



**Teobaldo Ricardo Cuya Guizado**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DA INTERAÇÃO DE  
PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS DE FERRO COM  
ALBUMINA SÉRICA HUMANA**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro  
Co-Orientador: Pedro Geraldo Pascutti

Rio de Janeiro, março de 2008



**Teobaldo Ricardo Cuya Guizado**

**Estudos Computacionais da Interação de Porfirinas  
e seus Complexos de Ferro com Albumina Sérica Humana**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro**

Orientadora  
Departamento de Física – PUC-Rio

**Prof. Pedro Geraldo Pascutti**

Co-Orientador  
UFRJ

**Profa. Célia Anteneodo**

Departamento de Física – PUC-Rio

**Prof. Iouri Borissevitch**

USP

**Prof. André Silva Pimentel**

Departamento de Química – PUC-Rio

**José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial do Centro  
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 28 de março de 2008

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

## Teobaldo Ricardo Cuya Guizado

Graduou-se em Física na Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima-Perú) em 1995 com ênfase em Física,

Iniciou o mestrado em Física na PUC em 2006 na área de Biofísica Molecular.

### Ficha Catalográfica

Cuya Guizado, Teobaldo Ricardo

Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana / Teobaldo Ricardo Cuya Guizado ; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro ; co-orientador: Pedro Geraldo Pascutti. – 2008.

138 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Física)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular. 4. Porfirinas. 5. Albumina. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pascutti, Pedro Geraldo. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. IV. Título.

CDD: 530

A mi querido hermano, José Antonio Cuya Guizado

## Agradecimentos

A minha orientadora, professora Sônia Renaux Wanderley Louro, por ter me aceitado e acreditado em minha pessoa. Sua ajuda durante o desenvolvimento do projeto foi importante, pela sua amizade.

Ao meu co-orientador Pedro Pascutti do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular do Instituto Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo seu ensino, ajuda e amizade.

A todo o pessoal administrativo do Departamento de Física da PUC-Rio, especialmente a Giza e Julinho pela ajuda sempre oportuna.

A meus colegas do Departamento de Física da Universidade da PUC-Rio, e do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular do Instituto Carlos Chagas Filho da UFRJ. Especiais menções merecem Arlan Gonçalves, Samuel Pita, Diego Enry e Pedro Loureiro, pela sua amizade.

À instituição CNPq pelo apoio financeiro.

## Resumo

Cuya Guizado, Teobaldo Ricardo; Louro, Sônia Renaux Wanderley; Pascutti, Pedro Gerardo. **Estudos Computacionais da Interação de Porfirinas e seus Complexos de Ferro com Albumina Sérica Humana.** Rio de Janeiro, 2008. 138p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A aparição do HIV na década de 80 e de outros vírus presentes no sangue dos doadores, assim como a expansão de doenças como a hepatite C, tem estimulado as pesquisas para desenvolver substitutos do sangue. Pesquisas recentes têm sido realizadas em derivados artificiais da albumina de soro humano (human serum albumin – HSA) associados com heme, representando uma linha promissora nesse sentido. No presente trabalho, fazemos um estudo computacional da ligação do heme e de seu precursor, a protoporfirina IX, com a HSA, com o objetivo de conhecer os aminoácidos que contribuem à estabilidade da ligação, a natureza do sítio de ligação, a formação de possíveis sítios secundários de ligação e a influência das porfirinas na estrutura global da proteína. Para conseguir este objetivo utilizamos técnicas de cálculo quântico usando a Teoria do Funcional de Densidade, *Docking* Molecular e Dinâmica Molecular. Finalmente fazemos um estudo da correlação existente entre as diferentes regiões da HSA e de como este padrão muda na presença das porfirinas. Para este propósito usamos os coeficientes de correlação generalizada baseados na formulação de Kraskov. Com base nestas informações, discutimos a contribuição que poderiam fornecer nossos cálculos para a reengenharia do HSA, no sentido de fornecer-lhe características de hemoproteínas.

## Palavras-chaves

Biofísica, Heme, Protoporfirina IX, Dinâmica Molecular, Teoria do Funcional de Densidade, Hidrofobicidade, Solvatação, RESP, *Docking* Molecular, Correlação Generalizada.

## Abstract

Cuya Guizado, Teobaldo Ricardo; Louro, Sônia Renaux Wanderley; Pascutti, Pedro Geraldo. **Computational Studies of the Interaction of Porphyrins and their Iron Complexes with Human Serum Albumin.** Rio de Janeiro, 2008. 138p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The uprising of HIV and other viruses in the beginning of the 80s, as well as the expansion of other diseases like hepatitis C has stimulated research in order to develop blood substitutes. Research based on modified Human Serum Albumin associated with heme has shown a promissory line in this direction. In the present work we make a computational study about the heme and its precursor, the Protoporphyrin IX complexed with HSA, in order to know the contribution of the main amino acids to the stability of the binding, the character of the binding site, secondary binding sites formation, and the influence of the porphyrins in the global protein structure. To find this objective we use quantum calculations based on Functional Density Theory, Molecular Docking and Molecular Dynamics. Finally, a correlation study between different regions of HSA and the pattern modifications caused by the porphyrins were performed, using the generalized correlation coefficients based on the Kraskov formulation. We also discuss the contribution that our calculations could give to the reengineering of HSA, to provide them with hemeprotein characteristics.

## Keywords

Biophysics, Heme, Protoporphyrin IX, Molecular Dynamics, Functional Density Theory, Hydrophobicity, Solvation, RESP, Molecular Docking, Generalized Correlation.

# Sumário

1.	Introdução	16
1.1	Posicionamento e abordagem do problema	16
1.1.1	As Porfirinas	18
1.1.2	A albumina Serica Humana	22
1.2	Objetivos	26
1.3	Estrutura dos Capítulos	26
2.	Técnicas computacionais – Aproximação clássica e aproximação quântica	28
2.1	Aproximação Clássica - Função de interação e equações de movimento	29
2.2	O Hamiltoniano e a Função de Interação: Campo de Forças	31
2.2.1	Interações entre átomos (ou grupos) ligados	31
2.2.2	Interações não ligadas	33
2.2.3	Potenciais especiais devido a restrições	34
2.3	Tratamento das interações entre átomos não ligados, aproximações.	35
2.3.1	Exclusão ou modificação de interações	35
2.3.2	Distância de corte de interações não ligadas	36
2.3.3	Interações eletrostáticas - limites sobre as interações eletrostáticas	37
2.4	Tratamento das fronteiras	37
2.4.1	Condições periódicas	37
2.5	Geração da topologia, coordenadas atômicas e adição do solvente	39
2.5.1	Topologia do Sistema	39
2.5.2	Colocando o soluto numa caixa de água	39
2.6	Mecânica e Dinâmica Molecular	40
2.6.1	Minimização de energia	40
2.6.2	Dinâmica Molecular	42
2.7	Controle da temperatura	44
2.8	Controle da Pressão	44
2.9	Função de distribuição radial	46
2.10	Modelo para a água	47

2.10.1	O modelo SPC (Single Point Charge)	48
2.11	Tratamento eletrostático da proteína	49
2.11.1	Aplicação da Equação de Poisson-Boltzmann para o cálculo de energias eletrostáticas em proteínas	50
2.12	Superfícies de interação molecular	52
2.13	"Docking" Molecular - Algoritmo Genético	53
2.14	Correlação em dinâmica de biomoléculas	53
2.15	Aproximação Quântica - Teoria do Funcional de Densidade ( DFT)	55
2.15.1	Introdução à DFT	56
2.15.2	Descrição da teoria	57
2.15.3	Descrição matemática	57
2.15.4	O Método RESP (Restrained Electrostatic Potential)	58
3.	Resultados e Discussão	60
3.1	Cálculo das cargas das porfirinas	60
3.1.1	Cálculo quântico - programa Gamess	60
3.1.2	Base escolhida na entrada do Gamess para o cálculo do ESP	61
3.1.3	Otimizando a geometria das porfirinas	62
3.1.4	Obtenção das cargas a partir do ESP	62
3.2	Geração das topologias para as porfirinas	65
3.3	Solvatação e estabilidade das porfirinas na água	65
3.3.1	Heme e PPIX	67
3.3.2	Grupo carboxil	68
3.3.3	Oxigênio do carboxil	68
3.3.4	O Fe <sup>2+</sup> do heme	69
3.4	DM dos sistemas HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME, Propriedades globais	70
3.4.1	Desvio médio quadrático	71
3.4.2	Desvio médio quadrático 3D	76
3.4.3	Raio de Giro	79
3.4.4	Evolução da energia	81
3.4.5	Flexibilidade dos resíduos na proteína	83
3.5	Superfície de contato intermolecular entre HSA e as porfirinas	85
3.6	Distância entre os aminoácidos do HSA que mais interagem com as porfirinas	88
3.6.1	Distância entre os aminoácidos do HSA que mais interagem com PPIX	88

3.6.2	Distância entre os amino ácidos do HSA que mais interagem com o HEME	91
3.7	Pontes de hidrogênio entre o HSA e as porfirinas	94
3.8	Análise da superfície eletrostática dos sistemas HSA, HSA-PPIX e HSA-heme	97
3.9	Prováveis segundos sitio de ligação das porfirinas no HSA	101
3.10	Existem regiões do HSA correlacionadas ao subdomínio IB?	102
4.	Conclusão e Perspectivas	110
4.1	Conclusões	110
4.2	Perspectivas	111
	Referencias Bibliograficas	112
	Apêndice A : Inputs do Gammes	118
	Apêndice B : Topologia da Protoporfirina ix	129
	Apendice C: Protocolo da Dinamica Molecular	138

## Lista de figuras

Figura 1.1	Estrutura básica da porfirina	19
Figura 1.2	Bandas de Soret e bandas Q no espectro de absorção da porfirina.	19
Figura 1.3	Heme (esquerda), PPIX (direita)	20
Figura 1.4	Esquema da estrutura secundária de HSA com subdomínios codificados por cores	22
Figura 1.5	Esquema mostrando os sítios de vários ligantes da albumina sérica humana	24
Figura 2.1	Potencial de Lennard-Jones	34
Figura 2.3	Interações entre primeiros vizinhos (1-2), segundos vizinhos (1-3) e terceiros vizinhos (1-4)	35
Figura 2.4	Método da dupla distância de corte.	36
Figura 2.5	Condições periódicas em duas dimensões	38
Figura 2.7	A molécula Heme numa caixa de água	40
Figura 2.8	Superfície de energia potencial	41
Figura 2.9	Integração das equações de movimento no algoritmo de leap-frog	43
Figura 2.10	Função $g(r)$ mostrando a distribuição da matéria em torno do átomo central	47
Figura 2.11	Modelos de solvente implícito e modelos de solvente explícito	47
Figura 2.12	Molécula de água no modelo SPC	48
Figura 2.13	Modelo para cálculo da superfície eletrostática	51
Figura 2.14	Constantes dielétricas que caracterizam os diferentes meios nos quais se aplica a equação de Poisson-Boltzmann	51
Figura 2.15	Definições de SAS e SM.	52
Figura 2.16	Correlação de variáveis aleatórias	54
Fig 2.17	A obtenção das cargas a partir do ESP para o heme	59

Figura 3.2	PPIX e Heme numa caixa de água	66
Figura 3.3	Gráfico de $g(r)$ para as moléculas de protoporfirina IX e heme	67
Figura 3.4	Gráfico do $g(r)$ para o grupo carboxil	68
Figura 3.5.	Gráfico de $g(r)$ para o oxigênio do carboxil das porfirinas	69
Figura 3.6	Gráfico de $g(r)$ para o íon $Fe^{2+}$	70
Figura 3.7	Da esquerda para a direita, HSA-HEME, HSA-PPIX e HSA, mostrando a conformação da porfirina cada 2 ns	72
Figura 3.8	De cima para baixo, sobreposição da estrutura inicial e final da HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME	73
Figura 3.9	De cima para baixo: Em preto, RMSD da cadeia de HSA, HSA-PPIX e HSA-HEME em relação à cadeia da estrutura inicial	74
Figura 3.10	RMSD da PPIX com relação a PPIX na estrutura inicial	75
Figura 3.11	RMSD do heme no sítio de ligação durante o primeiro nano segundo da simulação	76
Figura 3.12	RMSD 3D do HSA, mostrando as quatro vistas principais	77
Figura 3.13	RMSD 3D do HSA-PPIX, mostrando as quatro vistas principais	78
Figura 3.14	RMSD 3D do HSA-HEME, mostrando as quatro vistas principais	79
Figura 3.15	Raio de giro da HSA	80
Figura 3.16	Raio de giro do complexo HSA-PPIX	80
Figura 3.17	Raio de giro do complexo HSA-HEME	81
Figura 3.18	Energia total do HSA e seus complexos, mostrando que o sistema é estável energeticamente	82
Figura 3.19	Energia total do HSA e seus complexos, mostrando que o sistema já é estável a partir dos 100 ps	82
Figura 3.20	RMSF de HSA e de HSA complexada com PPIX	84
Figura 3.21	RMSF de HSA e de HSA complexada com heme	84
Figura 3.22	RMSF do HSA-heme e do HSA-PPIX	85

Figura 3.23	Área de contacto intermolecular entre HSA e as porfirinas	87
Figura 3.24	Distância do centro de massas dos aminoácidos e do ligante PPIX à cadeia de HSA	89
Figura 3.25	Distância entre o OH da TYR-161 e os nitrogênios NAW e NAE do ligante PPIX	90
Figura 3.26	Distância entre o OH da TYR-161 e os nitrogênios NBA e NAN do ligante PPIX	90
Figura 3.27	Distância dos principais aminoácidos do HSA que interagem com o heme ao CM da cadeia	92
Figura 3.28	No lado proximal, TYR-161 interagindo frontalmente com o Fe <sup>2+</sup> do heme; no lado distal TYR-138 interagindo com os nitrogênios do anel	92
Figura 3.29	Distância entre o oxigênio OH-TYR161 e o íon Fe <sup>2+</sup> do heme	93
Figura 3.30	Comparação teórica-experimental da microvizinhança molecular obtido por raios X e a microvizinhança molecular obtido em nossos cálculos	93
Figura 3.31	Ligações de hidrogênio da PPIX com HSA e o com o água nas vizinhanças do sítio de ligação	96
Figura 3.32	Número de ligações de hidrogênio do heme com a proteína (preto) e com o solvente presente nas vizinhanças do sítio de ligação	96
Figura 3.33	De cima para baixo: superfície eletrostática do HSA, HSA-PPIX e HSA-heme depois de 20 ns de DM	99
Figura 3.34	De cima para baixo: superfície eletrostática do subdomínio IB do HSA, HSA-PPIX e HSA-heme depois de 20 ns de DM.	100
Figura 3.35	Segundo provável sitio de ligação da PPIX no HSA	101
Figura 3.36	Potencial eletrostático na superfície da proteína na região do segundo provável sitio de ligação da PPIX no HSA	102
Figura 3.37	Padrão de correlação do HSA	103
Figura 3.38	Matriz da diferença entre as matrizes de correlação total e linear do HSA	104

Figura 3.39	Padrão de correlação generalizada do HSA e HSA-HEME	105
Figura 3.40	Padrão de correlação generalizada do HSA e HSA-PPIX	106
Figura 3.41	Padrão de correlação generalizada: HSA e HSA-HEME, nesta figura mostra-se entre as paralelas as regiões diretamente correlacionados com a região compreendida entre os resíduos 100-200	107
Figura 3.42	Região (100-118, vermelho) correlacionada com a região (460-465, amarelo)	108
Figura 3.43	Região (100-118, vermelho) correlacionada com a região (306-313, amarelo)	108
Figura 3.44	Região (110-140, vermelho) correlacionada com a região (500-582, amarelo)	109

## Abreviaturas

CHELPG	Cargas do potencial eletrostático usando um método baseado em grade (CHarges from ELelectrostatic Potential based on Grid)
RF	Campo de reação (Reaction Field)
DM	Dinâmica Molecular
DFT	Teoria do Funcional de Densidade (Density Funtional Theory)
ESP	Potencial Eletrostático (Electrostatic Potential)
FDR	Função de distribuição radial
HF	Hartree –Fock
HSA	Albumina sérica humana (Human Serun Albumin)
MM	Mecânica Molecular
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear magnetic resonance)
PDT	Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy)
PPIX	Protoporfirina IX (Protoporphyrin IX)
RESP	Restrição do potencial eletrostático (Restrained Electrostatic Potential).
RMSD	Desvio da raiz média quadrática (Root mean square deviation)
RMSF	Flutuação da raiz média quadrática (Root mean square fluctuation)
SAS	Superfície acessível ao solvente
SCI	Superfície de contato intermolecular