi:https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2015.07.014

31. Liu, L., Wang, L., Gao, J., Zhao, J., Gao, X., & Chen, Z. (2012). Amorphous structural models for graphene oxides. *Carbon, 50*(4), 1690-1698. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.12.014

32. Markit, M. G. L. I. (2018). PET Polymer Chemical Economics Handbook. IHS Markit. Retrieved from https://ihsmarkit.com/products/chemical-economics-handbooks.html

33. Martins, J. P. S. P. R. (2012). *Modelação Molecular de Agentes Intercalantes do ADN em Líquidos Iónicos.* (Mestrado Dissertação). Universidade do Minho, Retrieved from http://hdl.handle.net/1822/23029

34. Mastellone, M. L. (1999). Thermal treatments of plastic wastes by means of fluidized bed reactors. Ph.D. Thesis, Department of Chemical Engineering, Second University of Naples, Italy.

35. Mouhat, F., Coudert, F.-X., & Bocquet, M.-L. (2020). Structure and chemistry of graphene oxide in liquid water from first principles. *Nature Communications, 11*(1), 1566. doi:10.1038/s41467-020-15381-y

36. N., C., S., S., P.A., F., & M.J., R. (2015/2016). Bioquímica Computacional, Sebenta com conteúdos teóricos essenciais.

37. Namba, A. M., Silva, V. B. d., & Silva, C. H. T. P. d. (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química, 33*(4), 13-23. Retrieved from https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42915810002

38. Nimchua, T., Punnapayak, H., & Zimmermann, W. (2007). Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from Fusarium oxysporum LCH I and Fusarium solani f. sp. pisi. *Biotechnol J, 2*(3), 361-364. doi:10.1002/biot.200600095

39. Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., . . . Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading Ideonella sakaiensis MHETase bound to a substrate. *Nature Communications, 10*(1), 1717. doi:10.1038/s41467-019-09326-3

40. Park, S., & Ruoff, R. S. (2009). Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology, 4*(4), 217-224. doi:10.1038/nnano.2009.58

41. Peng, E., Todorova, N., & Yarovsky, I. (2018). Effects of Size and Functionalization on the Structure and Properties of Graphene Oxide Nanoflakes: An in Silico Investigation. *ACS Omega, 3*(9), 11497-11503. doi:10.1021/acsomega.8b00866

42. Pessôa, K. F., Correia, J. C. G., Carauta, A. N. M., & Silva, F. B. d. (2018). *Revisão de alguns principais métodos utilizados em modelagem molecular Parte I - Mecânica Molecular*.

43. Ragaert, K., Delva, L., & Van Geem, K. (2017). Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Management, 69*, 24-58. doi:https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.044

44. RCSB PDB, P. D. B. (2019). Crystal structure of Ideonella sakaiensis MHETase bound to the non-hydrolyzable ligand MHETAs. Retrieved from https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00006qga
45. Rifai, E. A., van Dijk, M., & Geerke, D. P. (2020). Recent Developments in Linear Interaction Energy Based Binding Free Energy Calculations. *Frontiers in molecular biosciences, 7*, 114-114. doi:10.3389/fmolb.2020.00114
46. Rino, J. P., & Studart, N. (2001). *Um potencial de interação para o estudo de materiais e simulações por dinâmica molecular.* Universidade Federal de São Carlos, Química Nova [online].
47. Rodrigues, C. R. (2001). Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. *Química Nova na escola, Nº 3,* 43-49.
48. Rogge, S. M. J., Vanduyfhuys, L., Ghysels, A., Waroquier, M., Verstraelen, T., Maurin, G., & Van Speybroeck, V. (2015). A Comparison of Barostats for the Mechanical Characterization of Metal–Organic Frameworks. *Journal of Chemical Theory and Computation, 11*(12), 5583-5597. doi:10.1021/acs.jctc.5b00748
49. Sant'Anna, C. (2009). Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction Métodos de Modelagem Molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química, 1*. doi:10.5935/1984-6835.20090007
50. Sant'Anna, C. M. R. (2002). *Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997).* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
51. Segalin, J. (2008). *Parâmetros de carga para o campo de força e análise estrutural do aminoesteróide esqualamina.* (Mestrado Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
52. SILVA, A. M. D. (2019). *EFEITO DE ÍONS AL3+, NA+ E CL- EM BICAMADAS DE LIPÍDIO A: ESTUDO METODOLÓGICO E ESTRUTURAL POR DINÂMICA MOLECULAR.* (Mestrado Dissertação). Universidade Federal de Pernambuco,
53. Sinclair, R. C., Suter, J. L., & Coveney, P. V. (2018). Graphene–Graphene Interactions: Friction, Superlubricity, and Exfoliation. *Advanced Materials, 30*(13), 1705791. doi:https://doi.org/10.1002/adma.201705791
54. Stauffer, D., Dragneva, N., Floriano, W. B., Mawhinney, R. C., Fanchini, G., French, S., & Rubel, O. (2014). An atomic charge model for graphene oxide for exploring its bioadhesive properties in explicit water. *J Chem Phys, 141*(4), 044705. doi:10.1063/1.4890503
55. Teixeira, M. V. B. (2012). Apontamentos/Mecânica Estatística *Cap. 4*. Retrieved from http://fma.if.usp.br/~mlima/teaching/4320293_2012/Cap4.pdf

56. Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 364*(1526), 2153-2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053

57. Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., & Ghoshal, S. K. (2020). On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *Reactive and Functional Polymers, 152*, 104613. doi:https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613

58. Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Curr Opin Biotechnol, 17*(6), 574-579. doi:10.1016/j.copbio.2006.10.009

59. Yang, J., Shi, G., Tu, Y., & Fang, H. (2014). High Correlation between Oxidation Loci on Graphene Oxide. *Angewandte Chemie International Edition, 53*(38), 10190-10194. doi:https://doi.org/10.1002/anie.201404144

60. Yong, X., & Zhang, L. T. (2013). Thermostats and thermostat strategies for molecular dynamics simulations of nanofluidics. *The Journal of Chemical Physics, 138*(8), 084503. doi:10.1063/1.4792202

61. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., . . . Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science, 351*(6278), 1196-1199. doi:10.1126/science.aad6359

62. Zhang, J., Zhang, F., Yang, H., Huang, X., Liu, H., Zhang, J., & Guo, S. (2010). Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization. *Langmuir, 26*(9), 6083-6085. doi:10.1021/la904014z