



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARÍLIA LADEIRA ALVES E COSTA

Uso de métodos DFT e de *docking* molecular para avaliar a quelação
de átomos de Ferro em grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{-2}$

Rio de Janeiro

2026

Marília Ladeira Alves e Costa

Uso de métodos DFT e de *Docking* molecular para avaliar a quelação
de átomos de Ferro em grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{-2}$

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito à obtenção do título de Mestra em
Ciências.

Orientadores: Camilo Henrique da Silva Lima

Talis Uelisson da Silva

Rio de Janeiro

2026

CIP - Catalogação na Publicação

C837u Costa, Marília Ladeira Alves e
Uso de DFT e de docking molecular para a avaliar a quelação de átomos de ferro em grupos [Fe4S4(Cys)4]-2 / Marília Ladeira Alves e Costa. -- Rio de Janeiro, 2026.
81 f.

Orientador: Camilo Henrique da Silva Lima.
Coorientador: Talis Uelisson da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Química, 2026.

1. Docking molecular. 2. DFT. 3. modelagem molecular. 4. Metaloproteínas. I. Lima, Camilo Henrique da Silva, orient. II. Silva, Talis Uelisson da, coorient. III. Título.

Marília Ladeira Alves e Costa

Uso de métodos DFT e de *Docking* molecular para avaliar a quelação de átomos de Ferro em grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{-2}$

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciências.

Aprovada em 2026

Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro

Prof. Dr. Osvaldo Andrade Santos Filho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mônica e Rodrigo, e irmãos, Igor e Lucas, por todo apoio e carinho dados durante esse processo de mudança de estado, profissão e retorno aos meus estudos.

A toda a minha família que sei que está sempre torcendo por mim lá de Prados – MG.

Aos amigos do LABMMOL, Ana Paula, Bárbara, Diego, Keyti e Luciana, que tornaram essa experiência bem mais fácil e agradável.

A professora Magaly Albuquerque por todo apoio e contribuição durante as reuniões de grupo.

Aos meus orientadores Camilo Lima e Talis Silva por toda paciência e ensinamentos.

Aos professores membros da banca Nelilma Romeiro e Osvaldo Filho por disporem de seu tempo para participar da minha defesa de dissertação e pelas contribuições.

A equipe da secretaria da PGQu, por toda a ajuda.

A Capes e Faperj pelas bolsas.

Obrigada!

RESUMO

COSTA, Marília Ladeira Alves e. Uso de métodos DFT e de *docking* molecular para avaliar a quelação de átomos de Ferro em grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{-2}$. Rio de Janeiro, 2026. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026

Este trabalho visa realizar uma análise crítica da capacidade de métodos de *docking* molecular em descrever interações em metaloenzimas contendo clusters $[\text{4Fe-4S}]$. O estudo emprega cálculos de Teoria do Funcional de Densidade (DFT) e simulações de *docking* para investigar sistemas onde a descrição metal-ligante exige consideração explícita de efeitos eletrônicos, frequentemente omitidos por métodos clássicos. A metodologia consistiu inicialmente em cálculos de DFT em modelos de cluster $[\text{4Fe-4S}]$ coordenados a resíduos de cisteína para avaliar a favorabilidade energética da coordenação. Subsequentemente, realizaram-se estudos de *docking* em diferentes sistemas proteicos utilizando os programas AutoDock4, LeDock, AutoDock Bias e *Metalloprotein Bias Docking*, sob esquemas de cargas parciais RESP e AM1-BCC, além de análises de cavidade para avaliar a acessibilidade do sítio. Os resultados demonstram que, embora os algoritmos de busca gerem poses com baixos valores de RMSD em protocolos de *redocking*, as funções de pontuação falham consistentemente em reproduzir geometrias de coordenação. Observou-se o favorecimento de distâncias metal-oxigênio excessivamente curtas e orientações incorretas dos átomos coordenantes, independentemente do viés ou esquema de cargas aplicado. Conclui-se que as principais limitações dos métodos de *docking* clássicos em sistemas metaloproteicos estão intrinsecamente associadas às deficiências das funções de pontuação.

Palavras-chave: *Docking* molecular; Modelagem molecular; DFT; Metaloproteínas; Cluster $[\text{4Fe-4S}]$

ABSTRACT

COSTA, Marília Ladeira Alves e. Uso de métodos DFT e de *docking* molecular para avaliar a quelação de átomos de Ferro em grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{-2}$. Rio de Janeiro, 2026. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026

This work aims to perform a critical analysis of the ability of molecular docking methods to describe electronic interactions in metalloenzymes containing $[\text{4Fe-4S}]$ clusters. The study employs Density Functional Theory (DFT) calculations and docking simulations to investigate systems in which metal–ligand interactions require explicit consideration of electronic effects, which are often neglected by classical methods. The methodology initially involved DFT calculations on $[\text{4Fe-4S}]$ cluster models coordinated by cysteine residues to evaluate the energetic favorability of ligand coordination. Subsequently, docking studies were carried out on different protein systems using AutoDock4, LeDock, AutoDock Bias, and Metalloprotein Bias Docking, under RESP and AM1-BCC partial charge schemes, in addition to cavity analyses to assess site accessibility. The results demonstrate that, although the search algorithms generate poses with low RMSD values in redocking protocols, the scoring functions consistently fail to reproduce realistic coordination geometries. Excessively short metal–oxygen distances and incorrect orientations of coordinating atoms were favored, regardless of the applied bias or charge scheme. It is concluded that the main limitations of classical docking methods in metalloprotein systems are intrinsically associated with deficiencies in the scoring functions.

Keywords: Molecular docking; Molecular modelling; DFT; Cluster $[\text{4Fe-4S}]$; Metalloprotein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura 2D do Ferro-heme (Pubchem 53356674) (esquerda) e representação do grupo heme ligado a uma histidina (PDB: 3D4X) (direita).....	16
Figura 2 - Proteína TtnM, uma proteína ferro dependente não-heme. O átomo de ferro está coordenado a duas histidinas e um aspartato. (PDB: 7N7V)	17
Figura 3 -Tipos de clusters	20
Figura 4 - Esquema do <i>Docking</i> molecular	27
Figura 5 -Esquema do funcionamento do AutoDock Bias.....	29
Figura 6 - : Estruturas bidimensionais dos ligantes estudados.	32
Figura 7 - Estrutura otimizada de $[Fe_4S_4(SCH_2CH_3)_4]^{2-}$ calculada com TPSS/DGDZVP...	36
Figura 8- Estruturas 3D otimizadas dos ligantes calculados por DFT (TPSS/DGDZVP). Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; branca: hidrogênio.....	37
Figura 9 - Estrutura otimizada do complexo Cubo4Cys-6Phe, calculada por DFT (TPSS/DGDZVP). Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.	38
Figura 10 - Estruturas otimizadas dos complexos (a) Cubo3Cys-32P e (b) Cubo3Cys-6Phe calculados por DFT (TPSS/DGDZVP). Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.....	40
Figura 11 - Poses de menor energia de cada ligantes na proteína 2GOY. (Imagens Pymol)...	43
Figura 12- Cavidade em superfície proteína 2GOY calculada pelo servidor CavityPlus. Cubo4Cys em destaque (laranja e amarelo). À esquerda imagem Pymol. À direita, imagem gerada pelo CavityPlus.	43
Figura 13 - Superfície da proteína 2GOY (cinza) e cavidade (ciano) com cubo4cys em destaque. (Imagem Pymol).....	44
Figura 14 - Posição dos ligantes em relação à cavidade da proteína 2GOY. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PP.....	44
Figura 15 - Cavidade proteína 7LHS, à esquerda superfície em ciano (Pymol) e à direita superfície roxa (Imagem gerada pelo CavityPlus).	46
Figura 16 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 7LHS.	47

Figura 17 - Cavidade com ligantes 7LHS. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PPH: palecyan)	47
Figura 18 - Cavidade 9CCB. À esquerda, superfície em ciano e cubo3cys em destaque (Pymol) e à direita cavidade em laranja gerado pelo CavityPlus	48
Figura 19 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 9CCB.....	49
Figura 20 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 7LHS. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PPH: pale ..	50
Figura 21 - Ligante SAM no cristal 4K36.....	51
Figura 22 - Resultado <i>redocking</i> no Autodock 4. Pose de menor energia à esquerda e pose de menor RMSD à direita.....	52
Figura 23 - Resultado <i>Docking</i> aplicando Autodock Bias com variação de energia do poço de -2,0 a -10,0 kcal/mol. Poses de menor valor de energia de cada cluster. Onde -2,0 vermelho; -3,0 verde; -4,0 azul; -5,0 amarelo; -6,0 magenta; -7,0 ciano; -8,0 laranja; -9,0	53
Figura 24 - Resultado do <i>Redocking</i> do ligante SAM na proteína 4K36 no programa LeDock.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas e dimensões da caixa e número de corridas realizadas no estudo de <i>docking</i> para cada proteína.	34
Tabela 2 - Valores de energia de ligação dos complexos Ligante-cubo (4Cys e 3Cys) e menor valor de ligação Fe-L.	39
Tabela 3 - Ângulos S-Fe-S no cubo na ausência e presença dos melhores ligantes nos complexos Cubo3Cys-ligante.	41
Tabela 4 - Resultado energia <i>docking</i> proteína 2GOY com os ligantes. Foram realizadas 100 corridas.	42
Tabela 5 - Resultados do <i>docking</i> da proteína 7LHS com os ligantes. Foram realizadas 100 corridas.	46
Tabela 6 - <i>Docking</i> proteína 9CCB e os ligantes. Foram realizadas 100 corridas	49
Tabela 7 - Resultados do <i>docking</i> do ligante SAM na proteína 4K36 aplicando o AutoDock Bias com diferentes energias de viés (poço), raio 1,2 Å, dois pontos de viés tratados como doadores de elétrons.	53

LISTA DE ABREVIACOES

- 1Nap – 1-naphthamide
- 2Nap – 2-naphthamide
- 32P – 1-methyl-3-hydroxyperidine-2-one
- 34P – 3-hydroxy-1-methyl-4(1H)-pyridinone
- 6Phe – 6-Phenyl-2-pyridone
- 8HQ - 8-hydroxyquinoline
- Acri – Acridin-4-ol
- AHA – Acetonic acid
- CAT - Catecol
- Cys - Cisteína (do inglê: *cysteine*)
- DFT- Teoria do funcional da densidade (do inglê: *Density Functional Theory*)
- DHP – o,o'-Diphenol
- HXA – N-methylacetohydroxamic acid
- HHTP – 2,3,6,7,10,11 – hexahydroxytriphenylene
- MGL - Magnolol
- MBD – *Metall Bias Docking*
- PPH – 2-(Pyridin-2-yl)phenol

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 METALOPROTEÍNAS	13
1.1.1 Importância das metaloproteínas	13
1.1.2 Classificação de metaloproteínas	14
1.1.3 Metaloproteínas Ferro-dependentes	15
1.2 CLUSTERS FERRO-ENXOFRE (FE-S).....	18
1.2.1 Tipos de cluster ferro-enxofre	19
1.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO ESTUDO DE METALOPROTEÍNAS.....	21
1.3.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)	22
1.3.2 Docking Molecular	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 METODOLOGIA	32
3.1 OBTENÇÃO DOS LIGANTES E PROTEÍNAS ALVO	32
3.2 CÁLCULOS DE DFT	33
3.3 PROTOCOLO DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR E MAPEAMENTO DE CAVIDADES..	33
3.3.1 Mapeamento e acessibilidade do Sítio	33
3.3.2 Preparação e Esquema de Cargas	33
3.3.3 Algoritmos e potenciais de viés	34
3.3.4 Critérios de Seleção e Análise de Desempenho	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 CÁLCULOS DE DFT	36
4.2 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	41
4.2.1 Proteína 2GOY	41
4.2.2 Proteína 7LHS	45
4.2.3 Proteína 9CCB	48
4.2.4 Proteína 4K36	51
5 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	71
APÊNDICE A - Estruturas bidimensionais dos ligantes estudadas com o código correspondente do PubChem e a massa molar.	71

APÊNDICE B – Estruturas otimizadas dos complexos Cubo4Cys-L calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil-éter. Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.....	74
APÊNDICE C – Energias calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil éter dos ligantes puros, cluster com 4 cisteínas e complexos com os ligantes. Onde “cubo” = $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2-}$ e “Cys” = $(\text{SCH}_2\text{CH}_3)$	78
APÊNDICE D – Energias calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil éter para o Cubo3Cys e os complexos do Cubo3Cys com os ligantes estudados.....	79
APÊNDICE E - Estruturas otimizadas dos complexos Cubo3Cys-L calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil-éter. Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 METALOPROTEÍNAS

1.1.1 Importância das metaloproteínas

Metaloproteínas são proteínas que contêm um ou mais íons metálicos como componente integral em sua estrutura e função. Esses cofatores metálicos são essenciais para a atividade biológica dessas proteínas, ativando funções que não podem ser atingidas pela proteína ou metal isolados (Koebke *et al.*, 2022). Aproximadamente um terço das proteínas em organismos vivos são metaloproteínas e cerca de 40% das enzimas necessitam de um metal para sua função biológica, portanto são fundamentais para a vida (Ibrahim, 2024).

Essas macromoléculas perpassam todos os campos da biologia, participando de processos celulares importantes como produção de energia, transformação metabólica, transdução de sinais, regulação gênica e resposta imunológica (Anzellotti; Farrell, 2008; Dixit; Kulharia; Verma, 2023; Iman Hassan Ibrahim, 2024). Dentre os 20 elementos essenciais para a vida, 10 deles são metais, sendo eles: cálcio (Ca), sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), cobalto (Co), manganês (Mn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) (Holm; Kennepohl; Solomon, 1996; Jomova *et al.*, 2022; Kretsinger; Uversky; Permyakov, 2013).

Reações de oxirredução catalisadas por metaloproteínas desempenham papéis essenciais em processos biológicos fundamentais, sobretudo na fotossíntese e na respiração, que sustentam a vida na Terra. (Iman Hassan Ibrahim, 2024). A capacidade dos íons metálicos de alternar entre diferentes estados de oxidação permite a transferência de elétrons em processos de oxirredução biológicos. Além da catálise, metaloproteínas também atuam no armazenamento e transporte de oxigênio, na estabilização estrutural de proteínas e ácidos nucleicos e na regulação de expressão gênica (Jomova *et al.*, 2022; Kretsinger; Uversky; Permyakov, 2013).

O estudo de metaloproteínas e a compreensão das interações metal-proteína são cruciais para elucidar as bases moleculares da saúde e da doença, uma vez que a desregulação das metaloproteínas está implicada em processos neurodegenerativos, neoplásicos, inflamatórios e infecciosos, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Iman Hassan Ibrahim, 2024), (Dixit; Kulharia; Verma, 2023).

O campo de pesquisa de metaloproteínas abrange múltiplas disciplinas, incluindo biologia estrutural, química bioinorgânica, biologia computacional e engenharia de proteínas. Avanços recentes em cristalografia de raios X, espectroscopia de RMN, espectroscopia de massas e métodos computacionais expandiram de forma significativa o conhecimento sobre a

estrutura e a função de metaloproteínas (Andreini; Rosato, 2022). Além disso, o surgimento do design *de novo* (criação de sequências de aminoácidos para gerar estruturas e funções do zero, em vez de modificação de proteínas) de metaloproteínas abriu novas perspectivas para a criação de proteínas artificiais inéditas com capacidades catalíticas e de transferência eletrônica (Chalkley; Mann; DeGrado, 2021; Klein; Zeymer, 2021).

1.1.2 Classificação de metaloproteínas

Há diversas formas de classificar as metaloproteínas, incluindo a classificação funcional, a baseada em motivos estruturais e a de acordo com o tipo de metal presente. Cada abordagem enfatiza aspectos distintos da relação entre estrutura e função dessas proteínas (Farhan; Khuder, 2025).

A classe funcional agrupa as metaloproteínas de acordo com o papel biológico desempenhado pelo metal, como catálise enzimática, transporte e armazenamento de moléculas, estabilização estrutural ou regulação de processos celulares. O metal pode atuar tanto no mecanismo catalítico de forma direta, como exercer funções estruturais e regulatórias, como observado em metaloproteases, oxidoredutases e fatores de transcrição dependentes de metal.

Outra forma amplamente utilizada para classificar metaloproteínas baseia-se em seus motivos estruturais que coordenam o íon metálico. Essa abordagem considera a geometria de coordenação, o número e o tipo de resíduos ligantes, bem como a organização tridimensional do ambiente metálico. Exemplos incluem proteínas heme, centros ferro-enxofre, proteínas de cobre do tipo “*blue copper*” e metaloproteínas não-heme, nas quais o metal é coordenado por resíduos como histidina, aspartato ou glutamato (Dehabadi; Irani; Ryde, 2025; Iman Hassan Ibrahim, 2024).

A classificação das metaloproteínas de acordo com o tipo de metal presente destaca-se por sua relevância química e bioinorgânica, uma vez que as propriedades eletrônicas e de coordenação do metal influenciam diretamente a estrutura, a reatividade e a função da proteína. Metais como ferro, zinco, cobre, manganês e molibdênio desempenham papéis distintos em sistemas biológicos, atuando como cofatores catalíticos, estruturais ou regulatórios. Entre esses, o ferro apresenta especial importância devido à sua versatilidade química e à ampla diversidade de metaloproteínas ferro-dependentes encontradas em organismos vivos. (Iman Hassan Ibrahim, 2024)

1.1.3 Metaloproteínas Ferro-dependentes

O Ferro é fundamental para uma variedade de funções biológicas (Quadro 1). Devido a sua configuração eletrônica ($[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$), capacidade de transição entre estados de oxidação e sua propriedade ferromagnética, esse metal atua como um componente essencial em sítios ativos de diversas enzimas, atuando eficazmente em processos de oxirredução, transferência de elétrons e catálise enzimática (Kretsinger; Uversky; Permyakov, 2013). Em contrapartida, tais propriedades também o tornam tóxico em certas circunstâncias de desequilíbrio homeostático (Kretsinger; Uversky; Permyakov, 2013).

Quadro 1 - Exemplos de contextos biológicos onde o Ferro está presente e seus diferentes estados de oxidação.

Estados de oxidação relevantes biologicamente		
Estados de Oxidação	Papel biológico	Exemplo
+2 (Fe^{2+})	Doador de elétrons	Citocromos, hemoglobina, ferredoxinas
		Cluster $[\text{4Fe-4S}]$ ferroso em proteínas nitrogenases
+3 (Fe^{3+})	Aceptor de elétrons	Ferritina, transferrina e citocromos
	Trasferências de elétrons, catálise e sensoriamento em sistemas biológico	Estado oxidado dos clusters $[\text{4Fe-4S}]$ nas proteínas Fe-S de alto potencial (HiPIPs)
+4 (Fe^{4+})	Intermediário enzimático	Citocromo P450, cloroperoxidase
		Ascorbato peroxidase (Fe^{4+} -OH)
	Reações oxidativas	Intermediários Fe(IV)=O não-heme em oxigenases dependentes de α -cetoglutarato
	Doador de elétrons durante fixação de nitrogênio	Cluster $[\text{4Fe-4S}]$ em nitrogenases Fe-dependentes
+5 (Fe^{5+})	Controle da reatividade do complexo	Complexos mononucleares de Ferro(V) nitreto não-heme

Fonte: Kretsinger; Uversky; Permyakov, 2013

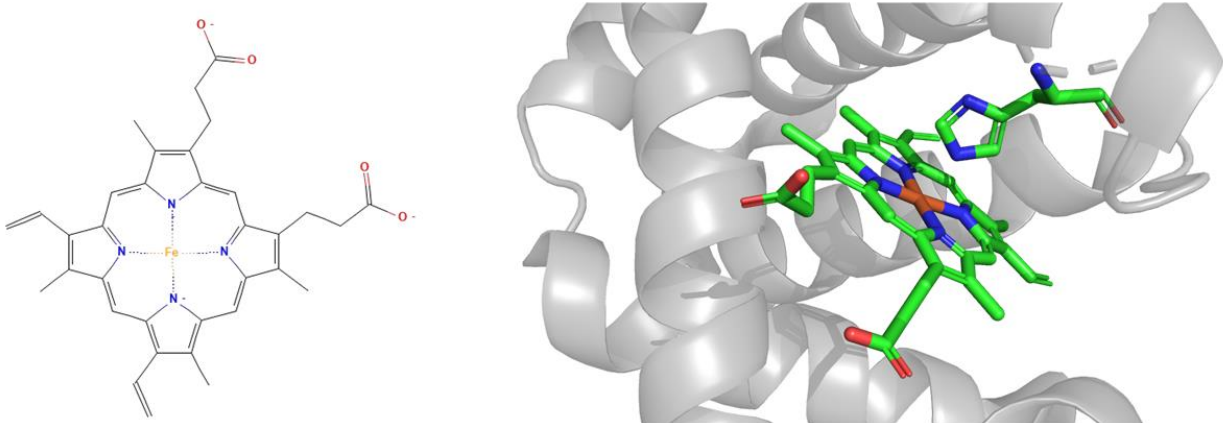
Do ponto de vista estrutural e funcional, as metaloproteínas ferro-dependentes são geralmente classificadas de acordo com a forma química sob a qual o ferro está incorporado à proteína. De maneira geral, essas proteínas podem ser classificadas de três formas: (i) ferro-heme, nas quais o metal está coordenado a um grupo porfirínico; (ii) ferro não-heme, em que o ferro se encontra diretamente coordenado a resíduos da cadeia polipeptídica; e (iii) proteínas que contêm clusters ferro-enxofre (Fe-S), caracterizadas por centros metálicos polinucleares formados por ferro e enxofre inorgânico (Uversky; Ferreira, 2025). Essa classificação é amplamente utilizada em bioquímica e química bioinorgânica, pois reflete diferenças fundamentais na estrutura eletrônica do metal, no ambiente de coordenação e,

consequentemente, nas funções biológicas desempenhadas por essas proteínas (Shi *et al.*, 2021).

1.1.3.1 Metaloproteínas ferro-heme

As metaloproteínas ferro-heme constituem uma das classes mais estudadas de metaloproteínas ferro-dependentes. Nessas proteínas, o ferro encontra-se coordenado a um grupo heme, que é um macrociclo porfirínico que fornece quatro átomos de nitrogênio para a coordenação do metal (Figura 1). Tipicamente, o ferro apresenta coordenação octaédrica, sendo os dois sítios axiais ocupados por resíduos de aminoácidos da proteína, normalmente histidina, metionina ou cisteínas, ou por ligantes exógenos, como oxigênio molecular, monóxido de carbono ou óxido nítrico (Iman Hassan Ibrahim, 2024)

Figura 1 - Estrutura 2D do Ferro-heme (Pubchem 53356674) (esquerda) e representação do grupo heme ligado a uma histidina (PDB: 3D4X) (direita)



Fonte: Autoria própria.

As propriedades eletrônicas do grupo heme permitem ao ferro alternar entre estados de oxidação, principalmente Fe^{2+} e Fe^{3+} , o que torna essas proteínas altamente eficientes em processos de transferência eletrônica e reações de oxirredução. Como consequência, proteínas ferro-heme desempenham papéis centrais em processos biológicos fundamentais, como o transporte e armazenamento de oxigênio, a respiração celular e a catálise de reações oxidativas. Exemplos clássicos incluem a hemoglobina e a mioglobina, responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio, respectivamente, bem como os citocromos, que atuam na cadeia respiratória e em diversos processos metabólicos (Kassa *et al.*, 2016; Mollan; Alayash, 2013).

Além disso, muitas enzimas ferro-heme estão envolvidas na ativação de pequenas moléculas e na catálise de reações quimicamente desafiadoras. O citocromo P450 (Cyp450), por exemplo, catalisa reações de hidroxilação e oxidação de substratos orgânicos,

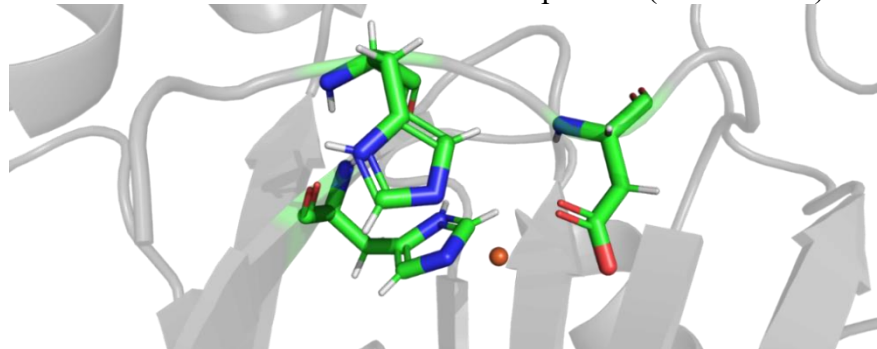
desempenhando um papel essencial no metabolismo de fármacos e xenobióticos (Buelow *et al.*, 2025). A versatilidade funcional das metaloproteínas ferro-heme está diretamente relacionada à capacidade do grupo heme de modular a reatividade e prevenir processos oxidativos não desejados (Bowman; Bren, 2008).

1.1.3.2 Metaloproteínas ferro não-heme

As metaloproteínas ferro não-heme diferenciam-se das proteínas ferro-heme pela ausência do grupo porfirínico, sendo o metal diretamente coordenado a resíduos da cadeia polipeptídica (Figura 2). Os ligantes mais comuns incluem resíduos de histidina, aspartato, glutamato e, em alguns casos, cisteínas ou tirosina. Esses resíduos conferem uma grande diversidade de geometrias de coordenação ao metal, como octaédrica, tetraédrica ou trigonal bipiramidal, dependendo do número e da disposição dos ligantes (Iman Hassan Ibrahim, 2024)

Uma característica marcante das proteínas ferro não-heme é a ampla variedade de estados de oxidação e estados de spin acessíveis ao ferro, o que resulta em uma notável diversidade funcional. Essas proteínas estão envolvidas em processos como reações de oxigenação, hidroxilação, clivagem de ligações químicas e sensoriamento celular. Muitas oxigenases e dioxigenases ferro não-heme catalisam reações fundamentais no metabolismo de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos, frequentemente utilizando oxigênio molecular como reagente (Jasniewski; Que, 2018; Kal; Xu; Que, 2020).

Figura 2 - Proteína TtnM, uma proteína ferro dependente não-heme. O átomo de ferro está coordenado a duas histidinas e um aspartato. (PDB: 7N7V)



Fonte: Autoria própria.

Entre as enzimas ferro não-heme, destacam-se as oxigenases dependentes de α -cetoglutarato, que utilizam Fe^{2+} como cofator catalítico e geram intermediários altamente reativos, como espécies ferrila (Fe(IV)=O), capazes de promover reações de hidroxilação

altamente seletivas. A reatividade dessas espécies intermediárias é cuidadosamente controlada pelo ambiente proteico, que estabiliza estados eletrônicos específicos e direciona a reação para o substrato correto. Dessa forma, as metaloproteínas ferro não-heme exemplificam como a coordenação direta do metal pela proteína permite modular finamente sua reatividade química (Guengerich, 2015; Voss; Honda Malca; Buller, 2020).

1.1.3.3 Metaloproteínas contendo cluster ferro-enxofre (Fe-S)

As proteínas que contêm clusters ferro-enxofre (Fe-S) constituem uma classe distinta e altamente relevante de metaloproteínas ferro-dependentes. Esses sistemas são caracterizados por centros metálicos polinucleares formados por átomos de ferro e enxofre inorgânico, geralmente coordenados a resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica. A organização estrutural desses clusters confere propriedades eletrônicas singulares, permitindo que os átomos de ferro alternem entre diferentes estados de oxidação, principalmente Fe^{2+} e Fe^{3+} (Carvalho; Swart, 2014).

Em sistemas biológicos, os clusters Fe-S desempenham funções essenciais, atuando principalmente em processos de transferência de elétrons, mas também exercendo papéis catalíticos, estruturais e regulatórios. Esses centros metálicos estão amplamente distribuídos em vias metabólicas fundamentais como respiração celular, fotossíntese, fixação de nitrogênio e metabolismo do enxofre, estando também presentes em enzimas envolvidas em reações bioquímicas complexas (Beinert; Holm; Münck, 1997).

Os tipos mais comuns de clusters Fe-S encontrados em proteínas incluem [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S], cujas diferenças estruturais influenciam diretamente suas propriedades redox e funções biológicas (Vallières *et al.*, 2024). Mais detalhes sobre os clusters serão discutidos na seção seguinte (1.2).

1.2 CLUSTER FERRO-ENSOFRE (FE-S)

Os clusters ferro-enxofre (Fe-S) estão entre os cofatores metálicos mais antigos e amplamente distribuídos em sistemas biológicos, sendo encontrados em organismos de todos os domínios da vida. Esses centros metálicos desempenham funções fundamentais em processos celulares essenciais, atuando principalmente na transferência eletrônica, mas também em funções catalíticas, estruturais e regulatórias. A ampla diversidade funcional dos clusters Fe-S está diretamente relacionada às suas propriedades eletrônicas, que permitem a alternância

entre diferentes estados de oxidação do ferro e o acoplamento eletrônico entre os átomos metálicos do cluster (Egozi; Ast, 2025).

Do ponto de vista químico, os clusters Fe-S apresentam uma complexa estrutura eletrônica, caracterizada pela presença de múltiplos centros metálicos, forte acoplamento entre elétrons desemparelhados e uma elevada sensibilidade ao ambiente de coordenação. Essas características conferem a esses sistemas uma grande versatilidade redox, mas também tornam sua descrição experimental e teórica particularmente desafiadora. Pequenas variações no ambiente proteico, como mudança nos resíduos coordenados ao cluster ou no estado de protonação, podem influenciar significativamente as propriedades eletrônicas e a reatividade desses clusters (SantaMaria; Rouault, 2024; Vallières *et al.*, 2024).

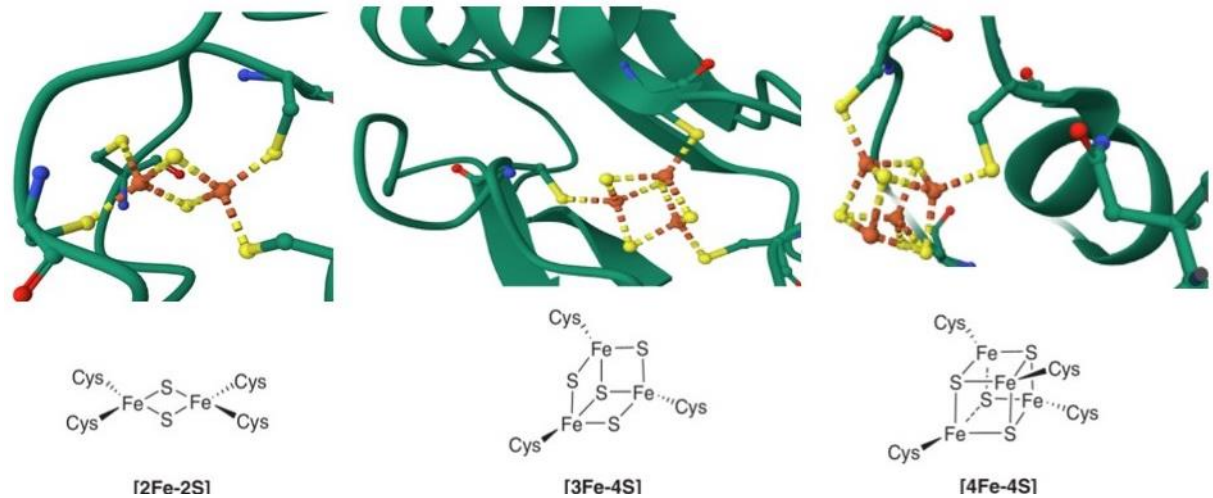
Devido à sua relevância biológica e à complexidade de seus centros metálicos, os clusters ferro-enxofre têm sido extensivamente investigados por abordagens experimentais e computacionais (Jafari; Ryde; Irani, 2023; Kim; Sridharan; Suess, 2022). Em particular, os clusters [4Fe-4S] destacam-se por sua elevada ocorrência em enzimas envolvidas em processos redox e reações catalíticas complexas (Shi *et al.*, 2021). Nesse contexto, o estudo detalhado das propriedades estruturais e eletrônicas desses clusters é fundamental para a compreensão de seus mecanismos de ação.

1.2.1 Tipos de cluster ferro-enxofre

Os clusters ferro-enxofre presentes em sistemas biológicos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de ferro e enxofre que compõem o centro metálico. Entre os tipos mais comuns encontram-se [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S] (Figura 3), os quais diferem não apenas em sua composição estrutural, mas também em suas propriedades eletrônicas, potenciais redox e funções biológicas. Essas variações estruturais refletem a capacidade dos clusters Fe-S desempenharem diferentes funções em processos celulares, adaptando-se às necessidades específicas de cada sistema biológico (Petroněk; Spitz; Allen, 2021).

Os clusters [2Fe-2S] são formados por dois átomos de ferro e dois de enxofre inorgânico, geralmente coordenados por resíduos de cisteínas ou, em alguns casos, por uma combinação de cisteína e histidina. Esses clusters estão frequentemente associados a proteínas envolvidas em processos de transferência eletrônica de curto alcance e em sistemas regulatórios sensíveis ao estado redox celular. Exemplos clássicos incluem ferredoxinas e proteínas reguladoras do metabolismo do ferro, nas quais os clusters atuam como sensores redox (Want *et al.*, 2026).

Figura 3 -Tipos de clusteres.



Fonte: Adaptado de Fontecave, 2006.

Os clusteres [3Fe-4S] são estruturalmente relacionados aos clusteres [4Fe-4S], podendo ser considerados, em muitos casos, como derivados destes após perder um átomo de ferro. Esses clusteres são comumente encontrados em enzimas que participam de cadeias de transferência eletrônica e podem desempenhar funções intermediárias entre estados redox distintos. A presença de clusteres [3Fe-4S] está frequentemente associada a condições de estresse oxidativo ou a processo de regulação funcional, nos quais a conversão reversível entre diferentes tipos de clusteres podem ocorrer (Brown; Suess, 2023).

Os clusteres [4Fe-4S] representam uma das classes mais abundantes e funcionalmente versáteis de clusteres ferro-enxofre em sistemas biológicos. Estruturalmente, esses clusteres apresentam geometria aproximadamente cúbica, na qual quatro átomos de ferro e quatro de enxofre inorgânico ocupam os vértices de um cubo distorcido, sendo geralmente coordenados à proteína por quatro resíduos de cisteína, porém também há casos de ter apenas três cisteínas coordenadas ao cluster. A elevada versatilidade redox desses clusteres, associada à possibilidade de acesso a múltiplos estados de oxidação torna-os particularmente adequados para processos de transferência de elétrons e catálise enzimática (Noodleman, 2018).

Além de sua função clássica em sistemas de transporte eletrônico, os clusteres [4Fe-4S] participam diretamente de mecanismos catalíticos em diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na geração de espécies radicais e na ativação de pequenas moléculas. Essa combinação de abundância biológica, versatilidade funcional e complexidade eletrônica faz com os clusteres [4Fe-4S] sejam alvos para estudos estruturais, espectroscópicos e

computacionais, justificando o foco dado a esses sistemas ao longo deste trabalho. Outra particularidade dos clusters [4Fe-4S] é que, a partir de estudos teóricos e espectroscópicos, foi mostrado que os átomos de ferro presentes possuem um acoplamento antiferromagnético, na qual a carga líquida dos átomos de ferro é de +2,5, ao invés da carga tradicional de +2 ou +3, gerando uma multiplicidade de spin total do tipo singlete (Da Silva *et al.*, 2022).

Enzimas contendo grupos [4Fe-4S] podem ser inibidas por meio de reações envolvendo esses clusters. Radicais livres capazes de converter o grupo [4Fe-4S] em [3Fe-4S] + Fe²⁺ livre são os mais comuns (Vernis *et al.*, 2017), porém, agentes quelantes também já foram avaliados como potenciais inibidores (Da Silva *et al.*, 2023; D'Hardemare *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2014, 2015; U. Silva *et al.*, 2025).

Devido à complexidade estrutural e eletrônica dos clusters Fe-S, estudos experimentais envolvendo essas espécies são desafiadores (Waser; Ward, 2023). Dessa forma, o uso de métodos de cálculo de estrutura eletrônica baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) torna-se indispensável para capturar as nuances quânticas desses sistemas, superando as limitações das abordagens clássicas em descrever a reatividade e a coordenação metálica (Jafari; Ryde; Irani, 2023).

1.3 MÉTODOS COMPUTACIONAIS NO ESTUDO DE METALOPROTEÍNAS

Métodos computacionais são muito utilizados para compreender o complexo mundo das metaloproteínas. A habilidade de descrever eventos a nível micro (atômico) auxilia a entender eventos do mundo macro (experimental). Tratando-se de estudos de proteínas, há a possibilidade de compreender a reatividade do metal, assim como também como o metal reage com o ambiente proteico (Stiebritz; Hu, 2019).

Metaloproteínas apresentam um desafio para os estudos computacionais que os distinguem das moléculas puramente orgânicas. Centros metálicos possuem uma complexa estrutura eletrônica com múltiplos estados de oxidação, estados de spin e geometria de coordenação. Os orbitais d em metais de transição (*e.g.* ferro, cobalto, molibdênio) participam de ligações e catálises de maneiras que são necessários tratamentos de modelagem molecular específica. De forma geral, interações metal-ligante envolvem transferência de cargas, polarização de caráter covalente, que campos de forças geralmente não conseguem descrever de forma adequada, uma vez que são parametrizadas para compostos não metálicos (Andreini; Rosato, 2022; Tzeliou; Mermigki; Tzeli, 2022).

Os métodos teóricos utilizados em estudos computacionais podem ser classificados como clássicos, métodos baseados na mecânica molecular (MM), *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular (MD); e métodos quânticos (QM), como a teoria de Hartree-Fock (HF), métodos semi-empíricos (SM), e métodos *ab initio* (como métodos perturbativos) e métodos baseados na densidade eletrônica, como a teoria do funcional da densidade (DFT) (Grimme; Schreiner, 2018). Os métodos de *docking* e DFT, que foram utilizados neste trabalho, serão discutidos a seguir.

1.3.1 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

A mecânica quântica descreve o comportamento dos elétrons e dos núcleos atômicos em quaisquer condições. A equação de Schrödinger (Equação 1) é a equação fundamental nesses cálculos. Para sistemas hidrogenoides (um único elétron), a equação de Schrödinger possui solução exata. Porém, para sistemas multieletrônicos, as interações entre os elétrons levam ao chamado problema de muitos corpos (Makkar; Ghosh, 2021).

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{Equação 1}$$

Onde \hat{H} é o operador Hamiltoniano, Ψ é a equação de onda e E é a energia do sistema. O operador Hamiltoniano considera as energias cinética e potencial devido à interação coulombiana entre elétrons e núcleos. Para resolver essa equação para sistemas com mais de um elétron, demandaria um custo computacional muito grande, portanto foram desenvolvidas muitas aproximações, sendo a muito conhecida Aproximação de Born-Oppenheimer, baseado no fato de que os elétrons se movem em torno de núcleos estáticos (Harun *et al.*, 2020).

A mecânica quântica se baseia em utilizar a equação de Schrödinger para buscar a função de onda mais estável para o sistema em estudo a partir de uma função de onda inicial. Dentre esses métodos, a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) se destaca por ser capaz de fornecer resultados precisos a um baixo custo computacional (Makkar; Ghosh, 2021).

A Teoria do Funcional de Densidade foi resultado dos trabalhos de Kohn, Sham e Hohenberg na década de 60 (Hohenberg; Kohn, 1964; Kohn; Sham, 1965). O fundamento da DFT é resolver a equação de Schrödinger (Equação 1) sem utilizar diretamente a função de onda eletrônica de N elétrons $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$, e sim utilizando a densidade eletrônica $\rho(r)$, a qual apresenta três dimensões espaciais independente da quantidade de elétrons (Equação 2).

$$\rho(r) = \langle \Psi | \hat{\rho}(r) | \Psi \rangle \quad \text{Equação 2}$$

No trabalho de 1964, Hohenberg e Kohn desenvolveram dois teoremas para sistemas de N elétrons: i) O Hamiltoniano (\hat{H}) é o somatório de três variáveis, sendo elas o potencial externo \hat{U} , a energia cinética \hat{T} e a repulsão elétron-elétron \hat{V}_e (Equação 3), e $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$ é a solução do estado fundamental desse hamiltoniano (Equação 4). Para um estado fundamental não degenerado e um potencial externo $v(r)$, a energia total E_0 do sistema será dada pela Equação 5; ii) A energia total da função aproximada $\tilde{\rho}(r)$, com $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ e $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$, sempre será maior ou igual à energia total da função real $\rho(r)$ (Equação 6), obtendo-se, então, um funcional universal $F[\rho]$ (Equação 7). A energia aproximada do sistema será obtida a partir de $\tilde{\rho}(r)$ e de $F[\tilde{\rho}]$, até que essa energia se iguale à energia real do sistema (Equação 8) (Duarte, 2001).

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}_e + \hat{U} \quad \text{Equação 3}$$

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) \quad \text{Equação 4}$$

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r)v(r)dr \quad \text{Equação 5}$$

$$E_v[\tilde{\rho}(r)] \geq [E_v[\rho(r)]] \quad \text{Equação 6}$$

$$F[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad \text{Equação 7}$$

$$E_0 = E_v[\rho] = F[\rho] + \int \rho(r)v(r)dr \leq E_v[\tilde{\rho}] = F[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(r)v(r)dr \quad \text{Equação 8}$$

Kohn e Sham, em 1965 (Kohn; Sham, 1965), desenvolveram uma série de equações que permitem calcular as propriedades do estado fundamental. A nova equação de energia evidenciava a repulsão elétron-elétron de Coulomb (Equação 9) e continha um novo funcional universal ($G[\rho]$) (Equação 10), sendo esse novo funcional a soma da energia cinética de elétrons não-interagentes ($T_s[\rho]$) e interações elétron-elétron de troca e correlação $E_{XC}[\rho]$. A energia cinética $T_s[\rho]$ é calculada a partir dos orbitais de Kohn-Sham iniciais Ψ_i^{KS} (Equação 11), que são auto-funções do hamiltoniano de Kohn-Sham efetivo de um elétron H_{KS} (Equação 12), para um potencial efetivo $v_{\text{eff}}(r)$ (Equação 13) e a $\rho(r)$ do sistema (Equação 14). Os orbitais de Kohn-Sham serão obtidos pela resolução da equação de Schrödinger para um elétron (Equação 15) e a energia total do sistema (E) será obtida pela Equação 16. Dessa maneira, o modelo de Kohn-Sham fornece uma solução do problema da densidade eletrônica $\rho(r)$ de um sistema de elétrons que interagem a partir de um problema de elétrons que não interagem (Duarte, 2001).

Para se obter a função de onda e a energia do estado fundamental do sistema, são implementados algoritmos para operarem a resolução das equações de Kohn-Sham por um

método de cálculo em ciclo (*self-consistent field*, SCF) até se obter a função de onda e a energia do estado fundamental.

$$E\nu[\rho] = G[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' + \int \rho(r)v(r)dr \quad \text{Equação 9}$$

$$G(\rho) = T_s[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad \text{Equação 10}$$

$$T_s[\rho] = \sum_i^N \langle \Psi_i^{KS} | -1/2\nabla_i^2 | \Psi_i^{KS} \rangle \quad \text{Equação 11}$$

$$H_{KS}[\rho] = -1/2\nabla_i^2 + v_{\text{eff}}(r) \quad \text{Equação 12}$$

$$v_{\text{eff}}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{XC}(r) \quad \text{Equação 13}$$

$$\rho(r) = |\sum_i^N \Psi_i(r)|^2 \quad \text{Equação 14}$$

$$(1/2\nabla_i^2 + v_{\text{eff}}) \Psi_i^{KS} = \epsilon_i \Psi_i^{KS} \quad \text{Equação 15}$$

$$E = \sum_{\epsilon_i} -\frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1-r_2|} dr_1 dr_2 + E_{XC}[\rho] - \int \rho(r)v_{XC}(r)dr \quad \text{Equação 16}$$

A DFT distingue-se de abordagens baseadas em mecânica clássica e de métodos semiempíricos por tratar explicitamente a estrutura eletrônica de todo o sistema multieletrônico. As propriedades do sistema são descritas a partir da densidade eletrônica, a qual contém as informações fundamentais associadas à função de onda antissimétrica de um sistema composto por N elétrons. A DFT permite a descrição de sistemas complexos com muitos elétrons sem a necessidade de ajustes empíricos nos parâmetros, sendo, portanto, classificada como uma abordagem *ab initio* que exige um baixo custo computacional. É por essas características que a DFT é muito adequada para o estudo da estrutura eletrônica de sistemas química complexos, incluindo os que envolvem metais de transição (Cohen; Mori-Sánchez; Yang, 2012).

Na DFT, a forma exata do termo de troca e correlação não é conhecida, e todas as contribuições que não podem ser explicitamente expressas são coletivamente incorporadas em um único termo, o funcional de troca-correlação ($E_{XC}[\rho]$), para o qual diversas aproximações têm sido propostas (Stiebritz; Hu, 2019). Essas aproximações, chamadas de funcionais, podem ser divididas em três grupos, que se diferenciam pela forma como a densidade eletrônica é incorporada matematicamente na expressão. Os grupos são:

1. LDA (*local density approximation*), aproximação da densidade local, que dependem apenas da densidade local.
2. GGA (*generalized gradient approximation*), aproximação do gradiente generalizado, onde os funcionais dependem da densidade local e da derivada espacial (gradiente) da densidade.
3. Meta-GGA, onde os funcionais também incluem a segunda derivada (Laplaciano) da densidade e/ou a densidade de energia cinética.

De forma geral, a precisão dos funcionais LDA, como o S-VWN (Vosko; Wilk; Nusair, 1980) são insuficientes para estudos de reatividade de sistemas químicos. Os funcionais GGA, como o BLYP (Becke, 1988), são mais precisos e muito utilizados na modelagem de sistemas biológicos (Casalino et al., 2016, 2020). Os funcionais meta-GGA, como o TPSS (Tao *et al.*, 2003) também são muito utilizados para sistemas biológicos (Stiebritz; Hu, 2019) que contêm metais de transição, incluindo trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Da Silva *et al.*, 2022) e neste trabalho.

Em cálculos de DFT, além da escolha do funcional, também é necessário definir o conjunto de função de bases a ser utilizado. Os conjuntos de bases são empregados para descrever os orbitais atômicos e, para a maioria dos problemas químicos, a precisão na região dos orbitais de valência dos átomos, é a mais importante, portanto, esses orbitais são descritos por várias funções de bases (Stiebritz; Hu, 2019). A precisão de um cálculo depende do número de funções de bases utilizadas, as quais são categorizadas pelo número que indica quantas funções independentes existem para cada orbital de valência ocupado. Assim, tem-se as funções *double-zeta* como em DGDZVP (*DGauss Double-Zeta Valence Polarized*) (Godbout *et al.*, 1992; Sosa *et al.*, 1992) que utilizam duas funções por orbital, *triple-zeta* como em DGTZVP (*DGauss Triple-Zeta Valence Polarized*) (Godbout et al., 1992; Sosa *et al.*, 1992), que utiliza três funções por orbital, *quadruple-zeta*, que utilizam quatro funções e assim sucessivamente (Bursch *et al.*, 2022). A escolha do tamanho do conjunto de bases depende do objetivo do estudo (Quadro 2). Conjuntos de bases do tipo *double-zeta* apresentam bom desempenho para otimizações de geometria e cálculos de frequências com baixo custo computacional, o que justifica a escolha desse tipo de base na realização dos cálculos deste trabalho.

Quadro 2 - Exemplificação de como são utilizados os níveis de bases.

Nível de Base	Melhor uso	Limitações principais
<i>Double-zeta (DZ)</i>	Otimização de geometria, frequências e triagem inicial	Inadequado para energias finais
<i>Triple-zeta (TZ)</i>	Energias de reação, conformações e estudos mecanísticos padrão	Pode não convergir totalmente para funcionais muito complexos
<i>Quadruple-zeta (QZ)</i>	Estudos de transição difíceis e funcionais duplo-híbridos	Custo computacional muito elevado para sistemas grandes

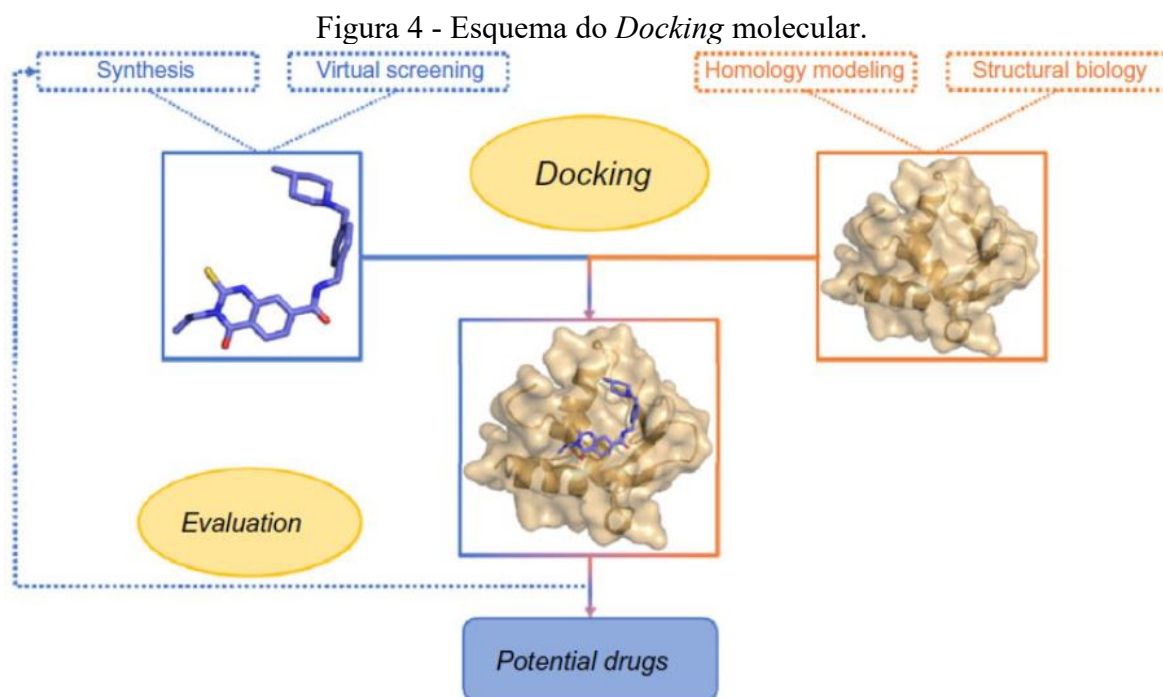
Fonte: Stiebritz; Hu, 2019.

Apesar da DFT conseguir descrever sistemas multieletrônicos (cerca de até 200 elétrons, dependendo do pacote computacional), quando se trata de macromoléculas, como proteínas, torna-se computacionalmente inviável a utilização desse método, uma vez que ela é feita em cima da função da densidade do sistema. Portanto, para estudos de macromoléculas, faz-se necessário o uso de métodos de cálculo baseados na mecânica clássica.

1.3.2 *Docking* Molecular

O *docking* molecular é uma técnica baseada em mecânica clássica. Essa ferramenta fornece um entendimento, mesmo que limitado, da interação ligante-proteína e fornece também estimativas para a energia relacionada ao complexo ligante-proteína formado (Agu *et al.*, 2023). A aplicação mais recorrente de *docking* molecular é no desenvolvimento de fármacos (Figura 4), uma vez que há a possibilidade de testagem de milhares de possíveis fármacos com o alvo a um baixo custo operacional e curto tempo, quando se comparado com síntese e testes de bancada, levando somente os de melhor resultado para testagem *in vitro* (Adelusi *et al.*, 2022).

De forma geral, a macromolécula (receptor) é tratada como rígida ou com flexibilidade limitada, enquanto o ligante é flexível e com vários graus de liberdade conformacional. O resultado depende de dois componentes principais: o algoritmo de busca e a função de pontuação (Huang; Grinter; Zou, 2010).



Fonte: De Ruyck et al., 2016.

Os algoritmos de busca têm como objetivo identificar regiões energeticamente acessíveis do espaço configuracional, empregando algoritmos genéticos, amostragem estocástica e minimizações locais (Gupta; Kasmi; Podlipnik, 2020). Já as funções de pontuação utilizam potenciais empíricos ou semiempíricos que incluem contribuições de interações eletrostáticas, van der Waals, ligações de hidrogênio e dessolvatação, fornecendo estimativa aproximada da energia livre de ligação para cada conformero encontrado pelo algoritmo de busca (Huang; Grinter; Zou, 2010).

Entretanto, essas funções foram majoritariamente parametrizadas para sistemas orgânicos e apresentam limitações significativas quando aplicada a metaloproteínas. Interações envolvendo metais de transição não são descritas adequadamente, uma vez que efeitos como estados de spin, transferência de carga, polarização eletrônica e caráter covalente das ligações metal-ligante não são explicitamente considerados (Clemente; Prieto; Martí, 2024). Essa limitação torna-se ainda mais pronunciada em sistemas contendo clusters [4Fe-4S], que contêm uma estrutura eletrônica caracterizada por múltiplos centros metálicos acoplados magneticamente e cargas facionárias nos átomos de ferro (+2,5) (Carvalho; Swart, 2014).

Abordagens tradicionais de *docking* podem falhar em reproduzir corretamente modos de coordenação metálica e em classificar adequadamente ligantes com potencial quelante, como foi apresentado por Sciotino *et al.*, que mostraram que, na maioria dos programas disponíveis, complexos metálicos só podem ser tratados de forma realista mediante uso de *docking* covalente

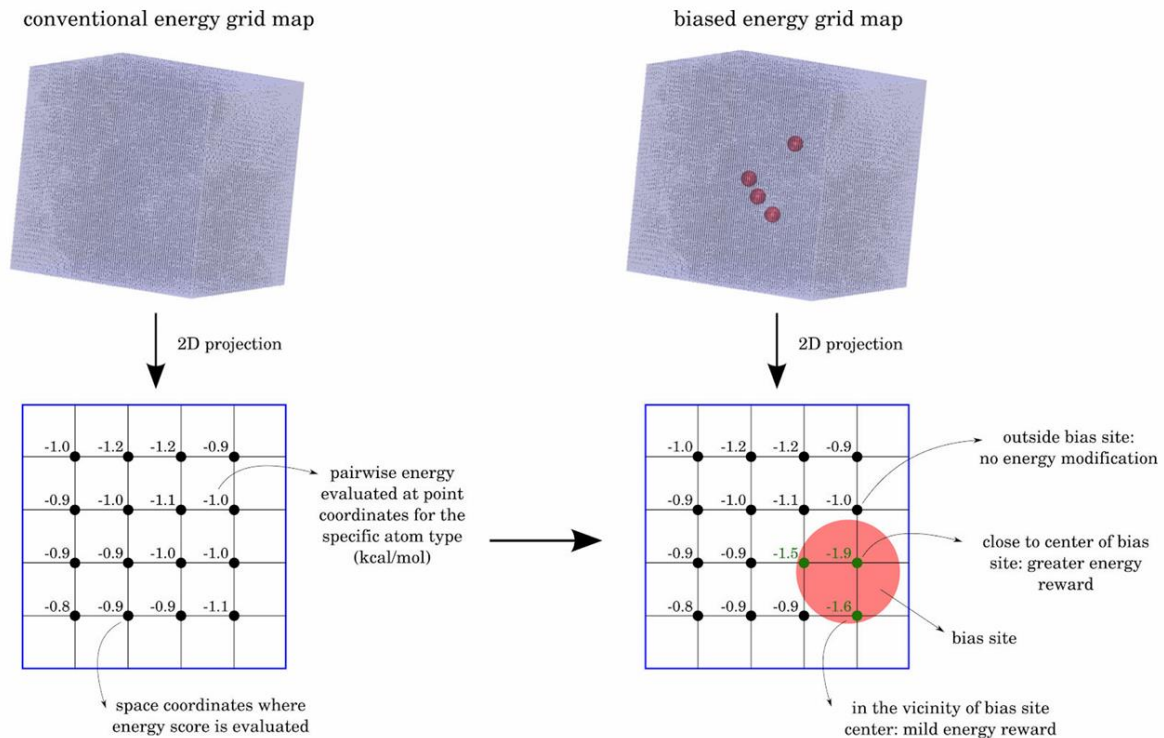
ou restrições geométricas explícitas, exigindo um conhecimento prévio do sítio de coordenação. Para contornar esse problema, os autores propuseram uma modificação do GOLDScore, que é a função de pontuação do programa GOLD (Jones et al., 1997) e na qual a ligação metal-ligante é modelada como uma pseudo-ligação de hidrogênio direcional. Nessa abordagem, parâmetros específicos de coordenação foram introduzidos diretamente na função de pontuação, incluindo novos tipos atômicos para metais e resíduos coordenantes, além de uso de átomos “*dummy*” para preservar a direcionalidade da ligação. Esse esquema permitiu reproduzir poses experimentais com RMSD (*Root Mean Square Deviation*) inferior a 1 Å em um conjunto de 39 complexos metaloproteína-ligante, sem a necessidade de restrição geométrica explícitas (Sciortino et al., 2018). Apesar desse avanço, tal estratégia exige reparametrização manual da função de pontuação para cada metal e depende fortemente de ajustes empíricos, o que dificulta sua generalização para diferentes classes de metaloproteínas.

No caso específico para metaloproteínas ferro-dependentes, a maioria dos estudos estão focados em proteínas que contêm o grupo heme. Lee et al. desenvolveram o GalaxyDock2-HEME, uma extensão do GalaxyDock2 que incorpora explicitamente um termo energético de coordenação ferro-ligante, dependente tanto da distância quanto da orientação angular na função de pontuação. O GalaxyDock2-HEME introduz potenciais específicos para Fe-N (aromático e não aromático), Fe-S e Fe-O, além de utilizar cargas parciais do grupo heme derivadas de cálculos quânticos (como DFT), reduzindo o viés excessivo associado às cargas do Gasteiger. O uso de cargas Gasteiger, embora muito popular em simulações de *docking* molecular, devido ao baixo custo computacional, pode acarretar em problemas como: (i) subestimação de polaridade: falha em reproduzir corretamente momento de dipolo em moléculas polares; (ii) viés de dependência estrutural: não captura adequadamente o ambiente química específico da molécula (polarização do ambiente químico); (iii) problemas em átomos e grupos específicos: fósforo hexavalente, que não são parametrizados corretamente; (iv) conformações intramoleculares: forte polarização nem sempre é bem representada, podendo gerar perturbações em estudos de *docking* (Gilad; Senderowitz, 2014; Kramer; Gedeck, 2011). Como resultado, o método apresentou desempenho superior a AutoDock Vina, PLANTS, LeDock e ao GalaxyDock2 original, mas ainda não passando de 70% de sucesso ($\text{RMSD} \leq 2,0$ Å) (Lee et al., 2023).

Uma alternativa que não envolve modificações diretas nem na função de pontuação nem no algoritmo de busca é o AutoDock Bias, proposto por Arcon et al. No AutoDock clássico, as interações proteína-ligante são avaliadas a partir de mapas de energia pré-calculados (*grid maps*). O AutoDock Bias atua justamente nesse estágio, modificando esses mapas por meio da

adição de poços energéticos artificiais em posições específicas, caracterizados por uma profundidade definida (por exemplo, -8,0 Kcal/mol) e um raio determinado (geralmente ~1,2 Å) (Figura 5).

Figura 5 -Esquema do funcionamento do AutoDock Bias.



Fonte: Arcon et al., 2019.

Recentemente, essa estratégia foi adaptada para metaloproteínas por meio do chamado *Metalloprotein Bias Docking* (MBD) (Clemente; Prieto; Martí, 2024), no qual poços energéticos artificiais são posicionados nos sítios esperados de coordenação metálica, definidos a partir de geometrias médias extraídas de estruturas experimentais. Essa abordagem permite impor uma direção para geometrias de coordenação mais realistas, resultando em melhorias na predição de poses. No entanto, embora Clemente *et al.* tenham observado melhoras para diversos metais, o desempenho em sistemas ferro-dependentes, especificamente que contenham o grupo heme, permaneceu limitado, com taxas de sucesso de apenas 33,3%, para uma CYP450 e 63,3% para uma proteína NOS (*nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintase).

Tendo em vista a relevância das proteínas contendo os grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, e que a inibição desses grupos pode trazer impactos tanto para a indústria do petróleo (U. Silva *et al.*, 2025) quanto para a indústria farmacêutica (Paritala; Suzuki; Carroll, 2015), o estudo de estratégias para a inibição dos clusters é fundamental. Além disso, devido a limitação de programas de

docking na descrição adequada de sistemas contendo metais, como os grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, também é fundamental a avaliação desses programas quanto a descrição adequada dessas metaloenzimas em complexo com potenciais inibidores. Assim, esse trabalho se objetiva a avaliar, por meio de métodos e DFT e de *docking*, a ligação entre agentes quelantes e os átomos de ferro dos clusters $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ em enzimas que contenham esse grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, por meio de métodos quânticos (DFT) e métodos clássicos (*docking*), a complexação de átomos de ferro presentes em no modelo sintético $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_3)_4]^{2-}$ em sistemas enzimáticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e selecionar estruturas 3D no Protein Data Bank (PDB) que contenham grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{2-}$.
- Realizar a otimização de geometria dos ligantes 1Nap, 2Nap, 6Phe, 32P, 34P, 8HQ, Acri, AHA, Cat, DHP, HHTP, HXA, MGL e PPH por meio de cálculos de DFT.
- Obter as estruturas otimizadas dos complexos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{2-}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_3]^{2-}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4\text{L}]^{2-}$ e $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_3\text{L}]^{2-}$, sendo L um quelante de ferro, utilizando DFT.
- Calcular a energia de ligação Fe-L nos sistemas $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4\text{L}]^{2-}$ e $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_3\text{L}]^{2-}$ e avaliar a influência do impedimento estérico na estabilidade da coordenação.
- Avaliar a ligação dos quelantes nos sítios proteicos contendo os grupos $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4]^{2-}$ e $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_3]^{2-}$ por *docking* molecular, comparando o desempenho de diferentes programas.
- Analisar a influência da parametrização metálica dos programas de *docking* na afinidade de ligação e na conformação das melhores poses obtidas.

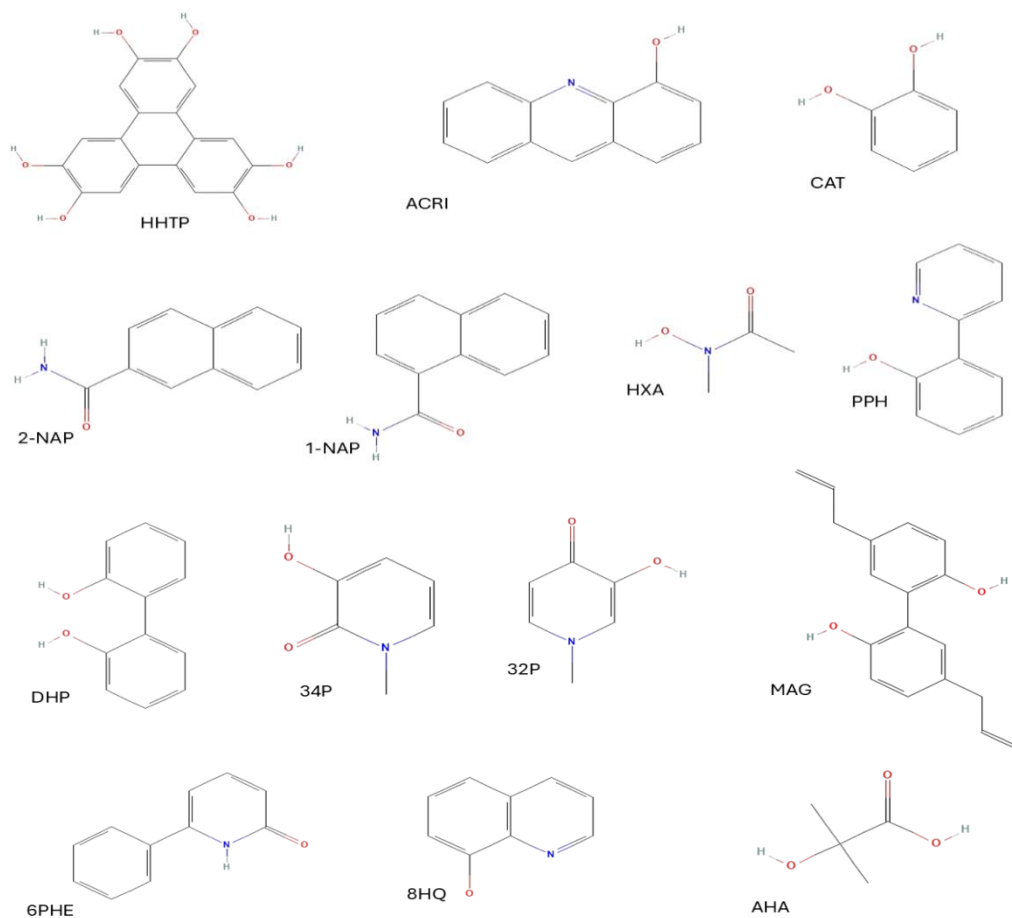
3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS LIGANTES E PROTEÍNAS ALVO

As estruturas 3D das proteínas foram retiradas do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Berman, *et al.*, 2000). Foram selecionadas quatro proteínas, identificadas pelos IDs: 2GOY (resolução de 2,7 Å, Chartron *et al.*, 2006); 7LHS (resolução de 3,11 Å, Feliciano; Carroll; Drennan, 2021); 9CCB (resolução 2,08 Å, Rodriguez Carrero *et al.*, 2025) e 4K36 (resolução de 1,62 Å, Goldman *et al.*, 2013).

As estruturas tridimensionais dos ligantes 1NAP, 2NAP, 6PHE, 8HQ, 32P, 34P, ACRI, AHA, DHP, HHTP, HXA, MGL, PPH e CAT (Figura 6 e Apêndice A) foram obtidas do banco de dados *PubChem* (Kim *et al.*, 2025). O estado de protonação de cada ligante foi ajustado para o pH fisiológico (7,4) utilizando o *software* Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012). A seleção dos ligantes baseou-se na capacidade de coordenação bidentada e no cumprimento das regras de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997).

Figura 6 - : Estruturas bidimensionais dos ligantes estudados.



Fonte: Autoria própria.

3.2 CÁLCULOS DE DFT

Todos os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados no programa Gaussian 09 (FRISCH et. al. 2009). Conforme estabelecido na literatura, a multiplicidade mais estável para o $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ é o estado singlete ($S = 0$) (Carvalho; Swart, 2014, 2015).

O ambiente tetraédrico dos átomos de Fe do grupo $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ foi completado por grupos tiolatos de resíduos de cisteína (Cys), assim, utilizou-se o modelo $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_3)_4]^{2-}$ como representação do sítio biológico. Utilizou-se o funcional TPSS (Tao et al., 2003) juntamente com o conjunto de bases DGDZVP (Da Silva et al., 2022). Para simular o ambiente de baixa polaridade característico do interior proteico, empregou-se o modelo de solvente implícito com constante dielétrica do dietiléter. A confirmação das estruturas como mínimos de energia foi confirmada pela ausência de frequências imaginárias.

3.3 PROTOCOLO DE DOCKING MOLECULAR E MAPEAMENTO DE CAVIDADES

3.3.1 Mapeamento e acessibilidade do Sítio

As proteínas selecionadas no servidor PDB (2GOY, 7LHS, 9CCB e 4K36) foram submetidas ao servidor CavityPlus (<http://pkumdl.cn:8000/cavityplus/>) (Xu et al., 2018; Krivák; Hoksza, 2018). Os parâmetros de busca utilizados foram o padrão do servidor (SEPARATE_MIN_DEPTH: 8, MIN_ABSTRACT_LIMIT: 1500, SEPARATE_MAX_LIMIT: 6000 e MIN_ABSTRACT_DEPTH: 2), utilizando como referência o cluster de Fe-S. Foram extraídos parâmetros de DrugScore (potencial de interação com fármacos) e identificação de MaxSubsite para delimitar se o centro metálico se encontra em uma cavidade exposta ao solvente ou enterrada na proteína.

3.3.2 Preparação e Esquema de Cargas

Utilizou-se o *software* Autodock Tools (Morris et al., 2009) para preparação das proteínas e ligantes para o estudo de *docking*. Além da remoção de solvente e adição de hidrogênios polares, aplicou-se o seguinte tratamento para as cargas parciais:

- Macromoléculas: Cargas de Kollman foram atribuídas com ajuste manual do cluster de Fe-S para -2,00 (S) e +2,50 (Fe). As coordenadas do centro da caixa, dimensões da caixa e número de corridas executados estão descritos na Tabela 1.

- Ligantes: O estudo de *redocking* realizado com SAM (4K36) utilizou três esquemas comparativos: Cargas derivadas de Kollman, cargas derivadas de potencial eletrostático (ESP) (Besler; Merz; Kollman, 1990; Singh; Kollman, 1984) via Gaussian 09 e o modelo AM1-BCC (Jakalian; Jack; Bayly, 2002) via Antechamber (Bernardi *et al.*, 2019). Para os ligantes obtidos do PubChem, foi utilizado as cargas derivadas de Kollman. As simulações de *docking* foram realizados no *software* Autodock4 (Morris *et al.*, 2009). O número de corridas utilizadas está informado na Tabela 1. Foi utilizado o algoritmo lamarckiano para todas as proteínas. Para a proteína 4K36 também foram realizados cálculos com algoritmo genético.

3.3.3 Algoritmos e potenciais de viés

As simulações foram executadas no LeDock, AutoDock4 e variações com viés (Autodock Bias e Metalloprotein Bias Docking). O *software* Ledock (Zhao; Caflisch, 2013) utilizou o centro da caixa informado na Tabela 1.

Para as simulações de *docking* com o *software* Autodock4 (Morris *et al.*, 2009) e suas variações utilizou os números de corridas informados na Tabela 1. Em todas as simulações utilizou-se o algoritmo lamarckiano.

Tabela 1 - Coordenadas e dimensões da caixa e número de corridas realizadas no estudo de *docking* para cada proteína.

código PDB	Coordenadas do centro da caixa	dimensões da caixa	Número de corridas
2GOY	x: 31,363 y: 50,031 z: 17,408	40x40x40	100
7LHS	x: 80,136 y: 48,613 z: 216,095	40x40x40	100
9CCB	x: 10,578 y: 2,535 z: -3,909	40x40x40	100
4K36	x: 23,989 y: 23,508 z: 46,765	50x50x50	50

Fonte: Autoria própria.

A metodologia do AutoDock Bias (Arcon *et al.*, 2019) considerou os seguintes valores de energia de viés de -2,0; -3,0; -4,0; -5,0; -6,0; -7,0; -8,0; -9,0 e -10,0 Kcal/mol com raio de 1,2 Å. Foram utilizados dois pontos com viés para as coordenadas x, y e z: 19,559, 25,755, 45,309 e 19,142, 22,240 e 46,441 sendo tratados como doadores de elétrons. Para os cálculos em que foi colocado um viés no átomo de Fe, ele foi tratado como acceptor de elétrons e coordenadas x, y, z: 23,989, 23,508, 46,765, -2,0 kcal/mol de energia e raio 1,2 Å.

Para Metalloprotein Bias Docking, foi calculado o ponto médio de viés utilizando as coordenadas x, y, z: 19,351, 23,498 e 45,875, com valores de energia de -2,0 Kcal/mol e raio de 1,2 Å, sendo tratado como doador de elétrons.

O servidor Cavityplus (Xu *et al.*, 2018) (Krivák; Hoksza, 2018) foi utilizado para estudos de cavidades de todas as proteínas estudadas.

3.3.4 Critérios de Seleção e Análise de Desempenho

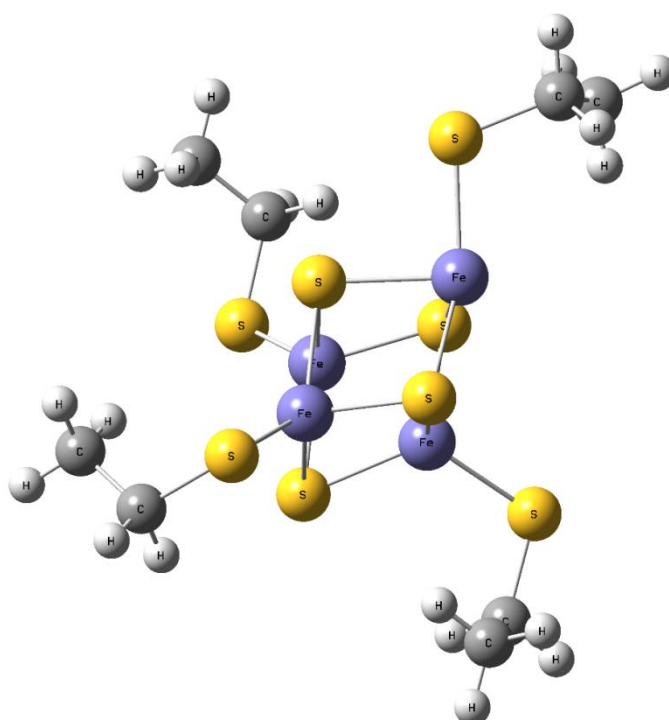
As poses foram selecionadas com base na clusterização (RMSD de 2.0 Å), adotando-se a conformação de menor energia dentro do cluster mais populoso. A avaliação de desempenho dos programas não se restringiu ao RMSD global; incluiu uma análise geométrica local, comparando as distâncias Fe-L e os ângulos de coordenação obtidos no *docking* com os parâmetros de referência calculados via DFT (Seção 3.2).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CÁLCULOS DE DFT

A estrutura otimizada do complexo $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_3)_4]^{2-}$ (Figura 7) mostrou uma geometria tetraédrica distorcida ao redor de cada átomo de Ferro, conforme descrito na literatura (Da Silva *et al.*, 2022). Com o objetivo de facilitar a leitura e discussão dos resultados, o cluster $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2-}$ será referido como “Cubo” e os ligantes de etanotiolato (SCH_2CH_3) como modelos de “Cys”.

Figura 7 - Estrutura otimizada de $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_3)_4]^{2-}$ calculada com TPSS/DGDZVP



Fonte: Autoria Própria.

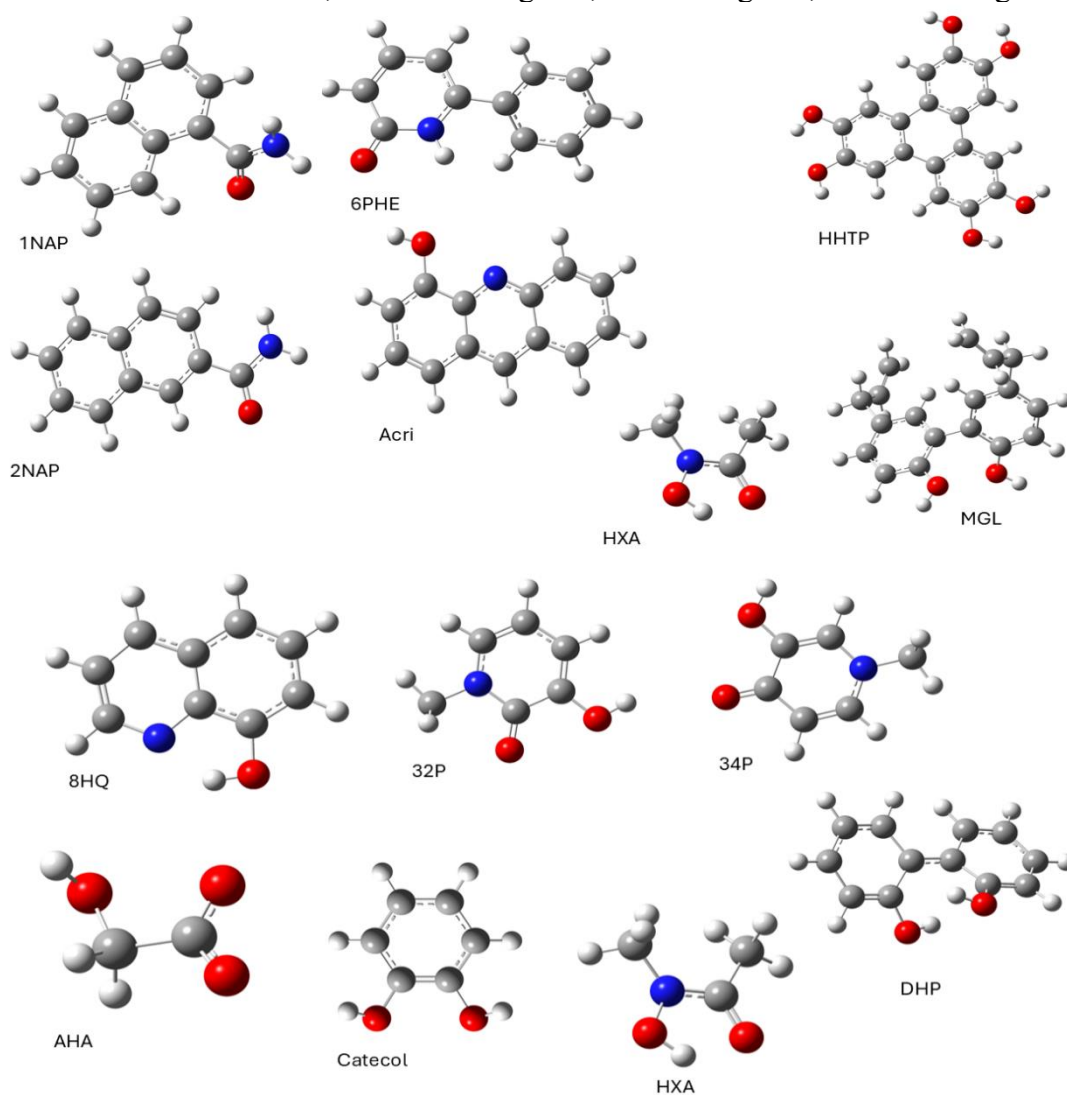
Para a realização do cálculo de energia de ligação, foi necessário o cálculo de otimização também dos ligantes livres e do complexo do cluster com o ligante. As estruturas otimizadas para os ligantes podem ser encontradas na Figura 8 e as estruturas de todos os complexos estão no Apêndice B.

As energias de ligação foram calculadas subtraindo-se a soma das energias dos reagentes ($E_{\text{cubo4Cys}} + E_L$) da energia do complexo final ($E_{\text{Cubo4Cys-L}}$), como mostrado na Equação 17. Os valores calculados individualmente estão no Apêndice C. Os valores de energia de ligação dos complexos estão na Tabela 2.

$$\Delta E_{\text{lig Total}} = \Delta E_{\text{lig}} (\text{produtos}) - \Delta E_{\text{lig}} (\text{reagentes})$$

Equação 17

Figura 8- Estruturas 3D otimizadas dos ligantes calculados por DFT (TPSS/DGDZVP).
Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; branca: hidrogênio.

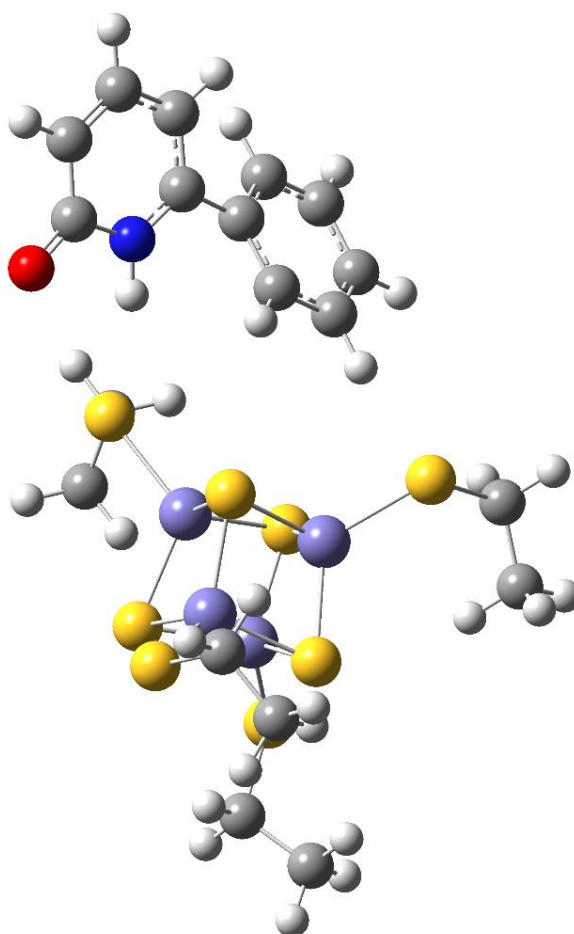


Fonte: Autoria Própria.

Como pode ser visto na Tabela 2, a energia de ligação para os complexos Cubo4Cys-L indica que a coordenação direta dos ligantes ao cluster não é energeticamente favorável, apresentando, em sua maioria, valores de ΔE positivos ou apenas discretamente negativos. O ligante que apresentou o valor mais favorável (mais negativo) foi o 6Phe. Entretanto, como pode ser visto na Figura 9, ele não se coordena efetivamente ao Cubo4Cys. Esse comportamento sugere que, em um sítio de coordenação saturado, o impedimento estérico e a estabilidade da ligação Fe–S dificultam a entrada do quelante.

Considerando que os ligantes selecionados no PubChem possuem potencial de coordenação bidentada, visto que o átomo de Ferro Cubo4Cys apresentou uma geometria tetraédrica, a expansão da esfera de coordenação para uma geometria octaédrica seria, em princípio, esperada. Sabe-se que o Ferro pode assumir diversas geometrias de coordenação, sendo a tetraédrica e octaédrica as mais frequentes em sistemas biológicos. Neste trabalho, a escolha de ligantes bidentados visou favorecer a formação de uma geometria octaédrica. Entretanto, como discutido anteriormente, o complexo Cubo4Cys-6Phe apresentou valor de energia de ligação mais negativo, mesmo o ligante não se aproximando do átomo de ferro do cubo de maneira compatível com a formação de uma ligação. Esse resultado reforça que a geometria tetraédrica original do ferro é energeticamente preferencial no contexto de um sítio saturado.

Figura 9 - Estrutura otimizada do complexo Cubo4Cys-6Phe, calculada por DFT (TPSS/DGDZVP). Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.



Fonte: Autoria Própria.

Dentre as proteínas que contêm clusters $[4\text{Fe-4S}]$, há aqueles sistemas coordenados apenas 3 cisteínas, tendo um átomo de Ferro com sítio de ligação vacante, como observados em

certas transferases. Portanto, foram realizados cálculos de DFT para os complexos de um Cubo coordenado a apenas 3 cisteínas (Cubo3Cys). Os valores de energia individuais, estão listados no Apêndice D.

Os valores de energia de ligação dos complexos Cubo3Cys-ligante e Cubo4Cys-ligante podem ser vistos na Tabela 2. Observa-se uma diferença termodinâmica considerável entre os sistemas quando há um átomo de ferro disponível para coordenação.

Tabela 2 - Valores de energia de ligação dos complexos Ligante-cubo (4Cys e 3Cys) e menor valor de ligação Fe-L.

Ligantes	Energia ligação Cubo4Cys-L (kcal/mol)	Ligação Cubo4Cys-L (Å)	Energia ligação Cubo3Cys-L (kcal/mol)	Ligação Cubo3Cys-L (Å)
1nap	8,68	2.03	-21,40	1.96
2nap	21,28	2.02	2,33	2.00
6phe	-2,99	9.08	-16,79	2.04
8hq	25,32	1.97	11,68	1.98
32p	2,72	2.03	-28,52	1.97
34p	5,06	2.03	-13,73	2.00
acri	-1,67	2.02	-24,33	2.02
aha	12,22	2.04	-2,08	2.09
dhp	30,01	2.18	18,16	2.14
hhtp	19,97	2.14	2,60	2.07
hxa	12,86	2.01	-8,01	1.99
mgl	14,48	2.16	-8,30	2.09
pph	47,82	2.00	21,90	1.98
cat	9,76	2.09	-3,44	2.05

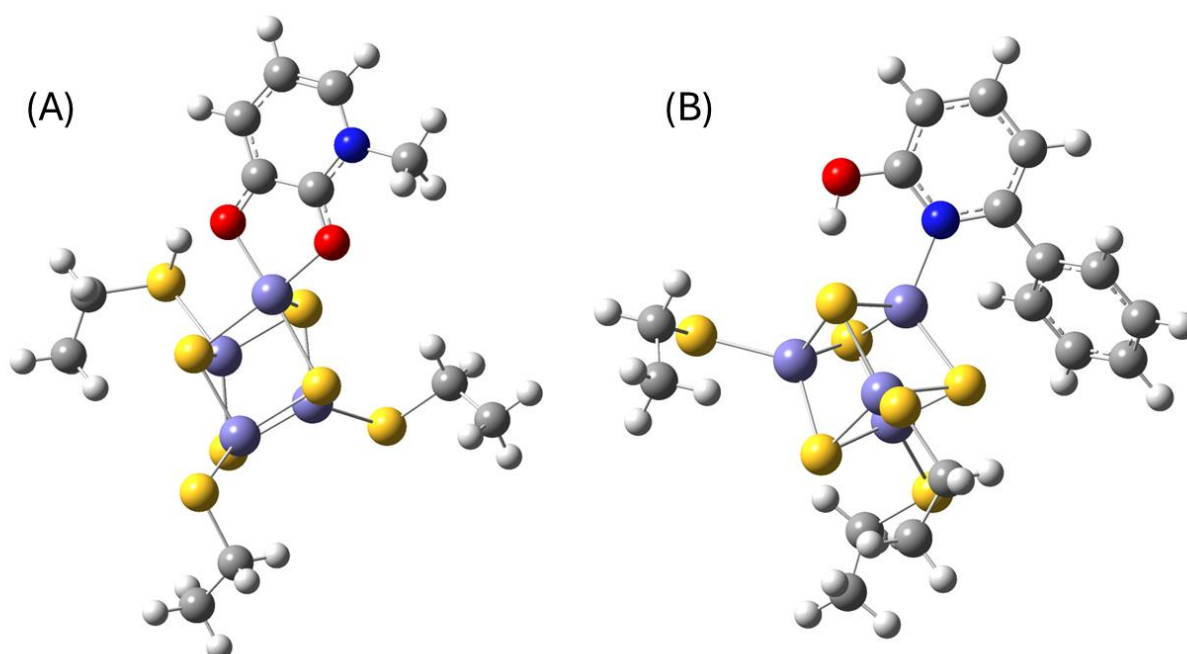
Fonte: Autoria própria.

Para os complexos Cubo4Cys-ligante, a coordenação não foi favorável para nenhum ligante, como pode ser observado pelos valores de energia e de distância de ligação (Tabela 2). O único ligante que apresentou energia de ligação negativa foi 6phe, porém, não houve coordenação (distância Fe-L maior que 9.00 Å). Para os demais, embora a distância Fe-L indique coordenação (distância Fe-L em torno de 2.00 Å), os valores de energia foram altos demais, indicando que a coordenação desses ligantes à um átomo de Fe tetracoordenado não é favorecida.

Para os complexos Cubo3Cys-ligante, todos as distâncias Fe-L indicaram coordenação (Tabela 2). Alguns ligantes, como 2Nap, 8HQ, DHP, HHTP e PPH, continuaram apresentando valores de energia de ligação positivos, mostrando que a coordenação desses ligantes com o Cubo não foi favorável, independente do átomo de ferro estar livre ou não. Para os demais

ligantes, a energia do sistema tornou-se favorável à coordenação, destacando o ligante 32P (Figura 10a), que obteve uma energia de -28,52 kcal/mol, que se liga de forma bidentada ao ferro, assumindo uma geometria bipirimidil trigonal. O ligante 6Phe, que obteve menor valor de energia no cálculo para Cubo4Cys e não se coordenou ao ferro, no cálculo para o complexo Cubo3Cys o valor da energia de ligação caiu de forma considerável e se coordenou ao Ferro, porém não de forma bidentada e sim apenas pelo átomo de Nitrogênio (Figura 10b) assumindo uma geometria tetraédrica.

Figura 10 - Estruturas otimizadas dos complexos (a) Cubo3Cys-32P e (b) Cubo3Cys-6Phe calculados por DFT (TPSS/DGDZVP). Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.



Fonte: Autoria Própria.

Uma vez que os complexos Cubo3Cys-ligante com os ligantes 1nap, 6phe, 32p, 34p, acri, aha, hxa, mg1, cat apresentaram valores de distância Fe-L e energia de ligação compatíveis com uma coordenação favorável (Tabela 2), os ângulos ao redor do átomo de ferro ligado ao ligante L foram analisados e comparados com os respectivos valores para o ligante Cys (Tabela 3). Os valores mostraram que, com exceção dos ligantes 1nap e 6phe, os demais provocaram mudanças significativas na geometria do Cubo, indicando que uma coordenação dessas espécies deve perturbar o papel redox desempenhado por esses cofatores.

Tabela 3 - Ângulos S-Fe-S no cubo na ausência e presença dos melhores ligantes nos complexos Cubo3Cys-ligante.

	Ângulo 1	Ângulo 2	Ângulo 3
Cys	104.88	103.10	103.67
1nap	103.28	103.95	103.95
6phe	102.87	104.43	102.76
32p	103.32	80.51	77.26
34p	80.64	82.52	87.77
acri	95.91	77.02	76.77
aha	95.54	79.22	78.63
hxa	80.31	81.83	86.24
mgl	83.21	86.08	80.11
cat	78.23	97.99	77.54

Fonte: Autoria Própria.

Esses resultados indicam que, no geral, a coordenação dos quelantes usados nesse trabalho ao ferro é favorável somente se houver um átomo de ferro desimpedido, ou seja, com ausência de um ligante cisteína. Além disso, os ligantes 32p, 34p, acri, aha, hxa, mgl e cat demonstraram serem capazes de modificar significativamente a geometria do cubo quando coordenados ao ferro.

4.2 DOCKING MOLECULAR

4.2.1 Proteína 2GOY

A enzima adenosina 5'-fosfosulfato redutase (APSr) é responsável pela redução da adenosina-5'-fosfosulfato tendo como produtos a adenosina monofosfato (AMP) e sulfito (SO_3^{2-}). Esse é um processo essencial no ciclo do enxofre e está presente em bactérias e alguns organismos fotossintéticos, como plantas e algas, mas não está presente em humanos. A APSr contém um Cubo4Cys que atua como centro de transferência eletrônica durante o processo catalítico (Chung; Kim; Leustek, 2024). A estrutura cristalográfica identificada como 2GOY no banco de dados PDB corresponde a uma APSr e foi empregada neste trabalho para estudos de *docking*.

De acordo com os valores de energia da Tabela 4, o ligante que apresentou menor valor de energia, foi o MGL, com valor de -6,42 kcal/mol com uma distância de 6,6 Å do cubo4cys. Apesar de ser o de menor de energia, não foi o que mais se aproximou do cubo, sendo o ligante AHA com menor distância (4,2 Å). As disposições dos ligantes em relação ao cubo4cys pode ser visto na Figura 11.

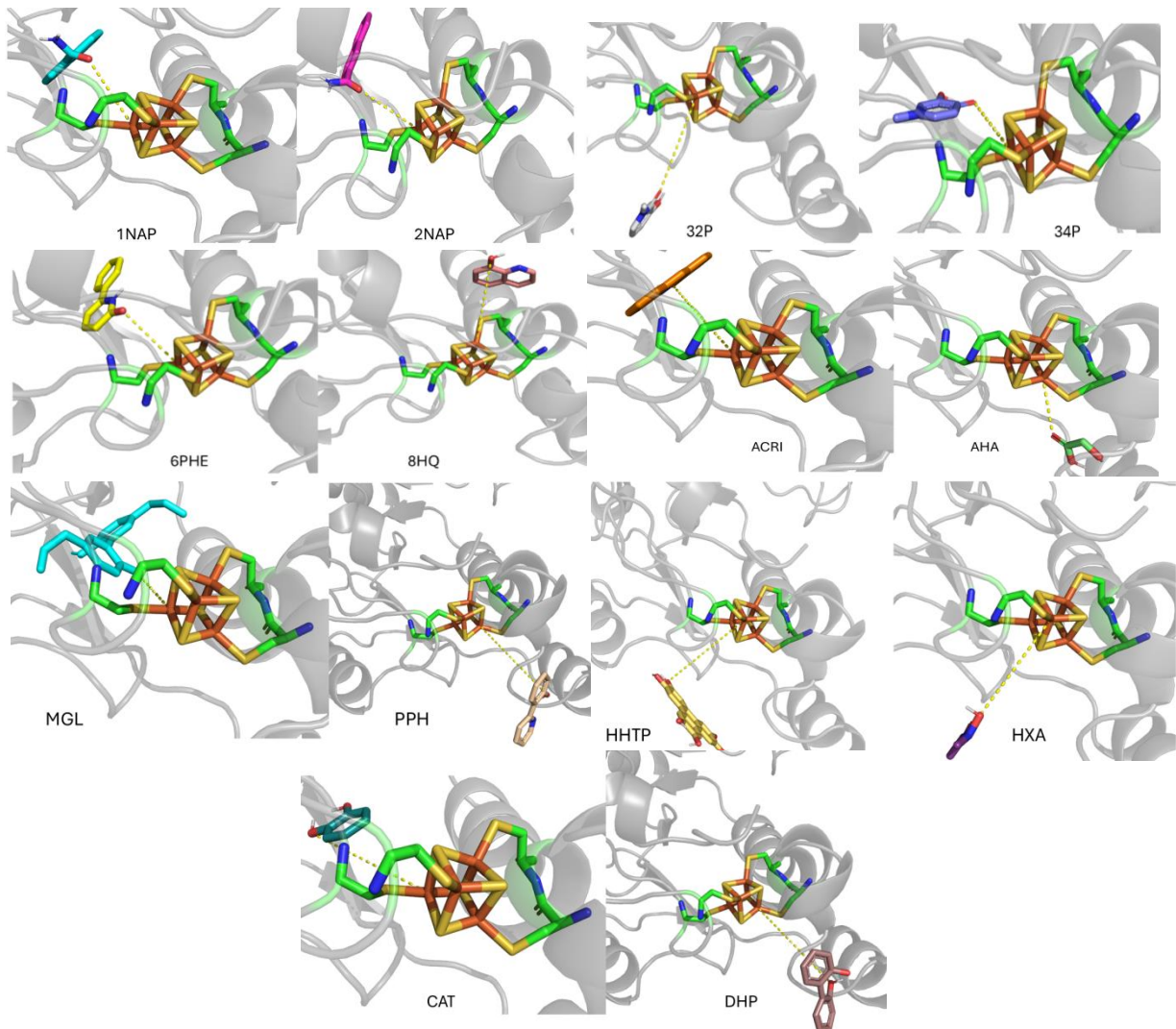
Tabela 4 - Resultado energia *docking* proteína 2GOY com os ligantes. Foram realizadas 100 corridas.

Ligantes	Energia de ligação (Kcal/mol)	# Corrida	Distância ligante-cubo (Å)
1Nap	-5,49	30	5,6
2nap	-5,05	69	5,6
6phe	-4,60	36	5,2
32P	-2,33	86	8,1
34p	-2,73	99	6,0
8hq	-2,70	83	9,8
acri	-4,98	75	11,3
aha	-3,79	38	4,2
cat	-4,24	73	10,6
dhp	-5,74	53	11,3
hhtp	-3,23	27	10,9
hxa	-2,96	10	8,2
mgl	-6,42	94	6,6
pph	-5,04	96	10,8

Fonte: Autoria própria.

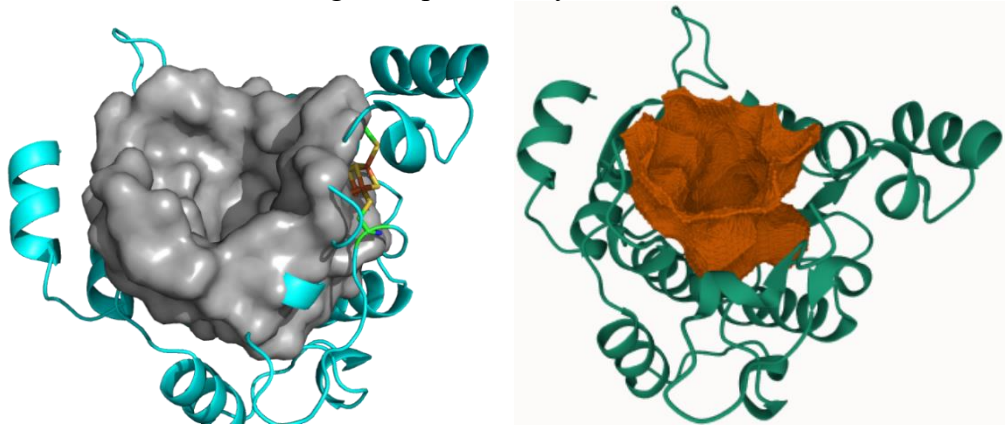
Uma vez que os ligantes apresentaram longas distâncias do cubo, foi realizado um estudo de cavidade da proteína. A identificação dessas cavidades foi realizada utilizando o servidor CavityPlus, que emprega o algoritmo geométrico CAVITY. As cavidades resultantes são caracterizadas com base em parâmetros geométricos, especialmente profundidade, volume e grau de encerramento, sendo posteriormente ranqueados pelo CavityScore (Yuan; Pei; Lai, 2013). Na Figura 12 pode ser visto que o cubo4cys está fora da cavidade principal da proteína e, aplicando a superfície da proteína (Figura 13), vê-se que o cubo4cys está enterrado dentro da proteína, sem acesso, nem pela cavidade, nem pela parte externa, o que justifica a distância e posição observadas dos ligantes (Figura 14).

Figura 11 - Poses de menor energia de cada ligantes na proteína 2GOY. (Imagens Pymol)



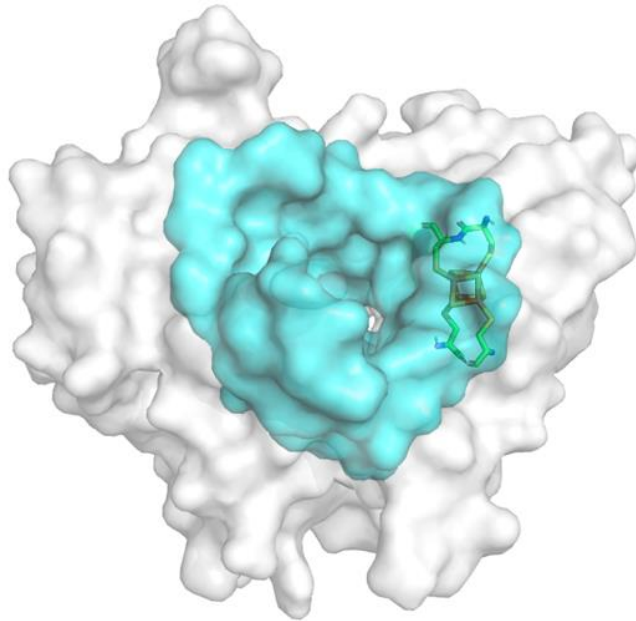
Fonte: Autoria Própria.

Figura 12- Cavidade em superfície proteína 2GOY calculada pelo servidor CavityPlus. Cubo4Cys em destaque (laranja e amarelo). À esquerda imagem Pymol. À direita, imagem gerada pelo CavityPlus.



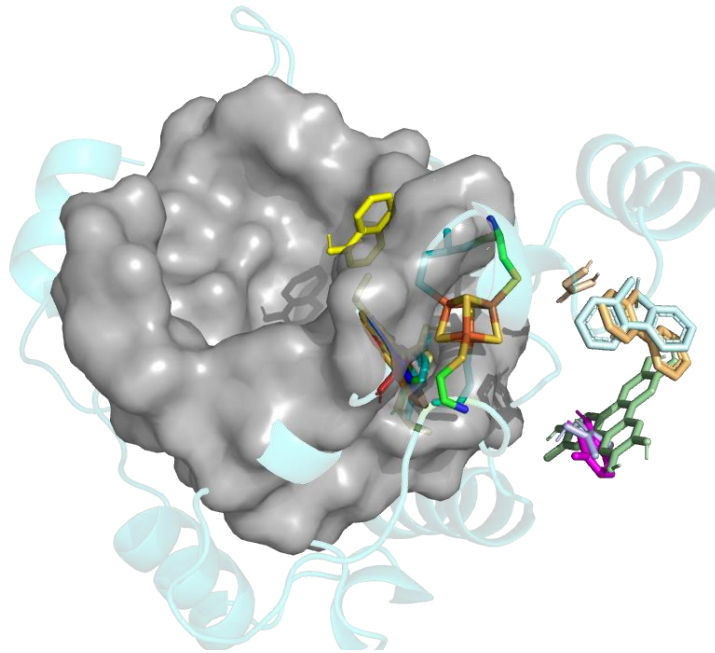
Fonte: Autoria Própria.

Figura 13 - Superfície da proteína 2GOY (cinza) e cavidade (ciano) com cubo4cys em destaque. (Imagem Pymol)



Fonte: Autoria Própria.

Figura 14 - Posição dos ligantes em relação à cavidade da proteína 2GOY. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PP)

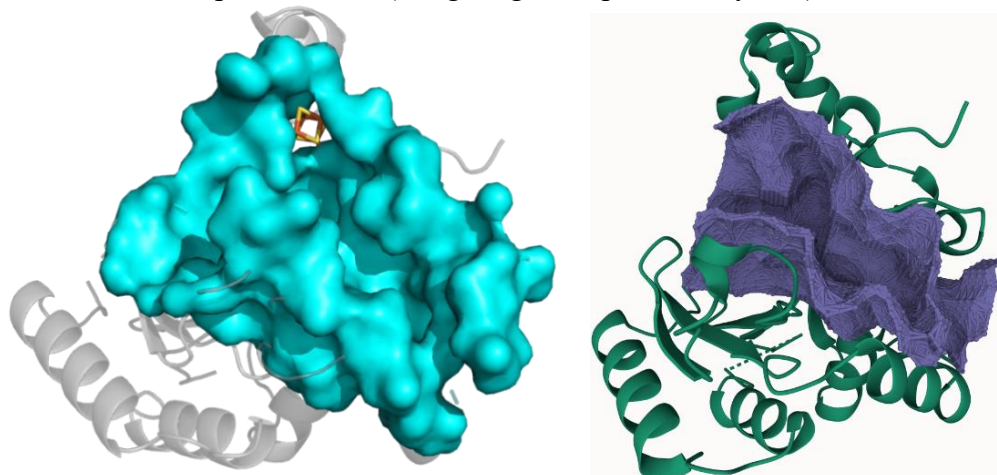


Fonte: Autoria Própria.

4.2.2 Proteína 7LHS

Após a constatação de que a acessibilidade da cavidade representa um desafio para a aproximação dos ligantes ao cubo, foi selecionada uma segunda proteína, ainda pertencente à classe das adenosina-5'-fosfosulfato redutases, desta vez proveniente de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria responsável pelo desenvolvimento da tuberculose. A estrutura cristalográfica correspondente foi obtida do PDB, sob código 7LHS. Como pode ser visto na Figura 15, a cavidade identificada pelo servidor CavityPlus apresenta dimensões suficientemente amplas e acesso direto ao cubo, em contraste com o observado para a proteína analisada anteriormente (2GOY). Foi realizado, então, o *docking* de todos os 14 ligantes com a proteína 7LHS.

Figura 15 - Cavidade proteína 7LHS, à esquerda superfície em ciano (Pymol) e à direita superfície roxa (Imagem gerada pelo CavityPlus).



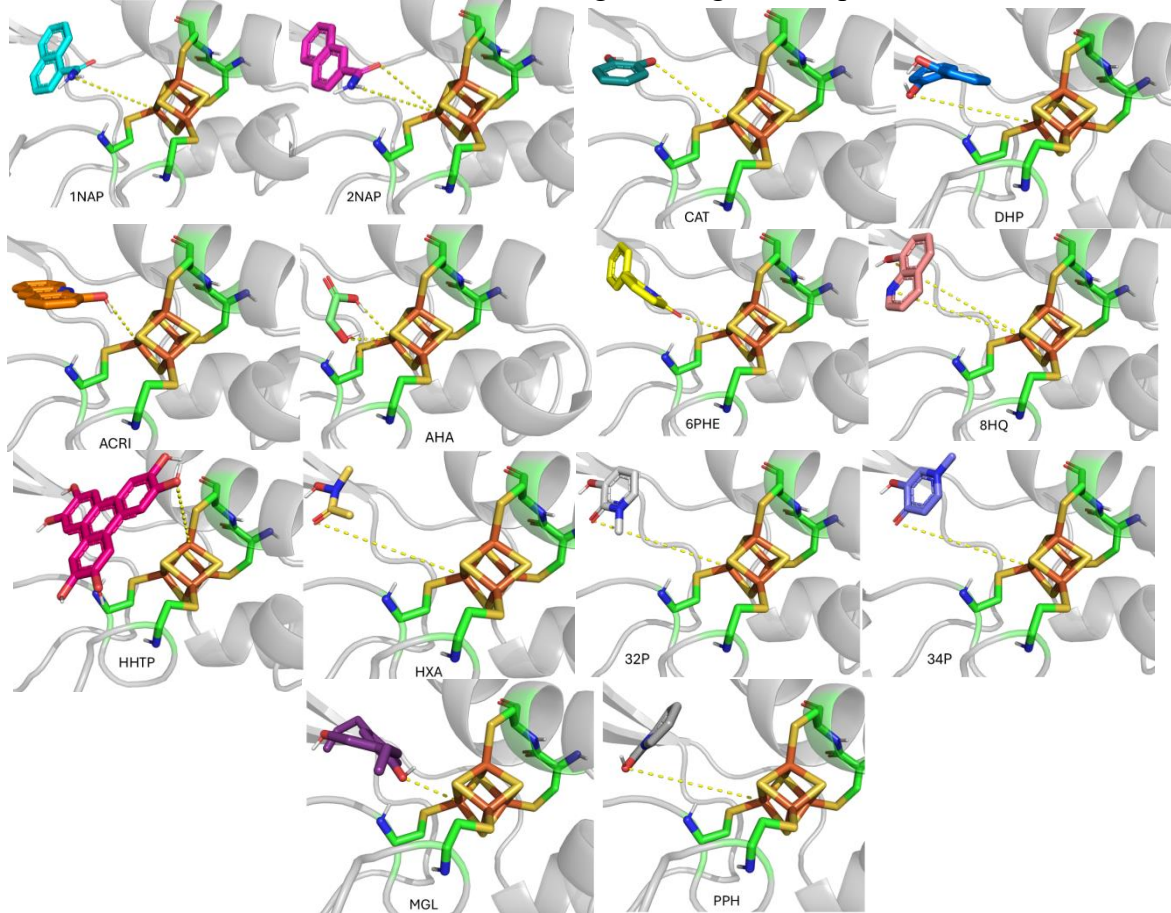
Fonte: Autoria Própria.

Os resultados, apresentados na Tabela 5 e Figura 16, indicam que o ligante DHP apresentou a pose de menor energia de ligação (-4,78 kcal/mol), entretanto, este não foi o ligante que mais se aproximou do cubo, apresentando uma distância de 8,2 Å. Por outro lado, o ligante MGL apresentou a menor distância em relação ao cubo, de aproximadamente 3,7 Å. Observe ainda que todos os ligantes permaneceram localizados no interior da cavidade (Figura 17). A ausência de um ligante se aproximar do cubo de forma efetiva está em concordância com os resultados obtidos nos cálculos de DFT, nos quais se verificou que a coordenação dos ligantes ao cubo coordenado por 4 cisteínas não é energeticamente favorável.

Tabela 5 - Resultados do *docking* da proteína 7LHS com os ligantes. Foram realizadas 100 corridas.

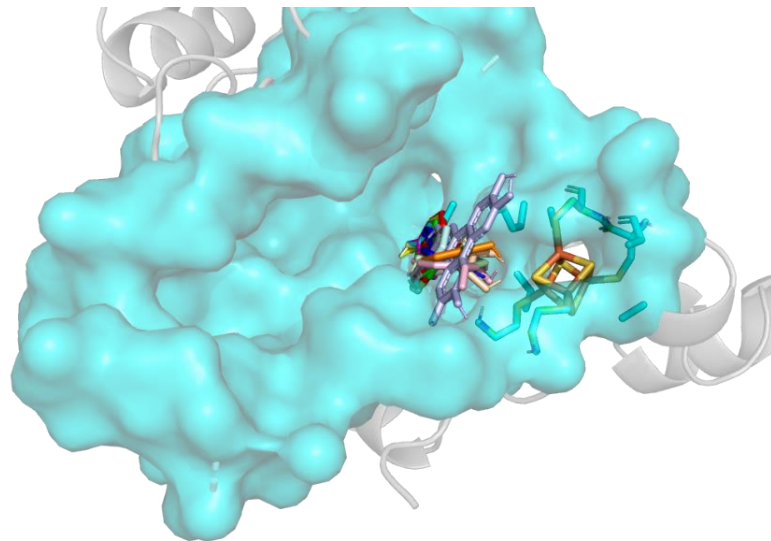
Ligantes	Energia de ligação (Kcal/mol)	# Corrida	Distância ligante-cubo (Å)
1Nap	-4,46	1	6,3
2nap	-4,36	64	6,0
6phe	-3,83	9	4,3
32P	-3,54	64	9,4
34p	-3,38	30	9,2
8hq	-4,37	13	10,5
acri	-3,95	23	5,1
aha	-2,31	85	4,2
cat	-3,19	80	6,3
dhp	-4,78	26	8,2
hhtp	-0,75	99	7,2
hxa	-2,89	39	9,4
mgl	-3,84	19	3,7
pph	-3,62	5	8,4

Figura 16 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 7LHS.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 17 - Cavidade com ligantes 7LHS. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PPH: palecyan)



Fonte: Autoria Própria.

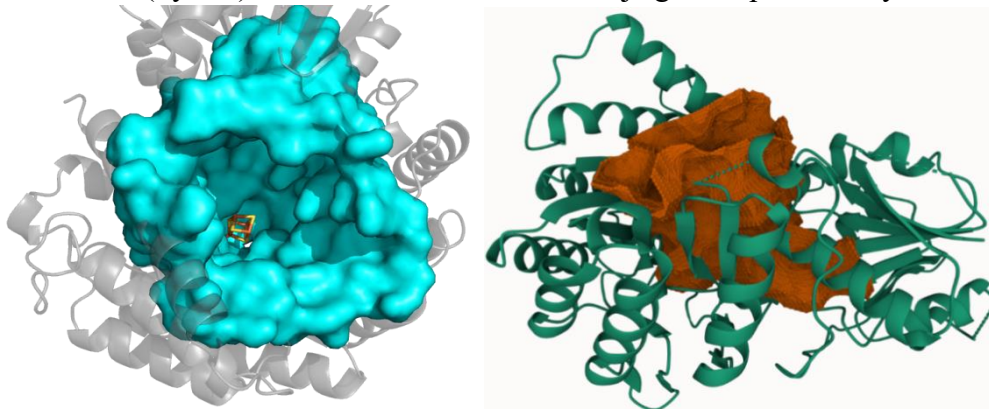
Dessa forma, os dados de *docking* e de DFT convergem para a conclusão de que a ausência de interação direta entre os ligantes e o cubo não decorre de limitações geométricas da cavidade, mas reflete uma restrição eletrônica intrínseca ao sistema, reforçando a baixa reatividade do cubo4cys diante aos ligantes estudados.

4.2.3 Proteína 9CCB

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de coordenação dos ligantes com um cubo3cys, foi selecionada uma proteína que contém, de forma nativa, um cubo3cys, evitando assim modificações artificiais no sistema. Para esse fim, foi utilizada a estrutura cristalográfica de código 9CCB, correspondente a uma transferase de bactérias *Methanothermobacter marburgensis*. A análise de cavidade realizadas com o servidor Cavitylus (Figura 18) indicou a existência de espaço suficiente para acesso ao ferro livre presente no cubo, sugerindo, do ponto de vista geométrico, condições favoráveis para a aproximação dos ligantes.

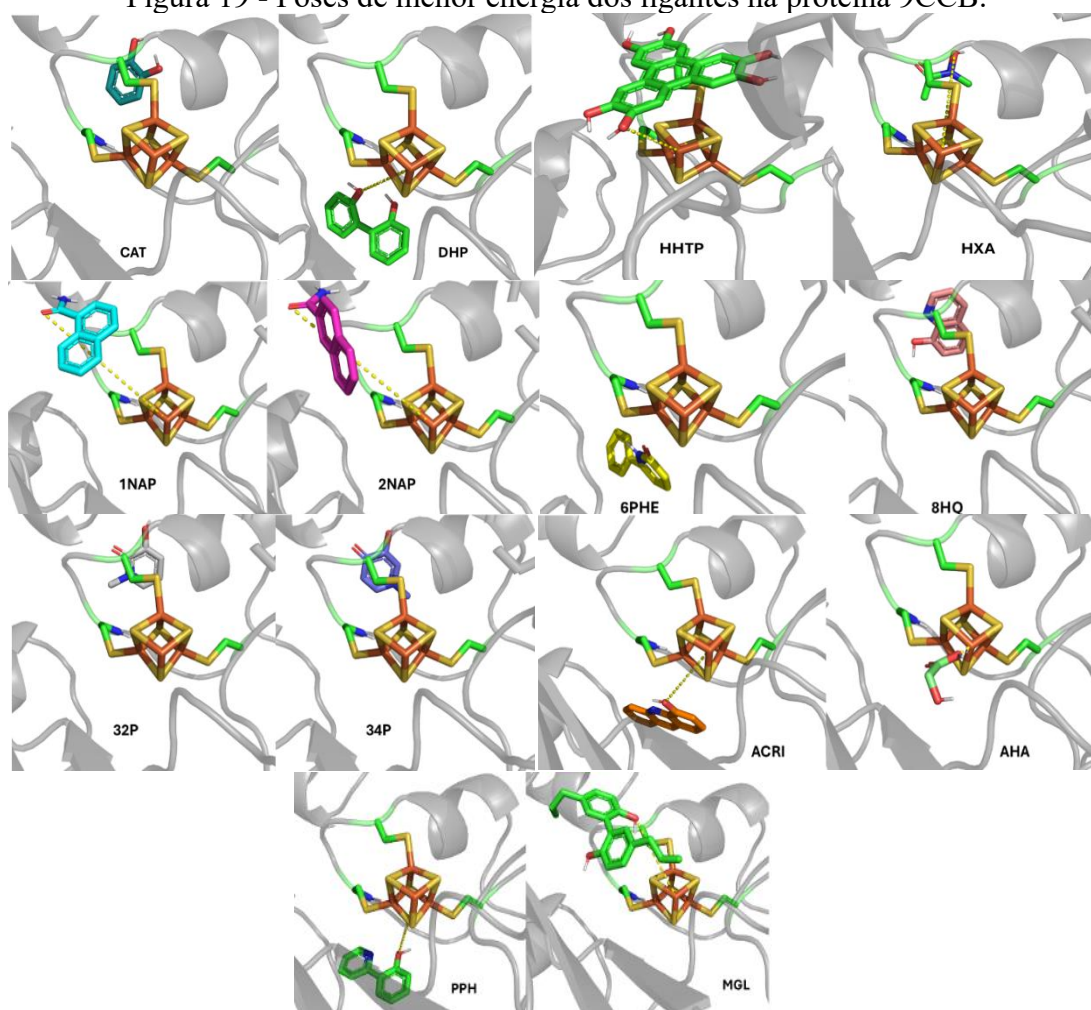
Nos cálculos de *docking* (Figura 19 e Tabela 6), o ligante AHA apresentou o menor valor de energia de ligação (-5,92kcal/mol) e a menor distância em relação ao cubo, de aproximadamente 1,2 Å. Entretanto, observou-se que nem todos os ligantes permanecem acomodados dentro da cavidade, apenas os ligantes 1Nap, 2Nap, AHA, HHTP e MGL apresentam suas poses de menor de energia localizadas dentro da cavidade, enquanto os demais tenderam a se posicionar externamente à proteína, buscando acesso ao cubo a partir da superfície (Figura 20).

Figura 18 - Cavidade 9CCB. À esquerda, superfície em ciano e cubo3cys em destaque (Pymol) e à direita cavidade em laranja gerado pelo CavityPlus



Fonte: Autoria Própria.

Figura 19 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 9CCB.

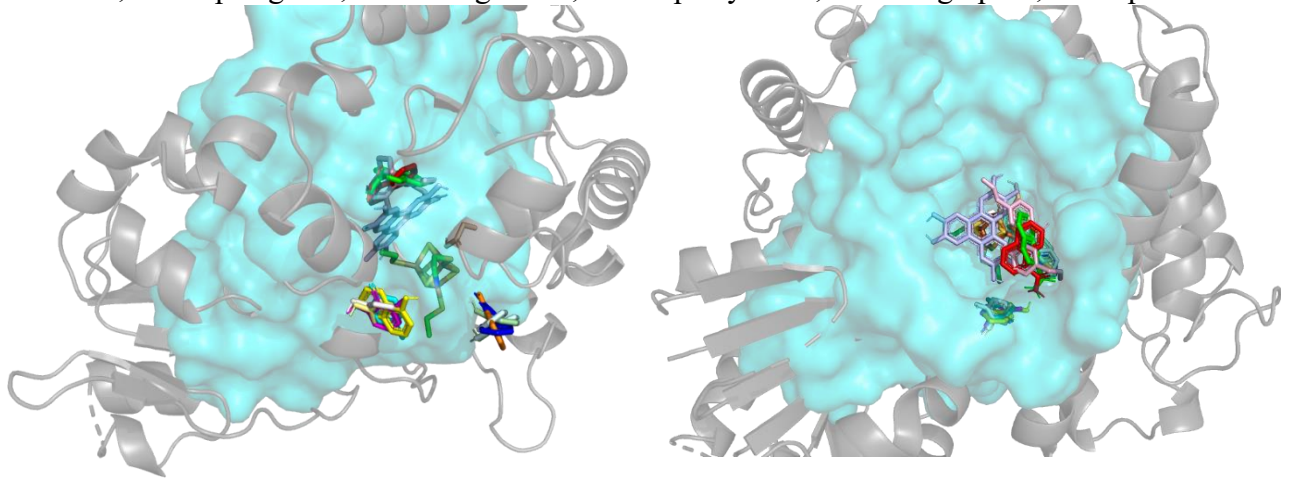


Fonte: Autoria Própria.

Tabela 6 - Docking proteína 9CCB e os ligantes. Foram realizadas 100 corridas

Ligantes	Energia de ligação (Kcal/mol)	# Corrida	Distância ligante-cubo (Å)
1Nap	-4,09	24	10,6
2nap	-4,15	23	10,4
6phe	-4,16	76	7,1
32P	-4,47	17	11,1
34p	-4,18	47	11,0
8hq	-5,04	80	11,1
acri	-4,51	96	7,5
aha	-5,92	50	1,2
cat	-4,3	59	9,3
dhp	-3,94	100	9,7
hhtp	+0,79	56	6,3
hxa	-3,61	44	10,9
mgl	-2,96	40	6,5
pph	-4,18	81	10,0

Figura 20 - Poses de menor energia dos ligantes na proteína 7LHS. (1Nap: vermelho; 1Nap: verde; 6Phe: azul; 8Hq: amarelo; 32P: magenta; 34P: ciano; Acri: laranja; AHA: wheat; Cat: branco; DHP: palegreen; HHTP: lightblue; HXA: paleyellow; MGL: lightpink; PPH: pale



Fonte: Autoria Própria.

Esses resultados, em princípio, contrastam com os dados obtidos nos cálculos de DFT, nos quais a coordenação de alguns ligantes ao cubo₃cys mostrou-se energeticamente favorável. A distância extremamente curta observada para o ligante AHA (1,2 Å), em princípio, não é quimicamente plausível, considerando que comprimentos típicos de ligação Fe-O são em torno de 1,93 Å (Keshari *et al.*, 2021). Esse comportamento parece indicar que o algoritmo de busca do AutoDock é funcional, porém a função de pontuação não descreve adequadamente as interações de curto alcance e a química de coordenação do ferro, favorecendo geometrias artificialmente compactas. A geometria observada reflete limitações inerentes à parametrização do metal no AutoDock.

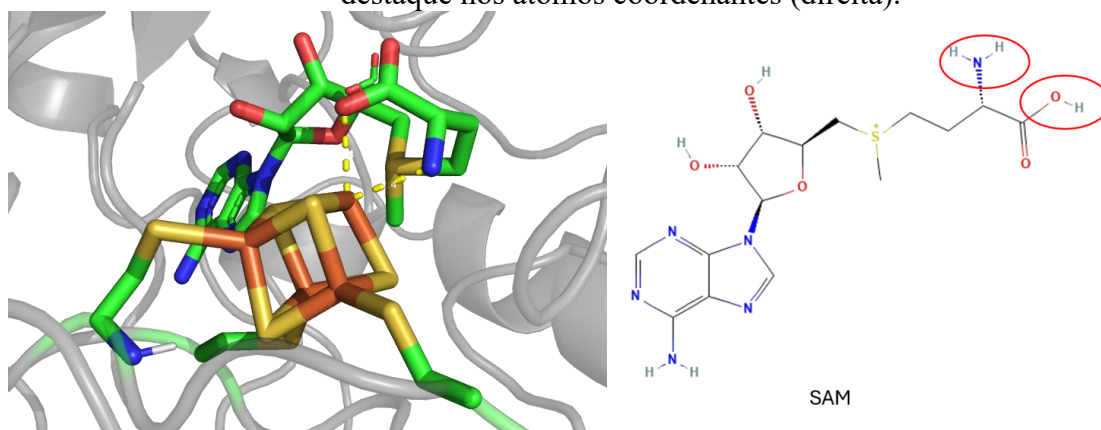
Ainda sobre o ligante AHA, se observou que ele apresentou as menores distâncias Fe-L para os três sistemas estudados, apresentando a maior afinidade ligante-proteína com 9CCB. Embora o valor de energia de ligação obtido por DFT não seja tão negativo (-2,08 kcal/mol) quanto para outros ligantes, AHA foi aquele que apresentou maior capacidade de se aproximar do cubo. Assim, os resultados de *docking* indicaram que, considerando a metodologia adotada, somente o ligante AHA conseguiu se aproximar do cubo, possibilitando uma coordenação que, segundo os resultados de DFT, é favorável. Então, considerando os resultados obtidos até esse ponto, AHA foi o quelante que apresentou maior potencial para inibir enzimas dependentes do cubo pela coordenação de um de seus átomos de ferro, desde que o cubo em questão tenha ao menos um átomo de ferro desimpedido (não coordenado por uma cisteína).

4.2.4 Proteína 4K36

Com o objetivo de avaliar melhor a capacidade dos métodos de *docking* em reproduzir corretamente coordenação metal-ligante, foi escolhido uma proteína que contenha o cluster [4Fe-4S] que tenha um ligante e que tenha sua estrutura cocrystalizada com o ligante no banco de dados PDB, sendo a estrutura 4K36 a escolhida. Nesta proteína, o ligante S-adenosilmetionina (SAM) está coordenado diretamente ao cubo₃cys de forma bidentada por meio de um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, com distâncias de aproximadamente 2,4 Å (Figura 21).

O protocolo mais utilizado para validação de um método, é o *redocking*, que consiste na remoção do ligante cocrystalizado da estrutura experimental e posterior *docking* do mesmo ligante no sítio de ligação, avaliando-se o sucesso pelo RMSD entre a pose prevista e a pose cristalográfica, frequentemente considerando-se valores próximos ou inferiores a 2,0 Å como indicativos de sucesso (Martis; Téletchéa, 2025).

Figura 21 - Ligante SAM no cristal 4K36 (Esquerda), estrutura 2D do ligante SAM com destaque nos átomos coordenantes (direita).

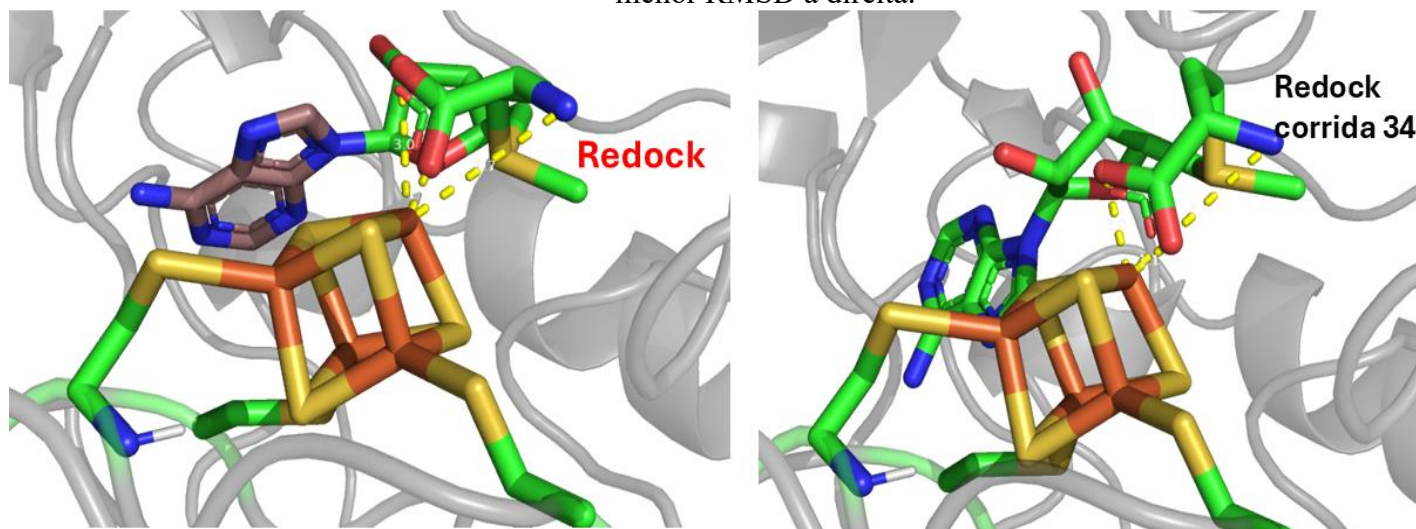


Fonte: Autoria Própria.

O protocolo de *redocking* foi inicialmente aplicado utilizando o programa AutoDock4. A pose de menor energia prevista (-13,81 kcal/mol) apresentou um RMSD de 2,29 Å em relação à estrutura cristalográfica, valor ligeiramente superior ao critério comumente adotado para considerar um *redocking* bem-sucedido e razoavelmente acima da resolução experimental da estrutura (1,62 Å). Além disso, essa pose exibiu distâncias de coordenação distorcidas, caracterizadas por uma ligação Fe-O extremamente curta (1,1 Å) e por um afastamento considerável do átomo de nitrogênio coordenante (3,7 Å), indicando uma descrição inadequada da interação metal-ligante (Figura 22). O *redocking* resultou em seis clusters distintos. A pose que apresentou o menor valor de RMSD foi identificado no segundo cluster, com energia de -13,77 kcal/mol e RMSD de 0,94 Å (corrida 34). No entanto, mesmo na pose que mais se

aproxima da experimental, observou-se novamente uma distância Fe-O de 1,1 Å além de uma aproximação do segundo oxigênio do grupo carboxilato (2,2 Å), enquanto o nitrogênio permaneceu afastado do ferro (3,9 Å) (Figura 22) Esse comportamento é análogo ao observado anteriormente para o ligante AHA no *docking* com 9CCB, sugerindo um padrão recorrente na falha de representação da ligação Fe-O.

Figura 22 - Resultado *redocking* no Autodock 4. Pose de menor energia à esquerda e pose de menor RMSD à direita.

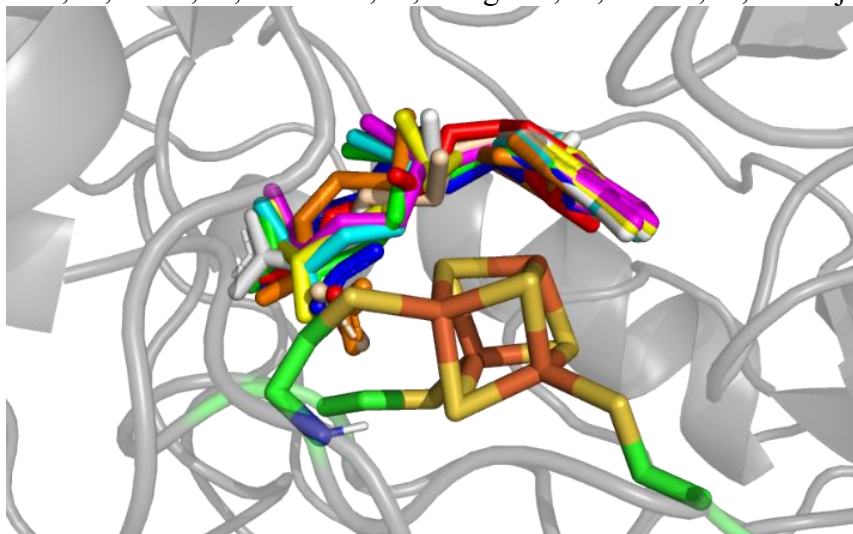


Fonte: Autoria Própria.

A metodologia do AutoDock Bias foi empregada com o objetivo de favorecer a aproximação do ligante ao átomo de ferro ao adicionar pontos de viés com potencial energético. Essa abordagem busca contornar limitações da função de pontuação original do AutoDock4, forçando conformações próximas ao sítio metálico. Ao aplicar o viés, observou-se que as poses de menor energia para todos os ligantes (Tabela 7) passaram a ocupar a mesma região do sítio (Figura 23), independentemente do valor atribuído ao poço energético, o qual foi variado de –2,0 a –10,0 kcal/mol e apresentaram RMSD em relação ao ligante do cristal de aproximadamente 4,0 Å. Entretanto, foram identificados clusters que apresentaram valores de RMSD relativamente baixos, na faixa de 1,2 Å a 1,6 Å, associados a diferenças energéticas da ordem de ~3,0 kcal/mol.

Mesmo nas poses com menor RMSD, a descrição da coordenação ao ferro permaneceu inadequada, caracterizada por distâncias Fe-O próximas de 1,1 Å e pelo afastamento do átomo de nitrogênio, reproduzindo o mesmo padrão observado no *redocking* sem viés. Esses resultados indicam que, embora o AutoDock Bias seja eficaz em direcionar o ligante para a região do sítio metálico, ele não corrige as limitações da função de pontuação na representação da coordenação metal-ligante.

Figura 23 - Resultado *Docking* aplicando Autodock Bias com variação de energia do poço de -2,0 a -10,0 kcal/mol. Poses de menor valor de energia de cada cluster. Onde -2,0 vermelho; -3,0 verde; -4,0 azul; -5,0 amarelo; -6,0 magenta; -7,0 ciano; -8,0 laranja; -9,0



Fonte: Autoria Própria.

Tabela 7 - Resultados do *docking* do ligante SAM na proteína 4K36 aplicando o AutoDock Bias com diferentes energias de viés (poço), raio 1,2 Å, dois pontos de viés tratados como doadores de elétrons.

(continua)				
Energia do poço (kcal/mol)	Energia de ligação (Kcal/mol)	#Cluster	#Corrida	RMSD
-2,0	-25,35	1	27	4,05
	-21,51	2	36	4,76
	-21,22	3	48	1,21
	-21,21	4	28	4,38
	-20,69	5	21	3,70
	-19,12	6	4	3,18
	-16,54	7	7	3,44
-3,0	-24,93	1	19	4,20
	-23,30	2	28	4,44
	-21,85	3	40	1,59
	-21,54	4	49	4,05
	-19,96	5	26	3,17
	-18,70	6	22	3,86
-4,0	-24,79	1	50	4,24
	-23,55	2	46	3,81
	-22,77	3	33	5,40
	-21,47	4	45	1,48
	-21,30	5	43	4,77
	-20,24	6	8	4,27
	-19,93	7	20	2,40

(continua)

Energia do poço (kcal/mol)	Energia de ligação (Kcal/mol)	#Cluster	#Corrida	RMSD
-5,0	-25,31	1	42	4,17
	-23,70	2	37	4,04
	-22,74	3	43	4,44
	-21,91	4	14	1,24
	-21,22	5	41	5,22
	-20,28	6	49	4,43
	-20,04	7	5	2,51
	-19,22	8	48	4,56
-6,0	-25,06	1	15	4,14
	-22,34	2	2	4,46
	-21,96	3	10	5,37
	-21,05	4	37	1,40
	-19,62	5	47	3,77
	-19,48	6	32	2,76
	-18,64	7	44	1,84
	-17,01	8	16	3,68
-7,0	-25,29	1	26	4,13
	-23,33	2	37	4,41
	-21,86	3	19	4,77
	-21,80	4	45	1,39
	-21,40	5	25	3,94
	-21,29	6	13	5,24
	-19,96	7	35	3,87
	-17,08	8	10	3,67
-8,0	-25,70	1	30	3,99
	-22,45	2	41	4,45
	-21,79	3	43	4,70
	-21,17	4	47	1,80
	-20,24	5	48	1,67
	-19,91	6	16	3,82
	-19,14	7	18	3,95
-9,0	-25,36	1	16	4,07
	-21,64	2	9	1,16
	-19,46	3	38	1,89
	-18,76	4	11	3,80
	-17,95	5	6	4,73

				(conclusão)
Energia do poço (kcal/mol)	Energia de ligação (Kcal/mol)	#Cluster	#Corrida	RMSD
-10,0	-25,42	1	33	4,23
	-22,77	2	38	4,30
	-21,61	3	11	3,67
	-21,45	4	16	3,89
	-20,40	5	26	1,60
	-20,03	6	48	3,99
	-18,62	7	18	4,41

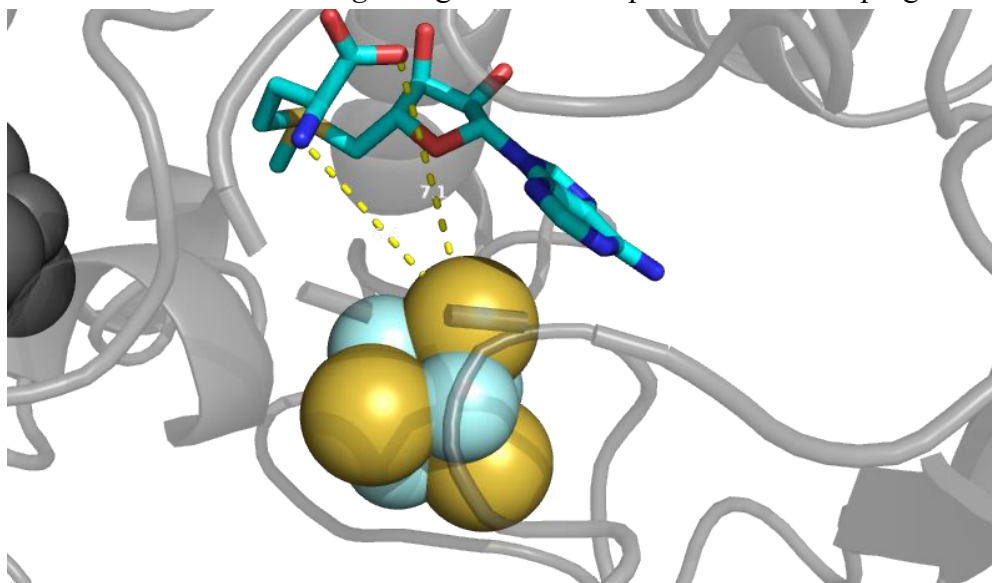
Com o objetivo de aprimorar a descrição de interação metal-ligante, Clemente *et al.*, propuseram uma adaptação do AutoDock Bias especificamente voltada para melaproteínas, denominada *Metall Bias Docking* (MBD). Nessa abordagem, o viés é aplicado utilizando um único ponto médio de atração. A aplicação do MBD no *redocking* do ligante SAM observou-se uma piora na descrição geométrica da coordenação, uma vez que ambos os oxigênios do grupo carboxilato passaram a se aproximar do ferro, com distâncias de aproximadamente 2,2 Å e 1,1 Å, mesmo apresentando um RMSD de 1,58 Å. De acordo com os critérios adotados por Clemente *et al.* no desenvolvimento do MBD, esse resultado seria considerado bem-sucedido, uma vez que o valor de RMSD encontra-se abaixo de 2,0 Å. No entanto, a análise detalhada da orientação dos átomos coordenantes evidencia uma tendência sistemática de direcionamento incorreto da coordenação ao metal, indicando que a avaliação baseada exclusivamente em valores de RMSD pode levar a interpretações equivocadas em sistemas metaloproteicos.

A fim de investigar a influência da atribuição de cargas, foram recalculadas cargas RESP e AM1-BCC para o ligante SAM, seguidas de novos cálculos de *docking*. Os resultados mostraram que a alteração do esquema de cargas não promoveu mudanças qualitativas no modo de coordenação. No caso das cargas AM1-BCC, observou-se uma leve melhora geométrica em algumas poses, com distâncias de ligação Fe-O de 1,2 Å e Fe-N de 2,7 Å, associados à pose de menor RMSD (3,39 Å), embora essa não corresponda à pose de menor energia. A pose energeticamente mais favorável manteve distâncias não condicentes com o cristal (Fe-O = 1,1 Å; Fe-N = 3,8 Å). Para as cargas RESP, as distâncias permaneceram igualmente distorcidas com Fe-O = 1,1 Å e Fe-N = 3,6 Å. A reaplicação do AutoDock Bias com as novas cargas resultou apenas em ajustes finos, na ordem de 0,1 Å na distância Fe-N.

Lee *et al.* ao desenvolver o GalaxyDock2-Heme realizaram comparações entre diversos programas de *docking*, no qual o LeDock apresentou taxas de sucesso superiores em dois dos três conjuntos de amostras analisadas. Esses resultados motivaram a aplicação do LeDock neste

trabalho para realização do *redocking* do ligante SAM na proteína 4K36. Como pode ser visto na Figura 24, o ligante permaneceu bem afastado do cubo, com distâncias Fe-O e Fe-N de 7,1 Å e 6,4 Å, respectivamente, indicando ausência de coordenação ao metal. Apesar de terem sido solicitadas 50 corridas, o programa retornou 36 soluções agrupadas em clusters distintos, com valores de energia de ligação variando de -6,41 a -5,57 kcal/mol. Esses resultados contrastam com o bom resultado do LeDock em sistemas contendo o grupo heme, conforme reportado por Lee *et al.*, e sugerem que, para sistemas contendo cluster [4Fe-4S], a função de pontuação do programa apresenta limitações na descrição das interações metal-ligante. Este comportamento reforça que métodos de *docking* que se mostram eficientes para ferro-heme não necessariamente é aplicado para sistemas ferro-enxofre.

Figura 24 - Resultado do *Redocking* do ligante SAM na proteína 4K36 no programa LeDock.



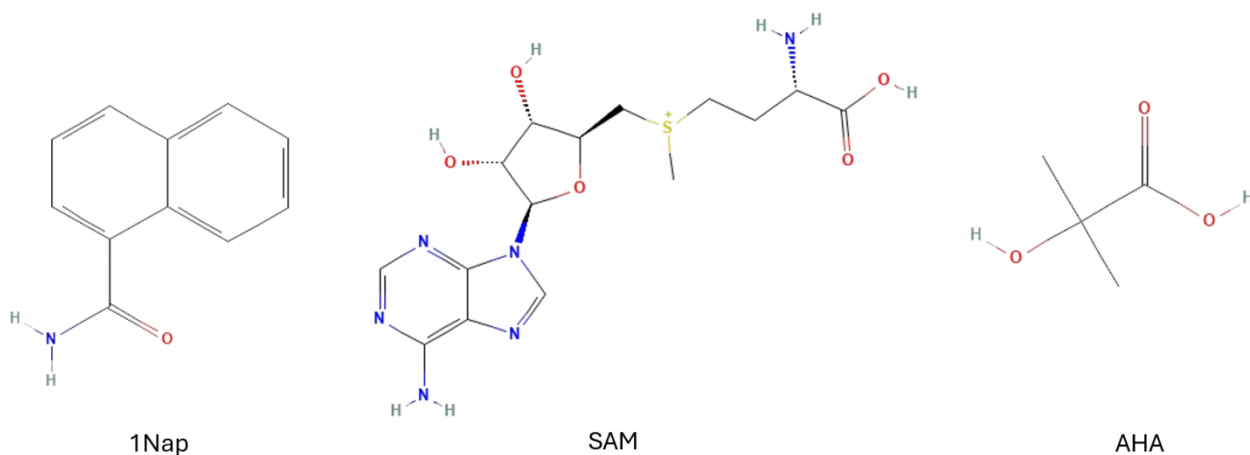
Fonte: Autoria Própria.

De forma conjunta, os resultados obtidos ao longo desta seção evidenciam que, embora os algoritmos de busca empregados nos diferentes programas de *docking* sejam capazes de gerar poses com baixos valores de RMSD, inclusive recuperando orientações globais próximas às estruturas experimentais, a correta descrição das interações metal-ligante em sistemas contendo clusters [4Fe-4S] permanece um desafio significativo. A recorrente observação de geometrias de coordenação quimicamente não plausíveis, como distâncias Fe-O excessivamente curtas e orientações incorretas dos átomos coordenantes, mesmo em poses classificadas como energeticamente favoráveis ou bem-sucedidas segundo critérios tradicionais de RMSD, indica limitações intrínsecas das funções de pontuação utilizadas. Modificações metodológicas, como a aplicação de potenciais de viés (AutoDock Bias e Metall Bias Docking) e o uso de diferentes

esquemas de cargas parciais (RESP e AM1-BCC), mostraram-se insuficientes para corrigir essas distorções, sugerindo que o problema não está associado à etapa de busca conformacional, mas sim à forma como a energia de ligação é avaliada. Assim, os dados apresentados reforçam que, para sistemas metaloproteicos complexos como aqueles que contêm clusters [4Fe-4S], resultados de docking devem ser interpretados com cautela.

Mesmo diante das limitações observadas nos programas de *docking* para representar corretamente a orientação das interações de coordenação, foi possível identificar uma tendência ao analisar os ligantes estudados em comparação com o ligante natural SAM (Figura 25) no sistema contendo cubo3cys. O ligante AHA apresentou os resultados mais favoráveis nos cálculos de *docking*, possivelmente por ser a menor molécula dentre os ligantes avaliados, o que é compatível com a área disponível nas cavidades das proteínas estudadas. Em contraste, os demais ligantes, que apresentam porções aromáticas mais volumosas, tenderam a permanecer afastadas do cubo, provavelmente devido a impedimentos estéricos que dificultam o acesso ao sítio de coordenação do cubo. Dessa forma, uma estratégia para estudos futuros seria a investigação de moléculas que possuam um espaçador entre a porção aromática e a porção quelante, semelhante ao ligante SAM, permitindo uma maior flexibilidade estrutural e potencialmente facilitando o acesso ao átomo de ferro do cluster.

Figura 25: Estruturas 2D dos ligantes 1Nap, SAM e AHA



Fonte: Autoria própria.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizada uma análise crítica do desempenho de métodos de modelagem molecular aplicados a metaloproteínas, com ênfase em sistemas que contêm clusteres [4Fe-4S]

Os resultados dos cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) evidenciaram que a reatividade do cubo depende fortemente de seu estado de coordenação, sendo a coordenação de ligantes a cluster coordenado a quatro resíduos de cisteínas, energeticamente desfavorável para todos os ligantes estudados, enquanto modelos com um ferro livre, ou seja, o cluster coordenado a apenas três resíduos de aminoácidos, apresentam maior propensão à interação para alguns ligantes, como 1nap, 6phe, 32P, 34P, Acri, AHA, HXA, MGL e Cat, sendo o 32P que apresentou menor energia de ligação, sendo o mais favorável.

Resultados de *docking*, a princípio, mostraram concordância com os resultados de DFT, uma vez que os ligantes não se aproximaram do cubo4cys nas proteínas 2GOY e 7LHS, mesmo esta última tendo espaço em sua cavidade para a aproximação dos ligantes, diferentemente da proteína 2GOY em que o cubo está enterrado dentro da proteína. Entretanto, para a proteína 9CCB, em que há espaço em sua cavidade e o cubo tendo um Fe livre para a coordenação, os ligantes permaneceram afastado do cubo, sendo somente o ligante AHA se aproximando, porém de forma extrema, tendo uma distância Fe-O de 1,1 Å. O ligante AHA, foi o que apresentou menor distância em relação ao cubo para os três sistemas estudados, mesmo não apresentando o menor valor de energia de ligação calculado por DFT.

A análise da proteína 4K36, que contém o ligante natural SAM coordenado ao cluster [4Fe-4S], permitiu avaliar a capacidade dos métodos de *docking* em reproduzir um modo de coordenação metal-ligante experimentalmente conhecido. Os resultados de *redocking* indicaram que os algoritmos de busca foram capazes de gerar poses com valores de RMSD inferiores a 2,0 Å, atendendo aos critérios tradicionalmente adotados para validação de protocolos de *redocking*. Entretanto, mesmo nas poses de menor RMSD, a descrição da coordenação mostrou-se inadequada, caracterizada por distâncias Fe-O curtas e pelo afastamento do átomo de nitrogênio, que diferem da geometria observada experimentalmente. A aplicação de estratégias de viés, como AutoDock Bias e Metall Bias Docking, bem como a utilização de diferentes esquemas de atribuição de cargas (RESP e AM1-BCC), não foi suficiente para corrigir distorções, resultando, em alguns casos, no favorecimento de geometrias ainda mais distantes do cristal, com a aproximação simultânea de ambos os oxigênios carboxilato ao ferro.

De forma geral, os resultados obtidos demonstram que, embora os métodos de *docking* empregados sejam capazes de reproduzir poses geometricamente próximas às estruturas experimentais, as funções de pontuação falham em descrever adequadamente a química de coordenação em sistemas contendo clusteres [4Fe-4S]. Assim, conclui-se que as principais limitações observadas não estão associadas à etapa de busca conformacional, mas à avaliação energética das poses, reforçando que o uso de *docking* molecular clássico em metaloproteínas deve ser realizado com cautela e preferencialmente integrado a métodos que considerem explicitamente os efeitos eletrônicos envolvidos na interação metal-ligante.

REFERÊNCIAS

ADELUSI, Temitope Isaac *et al.* Molecular modeling in drug discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100880, 2022.

AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 17 ago. 2023.

ANDREINI, Claudia; ROSATO, Antonio. Structural Bioinformatics and Deep Learning of Metalloproteins: Recent Advances and Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7684, 12 jul. 2022.

ANZELLOTTI, A. I.; FARRELL, N. P. Zinc metalloproteins as medicinal targets. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1629, 2008.

ARCON, Juan Pablo *et al.* AutoDock Bias: improving binding mode prediction and virtual screening using known protein–ligand interactions. **Bioinformatics**, v. 35, n. 19, p. 3836–3838, 1 out. 2019.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098–3100, 1 set. 1988.

BEINERT, Helmut; HOLM, Richard H.; MÜNCK, Eckard. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. **Science**, v. 277, n. 5326, p. 653–659, ago. 1997.

BERNARDI, Austen *et al.* ACPYPE update for nonuniform 1–4 scale factors: Conversion of the GLYCAM06 force field from AMBER to GROMACS. **SoftwareX**, v. 10, p. 100241, jul. 2019.

BESLER, Brent H.; MERZ, Kenneth M.; KOLLMAN, Peter A. Atomic charges derived from semiempirical methods. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 431–439, 7 maio 1990.

BOWMAN, Sarah E. J.; BREN, Kara L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 6, p. 1118, 2008.

BROWN, Alexandra C.; SUESS, Daniel L. M. An Open-Cuboidal [Fe₃S₄] Cluster Characterized in Both Biologically Relevant Redox States. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 4, p. 2075–2080, 1 fev. 2023.

BUELOW, Alexander A. *et al.* Inhibition of CYP450 pathways reduces functional sympatholysis in healthy young adults. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 328, n. 6, p. R642–R650, 1 jun. 2025.

BURSCH, Markus *et al.* **Best Practice DFT Protocols for Basic Molecular Computational Chemistry**. , 20 abr. 2022.

CARVALHO, Alexandra T. P.; SWART, Marcel. Electronic Structure Investigation and Parametrization of Biologically Relevant Iron–Sulfur Clusters. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 2, p. 613–620, 24 fev. 2014.

CARVALHO, Alexandra T. P.; SWART, Marcel. Correction for Electronic Structure Investigation and Parametrization of Biologically Relevant Iron–Sulfur Clusters. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 7, p. 1508–1508, 27 jul. 2015.

CASALINO, Lorenzo *et al.* Who Activates the Nucleophile in Ribozyme Catalysis? An Answer from the Splicing Mechanism of Group II Introns. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 33, p. 10374–10377, 24 ago. 2016.

CASALINO, Lorenzo *et al.* Catalytic Mechanism of Non-Target DNA Cleavage in CRISPR-Cas9 Revealed by *Ab Initio* Molecular Dynamics. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 22, p. 13596–13605, 20 nov. 2020.

CHALKLEY, Matthew J.; MANN, Samuel I.; DEGRADO, William F. De novo metalloprotein design. **Nature Reviews Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 31–50, 6 dez. 2021.

CHARTRON, Justin *et al.* Substrate Recognition, Protein Dynamics, and Iron-Sulfur Cluster in *Pseudomonas aeruginosa* Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, n. 2, p. 152–169, nov. 2006.

CHUNG, Jung-Sung; KIM, Sung-Kun; LEUSTEK, Thomas. The Effect of Conserved Histidine on the Proximity of Fe-S Clusters in Adenosine-5'-Phosphosulfate Reductases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Enteromorpha intestinalis*. **Microbiology Research**, v. 15, n. 2, p. 457–467, 30 mar. 2024.

CLEMENTE, Camila M.; PRIETO, Juan M.; MARTÍ, Marcelo. Unlocking Precision Docking for Metalloproteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 64, n. 5, p. 1581–1592, 11 mar. 2024.

COHEN, Aron J.; MORI-SÁNCHEZ, Paula; YANG, Weitao. Challenges for Density Functional Theory. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 1, p. 289–320, 11 jan. 2012.

DA SILVA, Talis Uelisson *et al.* Development of parameters compatible with the CHARMM36 force field for $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ clusters and molecular dynamics simulations of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in GROMACS 2019. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 8, p. 3481–3491, 24 maio 2022.

DA SILVA, Talis Uelisson *et al.* Molecular dynamics simulations of aqueous systems of inhibitor candidates for adenosine-5'-phosphosulfate reductase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 6, p. 2466–2477, 13 abr. 2023.

DE RUYCK, Jerome *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. Volume 9, p. 1–11, jun. 2016.

DEHABADI, Maryam Haji; IRANI, Mehdi; RYDE, Ulf. Predicting Reduction Potentials of Blue Copper Proteins Using Quantum Mechanical Calculations. **Inorganic Chemistry**, v. 64, n. 8, p. 3917–3929, 3 mar. 2025.

D'HARDEMARÉ, Amaury du Moulinet *et al.* Design of Iron chelators: Syntheses and iron (III) complexing abilities of tripodal tris-bidentate ligands. **BioMetals**, v. 19, n. 4, p. 349–366, ago. 2006.

DIXIT, Himisha; KULHARIA, Mahesh; VERMA, Shailender Kumar. Metalloproteome of human-infective RNA viruses: a study towards understanding the role of metal ions in virology. **Pathogens and Disease**, v. 81, 17 jan. 2023.

DOS SANTOS, Elias Silva *et al.* Novel potential inhibitors for adenylylsulfate reductase to control souring of water in oil industries. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, n. 11, p. 1780–1792, 2 nov. 2014.

DOS SANTOS, Elias Silva *et al.* Souring control in fluid samples of oil industry using a multiple ligand simultaneous docking (MLSD) strategy. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 6, p. 1176–1184, 3 jun. 2015.

DUARTE, Hélio Anderson. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 501–508, ago. 2001.

EGOZI, Shany; AST, Tslil. Rust and redemption: iron–sulfur clusters and oxygen in human disease and health. **Metallomics**, v. 17, n. 7, 9 jul. 2025.

FARHAN, Lubna Khalid; KHUDER, Huda Yassien. Bioinorganic Chemistry of Metalloproteins: Structure, Function, and Biomedical Implications. **European Journal of Medical and Health Research**, v. 3, n. 4, p. 195–214, 6 ago. 2025.

FELICIANO, Patricia R.; CARROLL, Kate S.; DRENNAN, Catherine L. Crystal Structure of the [4Fe–4S] Cluster-Containing Adenosine-5'-phosphosulfate Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Omega**, v. 6, n. 21, p. 13756–13765, 1 jun. 2021.

FONTECAVE, Marc. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 171–174, abr. 2006.

GILAD, Yocheved; SENDEROWITZ, Hanoach. Docking Studies on DNA Intercalators. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 1, p. 96–107, 27 jan. 2014.

GODBOUT, Nathalie *et al.* Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 560–571, 1 fev. 1992.

GOLDMAN, Peter J. *et al.* X-ray structure of an AdoMet radical activase reveals an anaerobic solution for formylglycine posttranslational modification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8519–8524, 21 maio 2013.

GRIMME, Stefan; SCHREINER, Peter R. Computational Chemistry: The Fate of Current Methods and Future Challenges. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 16, p. 4170–4176, 9 abr. 2018.

GUENGERICH, F. Peter. Introduction: Metals in Biology: α -Ketoglutarate/Iron-Dependent Dioxygenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 34, p. 20700–20701, ago. 2015.

GUPTA, Pramodkumar Pyarelal; KASMI, Yassine; PODLIPNIK, Ārtomir. Introduction to Computational and Bioinformatics Tools in Virology. *In: Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 121–145.

HANWELL, Marcus D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HARUN, Kausar *et al.* DFT + U calculations for electronic, structural, and optical properties of ZnO wurtzite structure: A review. **Results in Physics**, v. 16, p. 102829, mar. 2020.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 9 nov. 1964.

HOLM, Richard H.; KENNEPOHL, Pierre; SOLOMON, Edward I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2239–2314, 1 jan. 1996.

HUANG, Sheng-You; GRINTER, Sam Z.; ZOU, Xiaoqin. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899, 2010.

IMAN HASSAN IBRAHIM. Metalloproteins and metalloproteomics in health and disease. *In*: DONEV, Rossen (Org.). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. 1. ed. [S.l.]: Zoe Kruze, 2024. v. 141 p. 123–176.

JAFARI, Sonia; RYDE, Ulf; IRANI, Mehdi. Two local minima for structures of [4Fe–4S] clusters obtained with density functional theory methods. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 10832, 4 jul. 2023.

JAKALIAN, Araz; JACK, David B.; BAYLY, Christopher I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1623–1641, 18 dez. 2002.

JASNIEWSKI, Andrew J.; QUE, Lawrence. Dioxygen Activation by Nonheme Diiron Enzymes: Diverse Dioxygen Adducts, High-Valent Intermediates, and Related Model Complexes. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 5, p. 2554–2592, 14 mar. 2018.

JOMOVA, Klaudia *et al.* Essential metals in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 367, p. 110173, nov. 2022.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KAL, Subhasree; XU, Shuangning; QUE, Lawrence. Bio-inspired Nonheme Iron Oxidation Catalysis: Involvement of Oxoiron(V) Oxidants in Cleaving Strong C–H Bonds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 19, p. 7332–7349, 4 maio 2020.

KASSA, Tigist *et al.* Differential heme release from various hemoglobin redox states and the upregulation of cellular heme oxygenase-1. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 9, p. 876–884, 8 set. 2016.

KESHARI, Kritika *et al.* Characterization and reactivity study of non-heme high-valent iron–hydroxo complexes. **Chemical Science**, v. 12, n. 12, p. 4418–4424, 2021.

KIM, Youngsuk; SRIDHARAN, Arun; SUESS, Daniel L. M. The Elusive Mononitrosylated [Fe₄S₄] Cluster in Three Redox States. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 61, n. 47, 21 nov. 2022.

KLEIN, Andreas S.; ZEYMER, Cathleen. Design and engineering of artificial metalloproteins: from *de novo* metal coordination to catalysis. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 34, 15 fev. 2021.

KOEBKE, Karl J. *et al.* Catalysis and Electron Transfer in *De Novo* Designed Metalloproteins. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 14, p. 12046–12109, 27 jul. 2022.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 15 nov. 1965.

KRAMER, Christian; GEDECK, Peter. Global Free Energy Scoring Functions Based on Distance-Dependent Atom-Type Pair Descriptors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 707–720, 28 mar. 2011.

KRETSINGER, Robert H.; UVERSKY, Vladimir N.; PERMYAKOV, Eugene A. (ORGS.). **Encyclopedia of Metalloproteins**. New York, NY: Springer New York, 2013.

KRIVÁK, Radoslav; HOKSZA, David. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, p. 39, 14 dez. 2018.

LEE, Changsoo *et al.* GalaxyDock2-HEME : Protein–ligand docking for heme proteins. **Journal of Computational Chemistry**, v. 44, n. 14, p. 1369–1380, 30 maio 2023.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

MAKKAR, Priyanka; GHOSH, Narendra Nath. A review on the use of DFT for the prediction of the properties of nanomaterials. **RSC Advances**, v. 11, n. 45, p. 27897–27924, 2021.

MARTIS, Elvis A. F.; TÉLETCHÉA, Stéphane. Ten quick tips to perform meaningful and reproducible molecular docking calculations. **PLOS Computational Biology**, v. 21, n. 5, p. e1013030, 9 maio 2025.

MOLLAN, Todd L.; ALAYASH, Abdu I. Redox Reactions of Hemoglobin: Mechanisms of Toxicity and Control. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 17, p. 2251–2253, 10 jun. 2013.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 27 dez. 2009.

NOODLEMAN, Louis. Fe₄S₄ clusters as small molecule catalysts. **Nature Catalysis**, v. 1, n. 6, p. 383–384, 12 jun. 2018.

PARITALA, Hanumantharao; SUZUKI, Yuta; CARROLL, Kate S. Design, Synthesis and Evaluation of Fe-S Targeted Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase Inhibitors. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 34, n. 3, p. 199–220, 4 mar. 2015.

PETRONEK, Michael S.; SPITZ, Douglas R.; ALLEN, Bryan G. Iron–Sulfur Cluster Biogenesis as a Critical Target in Cancer. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1458, 14 set. 2021.

RODRIGUEZ CARRERO, Roy J. *et al.* Genetic and biochemical characterization of a radical SAM enzyme required for post-translational glutamine methylation of methyl-coenzyme M reductase. **mBio**, v. 16, n. 2, 5 fev. 2025.

SANTAMARIA, Anna M.; ROUAULT, Tracey A. Regulatory and Sensing Iron–Sulfur Clusters: New Insights and Unanswered Questions. **Inorganics**, v. 12, n. 4, p. 101, 30 mar. 2024.

SCIORTINO, Giuseppe *et al.* Prediction of the interaction of metallic moieties with proteins: An update for protein-ligand docking techniques. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 42–51, 5 jan. 2018.

SHI, Ruifeng *et al.* Biogenesis of Iron–Sulfur Clusters and Their Role in DNA Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 30 set. 2021.

SINGH, U. Chandra; KOLLMAN, Peter A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 129–145, 7 abr. 1984.

SOSA, Carlos *et al.* A local density functional study of the structure and vibrational frequencies of molecular transition-metal compounds. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 16, p. 6630–6636, 1 ago. 1992.

STIEBRITZ, Martin T.; HU, Yilin. Computational Methods for Modeling Metalloproteins. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 245–266.

TAO, Jianmin *et al.* Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta–Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 14, p. 146401, 30 set. 2003.

TZELIOU, Christina Eleftheria; MERMIGKI, Markella Alik; TZELI, Demeter. Review on the QM/MM Methodologies and Their Application to Metalloproteins. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2660, 20 abr. 2022.

U. SILVA, Talis *et al.* Challenging Dissimilatory Adenosine 5'-Phosphosulfate (APS) Reductase with Assimilatory APS Reductase Inhibitors by Docking and Molecular Dynamics Simulations: A Computational Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2025.

UVERSKY, Vladimir N.; FERREIRA, Gloria C. Flexible iron: disorder in the ironome brings order to protein structure and function. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 12, 30 maio 2025.

VALLIÈRES, Cindy *et al.* Iron-sulfur protein odyssey: exploring their cluster functional versatility and challenging identification. **Metalomics**, v. 16, n. 5, 2 maio 2024.

VERNIS, Laurence *et al.* Fe-S Clusters Emerging as Targets of Therapeutic Drugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, 28 jan. 2017.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200–1211, 1 ago. 1980.

VOSS, Moritz; HONDA MALCA, Sumire; BULLER, Rebecca. Exploring the Biocatalytic Potential of Fe/ α -Ketoglutarate-Dependent Halogenases. **Chemistry – A European Journal**, v. 26, n. 33, p. 7336–7345, 10 jun. 2020.

WANT, Kristian *et al.* Cross-regulation of [2Fe–2S] cluster synthesis by ferredoxin-2 and frataxin. **Nature**, v. 649, n. 8097, p. 721–728, 15 jan. 2026.

WASER, Valerie; WARD, Thomas R. Aqueous stability and redox chemistry of synthetic [Fe₄S₄] clusters. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 495, p. 215377, nov. 2023.

XU, Youjun *et al.* CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W374–W379, 2 jul. 2018.

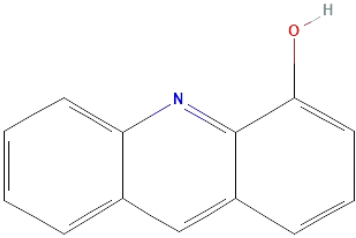
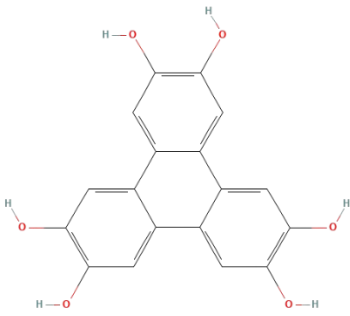
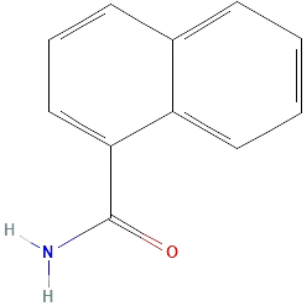
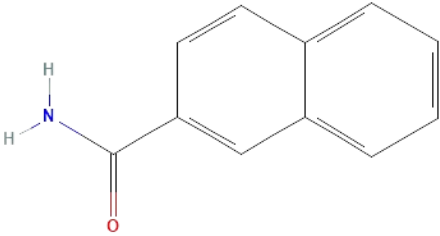
YUAN, Yaxia; PEI, Jianfeng; LAI, Luhua. Binding Site Detection and Druggability Prediction of Protein Targets for Structure- Based Drug Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 12, p. 2326–2333, 1 fev. 2013.

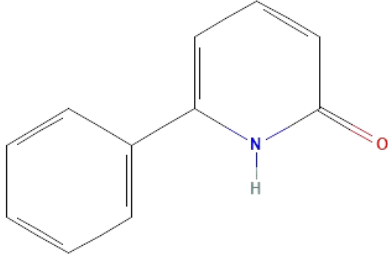
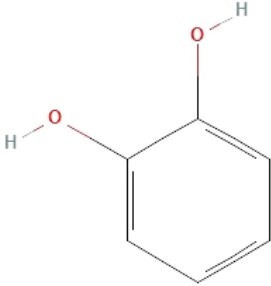
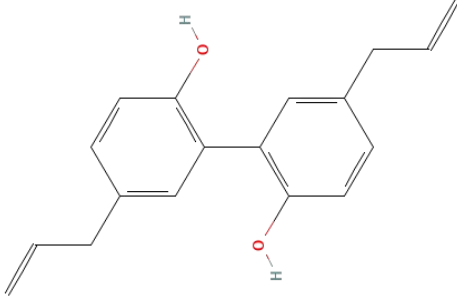
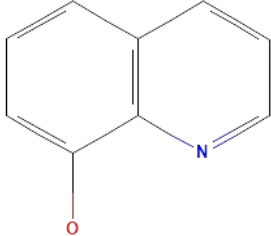
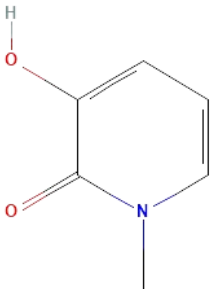
ZHAO, Hongtao; CAFLISCH, Amedeo. Discovery of ZAP70 inhibitors by high-throughput docking into a conformation of its kinase domain generated by molecular dynamics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5721–5726, out. 2013.

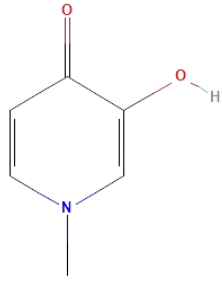
The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Estruturas bidimensionais dos ligantes estudadas com o código correspondente do PubChem e a massa molar.

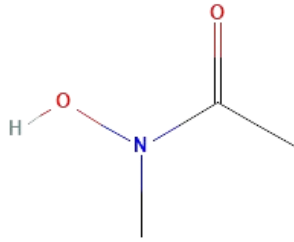
Nome	Estrutura Bidimensional	Cod. Pubchem	Massa molar (g/mol)
Acridin-4-ol		87462	195,22
HHTP		11088610	324,3
1-Naphthamide		75244	171,19
2-Naphthamide		75245	171,19

6-Phenyl- 2pyridone		87889	171,19
Catecol		289	110,11
Magnolol		72300	266,3
8- hydroxyquinoline (8-HQ)		609983	283,4
32P		88026	125,13

34P

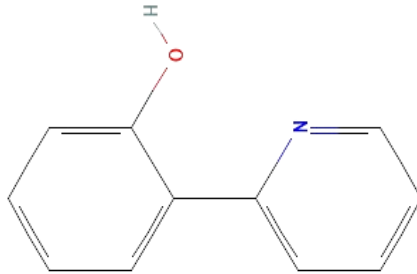
3084936

125,13

HXA

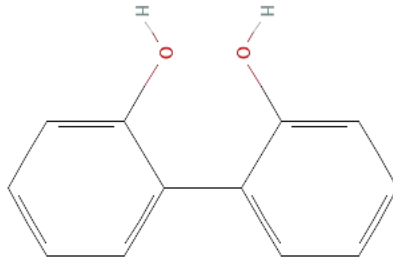
25713

89,09

PPH

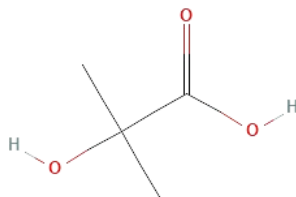
135489221

171,19

DHP

15731

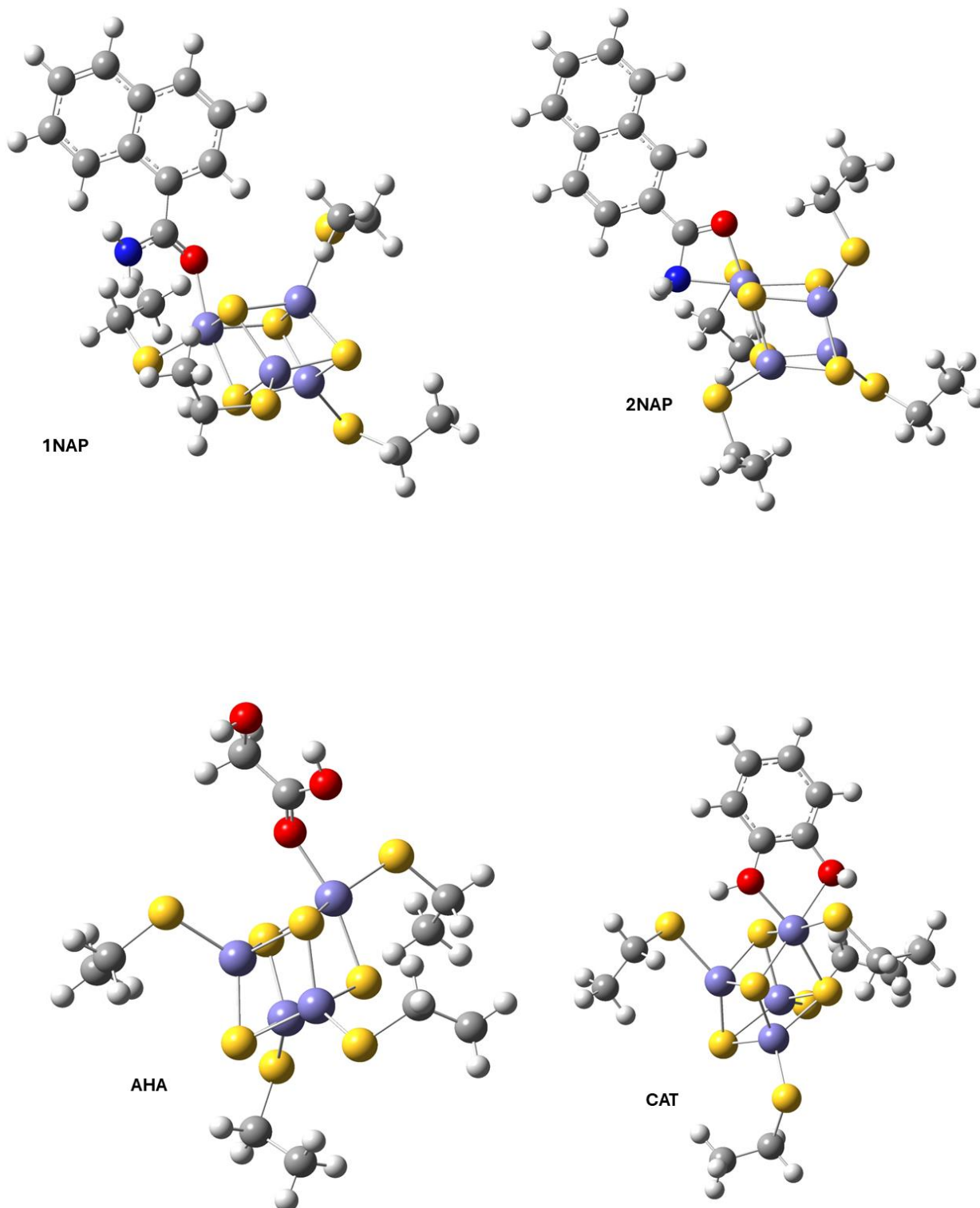
186,21

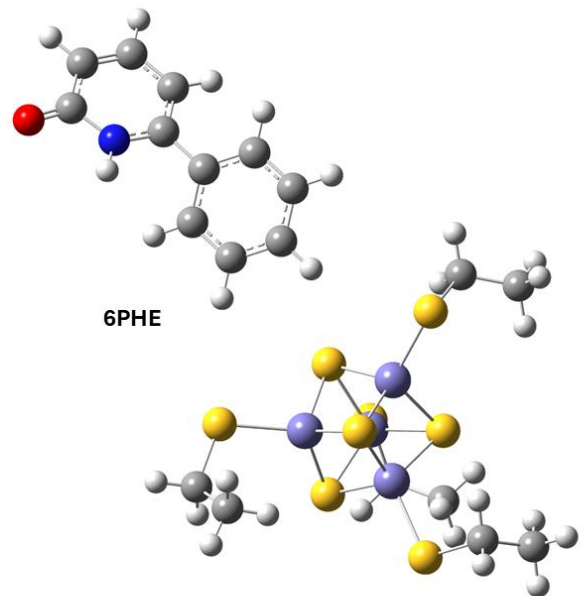
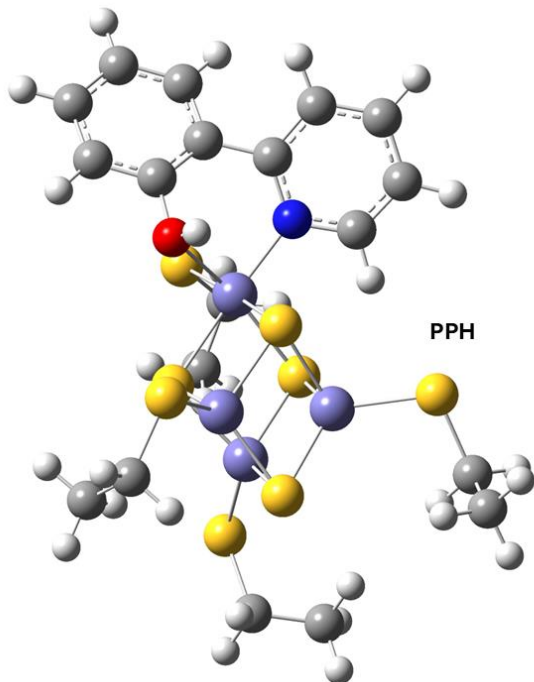
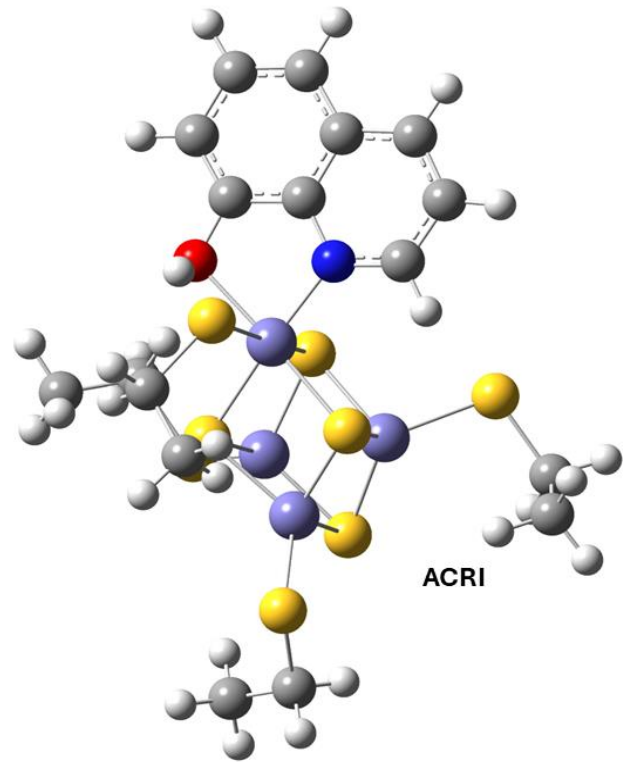
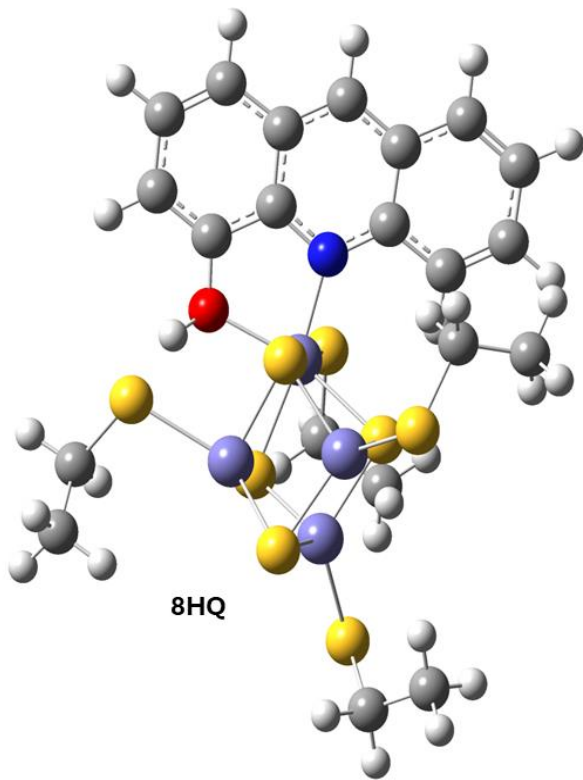
AHA

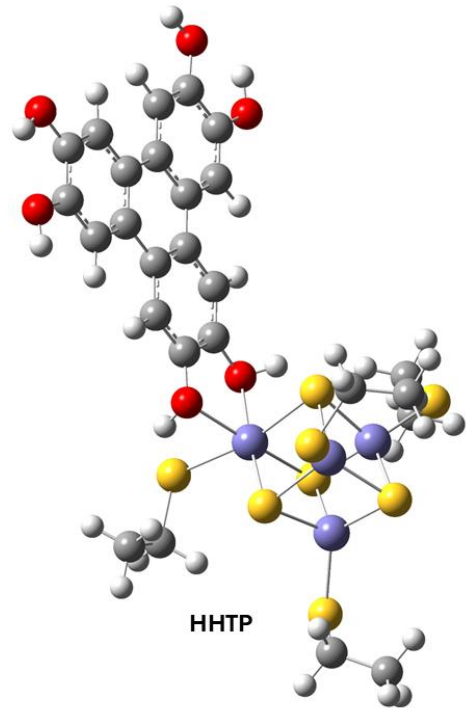
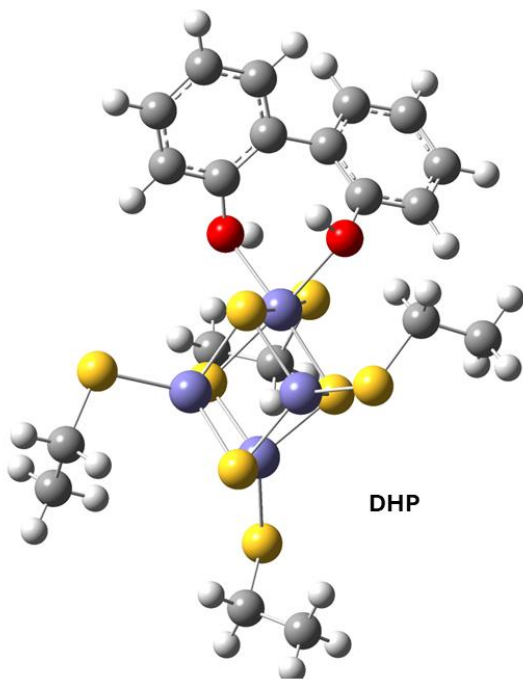
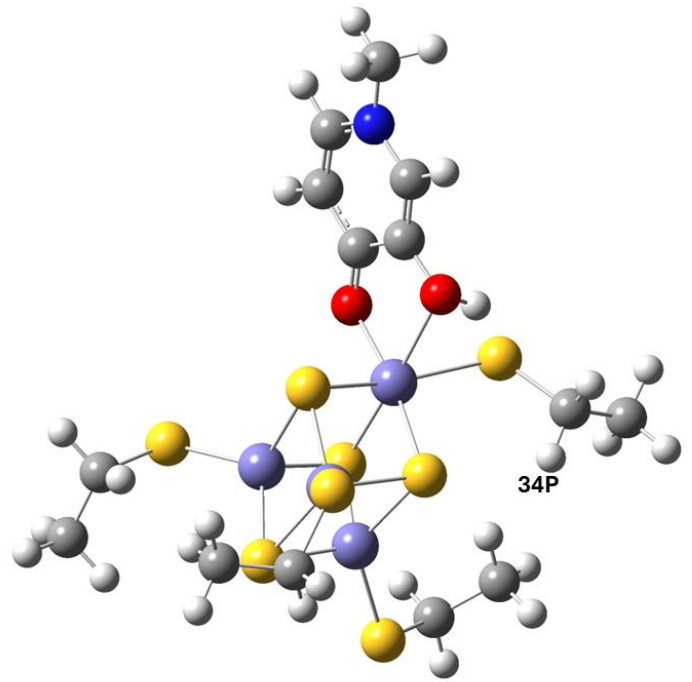
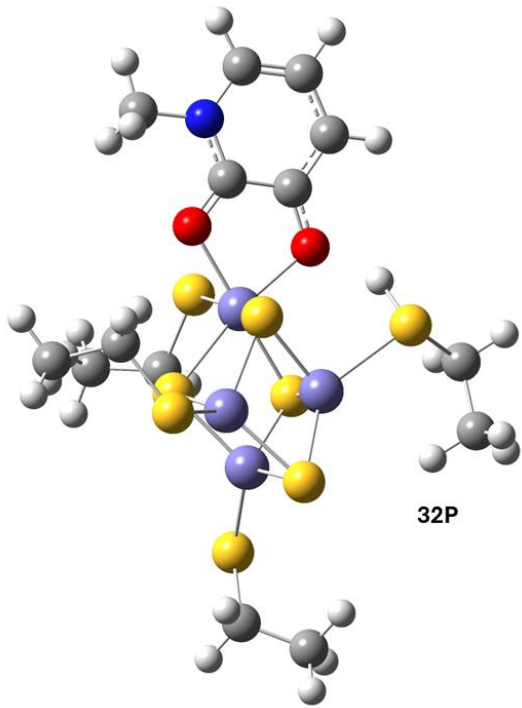
11671

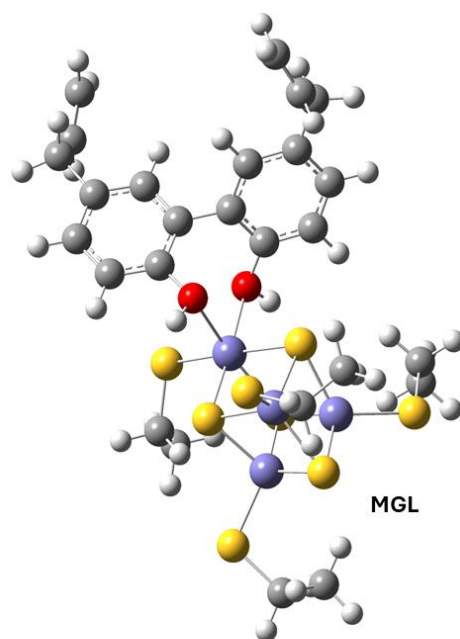
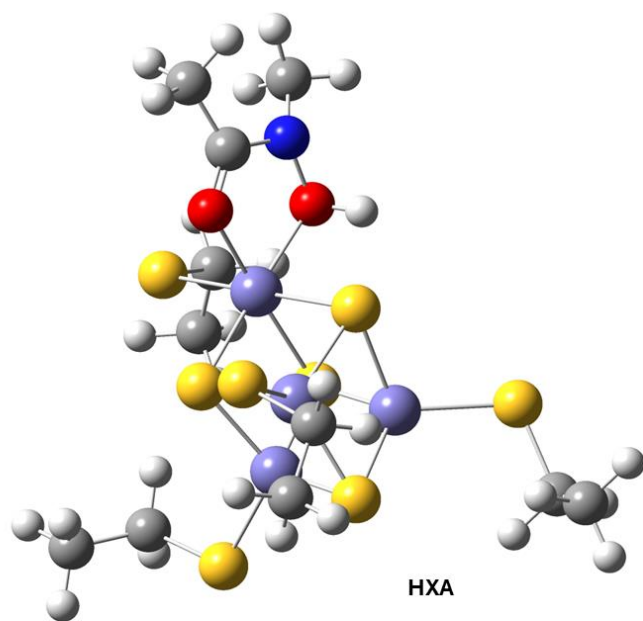
104,10

APÊNDICE B – Estruturas otimizadas dos complexos Cubo4Cys-L calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil-éter. Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.









APÊNDICE C – Energias calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil éter dos ligantes puros, cluster com 4 cisteínas e complexos com os ligantes. Onde “cubo” = $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2-}$ e “Cys” = $(\text{SCH}_2\text{CH}_3)$.

Ligantes	Energia (Kcal/mol)
1Nap	-554,7711246
2nap	-554,7744003
6phe	-554,7585731
32P	-438,1929827
34p	-438,1787931
8hq	-477,3516802
acri	-630,9853478
aha	-382,574638
cat	-382,8150606
dhp	-613,9612575
hhtp	-1144,85661
hxa	-323,7998074
mgl	-847,4172262
pph	-554,7993916
Cubo4Cys	-8558,200071
Cubo4Cys-1nap	-9112,957362
Cubo4Cys-2Nap	-9112,940553
Cubo4Cys-6Phe	-9112,963412
Cubo4Cys-32P	-8996,388712
Cubo4Cys-34P	-8996,370799
Cubo4Cys-8HQ	-9035,511391
Cubo4Cys-Acri	-9189,18809
Cubo4Cys-AHA	-8862,572901
Cubo4Cys-Cat	-8940,999571
Cubo4Cys-DHP	-9172,113497
Cubo4Cys-HHTP	-9703,024754
Cubo4Cys-HXA	-8881,979376
Cubo4Cys-MGL	-9405,594221
Cubo4Cys-PPH	-9112,923241

APÊNDICE D – Energias calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil éter para o Cubo3Cys e os complexos do Cubo3Cys com os ligantes estudados.

Ligantes	Energia (Kcal/mol)
Cubo3Cys	-8558,200071
Cubo3Cys-1nap	-9112,957362
Cubo3Cys-2Nap	-9112,940553
Cubo3Cys-6Phe	-9112,963412
Cubo3Cys-32P	-8996,388712
Cubo3Cys-34P	-8996,370799
Cubo3Cys-8HQ	-9035,511391
Cubo3Cys-Acri	-9189,18809
Cubo3Cys-AHA	-8862,572901
Cubo3Cys-Cat	-8940,999571
Cubo3Cys-DHP	-9172,113497
Cubo3Cys-HHTP	-9703,024754
Cubo3Cys-HXA	-8881,979376
Cubo3Cys-MGL	-9405,594221
Cubo3Cys-PPH	-9112,923241

APÊNDICE E - Estruturas otimizadas dos complexos Cubo3Cys-L calculadas por DFT (TPSS/DGDZVP) com solvente dietil-éter. Esferas cinzas: carbono; vermelha: oxigênio; azul: nitrogênio; amarela: enxofre; lilás: ferro; branca: hidrogênio.

