



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

***MODELAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO ELETRÔNICA DE OLIGOPEPTÍDEOS E NA
DESCRIÇÃO QUÂNTICA DA INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR***

NATAL/RN

2012

JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

***MODELAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO ELETRÔNICA DE OLIGOPEPTÍDEOS E NA
DESCRIÇÃO QUÂNTICA DA INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Estrutural e Funcional, linha de pesquisa em Biofísica.

Orientador: Prof. Dr. Umberto Laino Fulco

Co-orientador: Prof. Dr. Eudenilson Lins Albuquerque

NATAL/RN

2012

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Oliveira Jonas Ivan Nobre.

Modelagem molecular na caracterização eletrônica de oligopeptídeos e na descrição quântica da interação fármaco-receptor / Jonas Ivan Nobre Oliveira. – Natal, RN, 2012.

121 f. : Il.

Orientador: Prof. Dr. Umberto Laino Fulco.

Coorientador: Prof. Dr. Eudenilson Lins Albuquerque.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Modelagem molecular – Dissertação 2. Dipeptídeos. - Dissertação. 3. Termos de hopping – Dissertação. I. Fulco, Umberto Laino. II. Albuquerque, Eudenilson Lins. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 577.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A dissertação intitulada '*MODELAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO ELETRÔNICA DE OLIGOPEPTÍDEOS E NA DESCRIÇÃO QUÂNTICA DA INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR*' foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, defendida por Jonas Ivan Nobre Oliveira, julgada e aprovada pelos membros da banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Umberto Laino Fulco (Orientador)
Departamento de Biofísica e Farmacologia – UFRN

Prof. Dr. Eudenilson Lins Albuquerque (Co-orientador)
Departamento de Biofísica e Farmacologia - UFRN

Prof. Dr. Gilberto Corso (Examinador Interno)
Departamento de Biofísica e Farmacologia - UFRN

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Examinador Externo)
Departamento de Física – UFC

NATAL/RN, 02 de Fevereiro de 2012

Dedico este trabalho à minha família: meus irmãos, Julliana e Arthur, e especialmente aos meus pais, Ivanaldo e Tereza, que, com carinho, sempre me apoiaram e me incentivaram.

Esses são meus maiores exemplos!

À minha noiva, Cristiane Carla de Oliveira Azevedo, pelo amor, pela paciência, cumplicidade e inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo suporte, apoio, carinho e amor, que me são dados em todos os momentos da minha vida.

À Cristiane Carla de Oliveira Azevedo, companheira, que através de sua ajuda facilitou a revisão final dessa dissertação, e que graças a sua sensibilidade e suas palavras de sensatez tornaram tudo possível. Você será eterna no meu amor.

Ao Prof. Dr. Umberto Laino Fulco pela inestimável orientação, amizade, pelas oportunidades apresentadas e, principalmente, pelas responsabilidades e confiança em mim depositadas, os quais me estimulam a sempre fazer o melhor em minha carreira científica.

Ao Prof. Dr. Eudenilson Lins de Albuquerque, pelos seminários, que me foram úteis para compreensão sobre transporte eletrônico em biomoléculas, e pelo exemplo de dedicação e entusiasmo em prol do Departamento de Biofísica e Farmacologia, o qual se tornará referência de pesquisa do Centro de Biociências da UFRN.

Ao Prof. Dr. Gilberto Corso, que, devido a toda sua tranquilidade e simplicidade, tenho como um exemplo raro de professor e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, um homem de pensamento rápido e intuitivo, pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos em conjunto com o departamento de Física da UFC.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biofísica e Simulações Computacionais, pelo suporte, companheirismo e proveitosas discussões, em especial ao Diego de Sousa, Jose Xavier, Gabriela Ourique, Jéssica Vianna, Jéssica Layanne, Aranthya Hevelly, Katyanna Sales, Raquel Rodrigues e Raniere da Mata.

A todos os professores e funcionários que constroem o Departamento de Biofísica e Farmacologia, em especial aos professores Alexandre Flavio Silva de Queiroz, Frederico Lemos dos Santos, Carlos Antonio Barboza, Ronaldo Alves do Amaral, ao auxiliar administrativo Ivonete Alves da Silva, à técnica de laboratório Sheylena Fernandes Aquino, ao auxiliar de serviços gerais Raimundo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos os demais que colaboraram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho e que compartilharam comigo os seus conhecimentos.

RESUMO

OLIVEIRA, J. I. N. **Modelagem Molecular na Caracterização Eletrônica de Oligopeptídeos e na Descrição Quântica da Interação Fármaco-Receptor**. 2012. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

Nessa dissertação, os princípios teóricos que regem a Modelagem Molecular foram aplicados na caracterização eletrônica do oligopeptídeo $\alpha 3$ e seus variantes (5Q,7Q)- $\alpha 3$, como também na descrição quântica da interação do aminoglicosídeo higromicina B e a subunidade 30S do ribossomo bacteriano. No primeiro estudo, os dipeptídeos lineares e neutros constituintes das biomoléculas mencionados foram modelados e posteriormente otimizados até uma estrutura de menor energia potencial e ângulos diedros adequados. No caso, três processos de otimização geométrica, baseados subsequentemente na teoria clássica newtoniana, na semi-empírica e na teoria do funcional da densidade (DFT), varreram a paisagem de energia de cada dipeptídeos na busca de uma estrutura de energia mínima ideal. Por fim, os confôrmeros ótimos foram descritos quanto ao potencial eletrostático, energia de ionização (aminoácidos), orbitais de fronteira HOMO/HOMO-1 e termo de *hopping*. A partir dos termos de *hopping* descritos nesse trabalho, foi possível, em estudos subsequentes, caracterizar as propriedades de transporte de cargas destes modelos peptídicos. Vislumbra-se uma nova tecnologia de biosensores capaz de diagnosticar doenças amiloides, relacionadas ao acúmulo de peptídeos disformes, a partir do perfil de condutividade elétrica apresentado pelas proteínas do paciente. Em um segundo momento dessa dissertação, realiza-se um estudo quântico por modelagem molecular da energia de interação de um antibiótico aminoglicosídico em seu receptor ribossômico. Sabe-se que a higromicina B (higB) é um antibiótico aminoglicosídeo que afeta a translocação ribossomal pela interação direta com a subunidade menor do ribossomo bacteriano (30S), especificamente com nucleotídeos da hélice 44 do RNA ribossômico 16S (rRNA 16S). Devido ao forte caráter eletrostático desta conexão, foi proposta a investigação energética do mecanismo de ligação da higB no 30S usando diferentes valores de constantes dielétricas ($\epsilon=0, 4, 10, 20$ e 40), as quais são amplamente utilizadas no estudo das propriedades eletrostáticas de biomoléculas. Para isso, foram medidos raios crescentes centralizados no centróide da higB tendo por base a estrutura cristalina higB-30S (1HNZ.pdb), e apenas a energia de interação individual de cada nucleotídeo englobado foi calculada quanticamente utilizando a estratégia de fracionamento molecular com capuzes conjugados (MFCC). Percebeu-se que as constantes dielétricas subestimam as energias de interação individuais, permitindo que o estado de convergência energética seja alcançado rapidamente. Porém apenas para $\epsilon=40$, a energia de interação total droga-receptor se estabilizou em $r=18\text{\AA}$, o que se constituiu como um adequado sítio de ligação, pois englobou os resíduos do 16S que interagem mais fortemente com a higB - C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, C1496 e U1498. Assim, a constante dielétrica ≈ 40 é ideal para o tratamento de sistemas com muitas cargas. Confrontando as energias de ligação individuais dos nucleotídeos 16SrRNA com ensaios experimentais para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) da higB, acredita-se que esses resíduos com elevados valores de interação gerariam resistência bacteriana à droga quando mutados. Com o mesmo raciocínio, visto que aqueles com baixa energia não influenciariam de forma eficaz a afinidade da higB em seu sítio de ligação, não ocorreria perda de eficácia caso fossem substituídos.

Palavras-chave: Modelagem molecular. Dipeptídeos. Termos de *Hopping*. Fracionamento molecular com capuzes conjugados. Higromicina B. Energias de interação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, J. I. N. **The Molecular Modeling in Electronic Characterization of Oligopeptides and for Quantum Description of Drug-Receptor Interaction.** 2012. 119 p. Dissertation (Master in Biological Sciences). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

In this dissertation, the theoretical principles governing the molecular modeling were applied for electronic characterization of oligopeptide $\alpha 3$ and its variants (5Q, 7Q)- $\alpha 3$, as well as in the quantum description of the interaction of the aminoglycoside hygromycin B and the 30S subunit of bacterial ribosome. In the first study, the linear and neutral dipeptides which make up the mentioned oligopeptides were modeled and then optimized for a structure of lower potential energy and appropriate dihedral angles. In this case, three subsequent geometric optimization processes, based on classical Newtonian theory, the semi-empirical and density functional theory (DFT), explore the energy landscape of each dipeptide during the search of ideal minimum energy structures. Finally, great conformers were described about its electrostatic potential, ionization energy (amino acids), and frontier molecular orbitals and *hopping* term. From the *hopping* terms described in this study, it was possible in subsequent studies to characterize the charge transport properties of these peptides models. It envisioned a new biosensor technology capable of diagnosing amyloid diseases, related to an accumulation of misshapen proteins, based on the conductivity displayed by proteins of the patient. In a second step of this dissertation, a study carried out by quantum molecular modeling of the interaction energy of an antibiotic ribosomal aminoglicosídico on your receiver. It is known that the hygromycin B (hygB) is an aminoglycoside antibiotic that affects ribosomal translocation by direct interaction with the small subunit of the bacterial ribosome (30S), specifically with nucleotides in helix 44 of the 16S ribosomal RNA (16S rRNA). Due to strong electrostatic character of this connection, it was proposed an energetic investigation of the binding mechanism of this complex using different values of dielectric constants ($\epsilon = 0, 4, 10, 20$ and 40), which have been widely used to study the electrostatic properties of biomolecules. For this, increasing radii centered on the hygB centroid were measured from the 30S-hygB crystal structure (1HNZ.pdb), and only the individual interaction energy of each enclosed nucleotide was determined for quantum calculations using molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) strategy. It was noticed that the dielectric constants underestimated the energies of individual interactions, allowing the convergence state is achieved quickly. But only for $\epsilon = 40$, the total binding energy of drug-receptor interaction is stabilized at $r = 18\text{\AA}$, which provided an appropriate binding pocket because it encompassed the main residues that interact more strongly with the hygB - C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, U1498 and C1496. Thus, the dielectric constant ≈ 40 is ideal for the treatment of systems with many electrical charges. By comparing the individual binding energies of 16S rRNA nucleotides with the experimental tests that determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of hygB, it is believed that those residues with high binding values generated bacterial resistance to the drug when mutated. With the same reasoning, since those with low interaction energy do not influence effectively the affinity of the hygB in its binding site, there is no loss of effectiveness if they were replaced.

Keywords: Molecular modeling. Dipeptides. Hopping terms. Molecular Fractionation with Conjugate Caps. Hygromycin B. Binding energies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação esquemática dos modelos $\alpha 3$, 5Q- $\alpha 3$ e 7Q- $\alpha 3$	24
Figura 2.2: (A) Imagem por microscopia de força atômica (AFM) do oligopeptídeo $\alpha 3$ em soluções com diferentes concentrações molares e condições de pH – 4 $\mu\text{M}/5.5$, 50 $\mu\text{M}/5.0$, 50 $\mu\text{M}/5.5$ e 50 $\mu\text{M}/6.0$. Uma fibra simples tem um comprimento >1000 nm. (B) Imagem por AFM dos variantes (5Q,7Q)- $\alpha 3$ em solução 400 $\mu\text{M}/5.5^a$	25
Figura 2.3: Conformações lineares dos oligopeptídeos modelos. Estrutura linear da molécula $\alpha 3$, constituída por três sequências repetidas dos aminoácidos Leu-Glu-Thr-Leu-Ala-Lys-Al; sequência do oligopeptídeos 5Q- $\alpha 3$, em destaque as substituições Ala por Gln nas posições 'e' de cada cadeia; molécula 7Q- $\alpha 3$, destacando as modificações Ala por Gln nas posições 'g' de cada cadeia.....	26
Figura 2.4: Representação do impedimento estereoquímico entre cadeias laterais de aminoácidos adjacentes.	28
Figura 2.5: Tipos de estruturas e processo de dobramento em proteínas.....	30
Figura 2.6: Representação de uma molécula utilizando princípios de modelagem molecular onde as esferas são os átomos e a mola representa a ligação entre eles.....	34
Figura 2.7: Representação gráfica 2D do aminoácido fenilalanina.	35
Figura 2.8: Configurações do Forcite Anneal - Materials Studio software.	38
Figura 2.9: Formação da ligação peptídica e ângulos diedros característicos.....	40
Figura 2.10: Mapa de coordenadas que mostra as regiões angulares favoráveis e desfavoráveis para os aminoácidos em suas três conformações mais comuns (α -hélice e β -Folha).	41
Figura 2.11: Configurações do VAMP - Materials Studio software.	45
Figura 2.12: Configurações do DMol - Materials Studio software.....	49
Figura 2.13: Formaldeído otimizado por técnicas de mecânica molecular (esquerda), e sua superfície de potencial eletrostático (direita).	51
Figura 2.14: Diagrama ilustrativo da formação dos orbitais moleculares σ e σ^* , a partir da interação dos orbitais atômicos 1s, da molécula H_2	53
Figura 2.15: Representação esquemática da natureza dos materiais em função do gap energético. Comumente, isolantes possuem gap >4eV; já os semicondutores, gap < 4eV; já os materiais condutores são caracterizados pela sobreposição das bandas.	54
Figura 2.16: Estruturas dos dipeptídeos que constituem os oligopeptídeos $\alpha 3$, 5Q- $\alpha 3$ e 7Q- $\alpha 3$ e respectivos gráficos de convergência obtidos após simulação de otimização geométrica executadas através do módulo DMOL – Materials Studio software.....	59

Figura 2.17: Mapas de potencial eletrostático dos dipeptídeos que constituem o oligopeptídeo $\alpha 3$ e seus variantes (5Q,7Q) $\alpha 3$ após simulações energéticas efetuadas através do módulo *DMOL – Materials Studio software*. Regiões que tendem para o vermelho (azul) possuem uma maior (menor) concentração de elétrons. 62

Figura 2.18: Distinções na polaridade dos oligopeptídeos influenciada por diferenças no potencial eletrostático de seus dipeptídeos 64

Figura 2.19: Energias de ionização (aminoácidos) e distribuição espacial dos orbitais de fronteira de mais alta energia (HOMO e HOMO-1) de cada dipeptídeo que constitui o oligopeptídeo $\alpha 3$ e seus variantes (5Q,7Q) $\alpha 3$ após simulações energéticas efetuadas através do módulo *DMOL – Materials Studio software*. 65

Figura 3.1: Estruturas dos aminoglicosídeos 4-, 4,5- e 4,6-substituído 2-DOS. O anel 2-DOS é mostrado em vermelho e os carbonos onde ocorrem as substituições em azul. Fonte: Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Baasov, T. Designer aminoglycosides: The race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v.6 (2), p.227-39, 2008.

Figura 3.2: The structure of the complete *Thermus thermophilus* 70S ribosome was crystallized in a complex including the 30S subunit (rRNA 16S and small subunit proteins), 50S subunit (23S rRNA, 5S rRNA, and large subunit proteins).....

Figura 3.3: Representação em Cartoon dos peptídeos ribossomais (thx, S2-S20) e ribonucleoproteínas (mRNA e rRNA 16S). Cadeia "V" (vermelho) contém a proteína "thx"; cadeia "T" (azul marinho) contém a proteína "S20"; cadeia "A" (hidrogênio) contém o 16S rRNA; proteína "S20"; cadeia "P" (amarelo) contém a proteína "S16"; cadeia "Q" (densidade) contém a proteína "S17"; cadeia "N" (laranja) contém a proteína "S14"; cadeia "O" (rosa choque) contém a proteína "S15"; cadeia "L" (azul-cinza) contém a proteína "S12"; cadeia "M" (limão) contém a proteína "S13"; cadeia "J" (floresta) contém a proteína "S10"; cadeia "K" (ciano) contém a proteína "S11"; cadeia "R" (azul) contém a proteína "S18"; cadeia "S" (amarelo alaranjado) contém a proteína "S19"; cadeia "X" (cobre) contém o fragmento de mRNA; cadeia "H" (verde) contém a proteína "S8"; cadeia "I" (púrpura) contém a proteína "S9"; cadeia "D" (salmão) contém a proteína "S4"; cadeia "E" (verde azulado) contém a proteína "S5"; cadeia "F" (salmão escuro) contém a proteína "S6"; cadeia "G" (ervilha) contém a proteína "S7"; cadeia "B" (ciano claro) contém a proteína "S2"; cadeia "C" (framboesa) contém a proteína "S3".

Figura 3.4: Distribuição eletrônica da subunidade ribossomal 30S (PDB: 1HNZ). Os átomos das cadeias peptídicas e ribonucleotídeo carregados positivamente e negativamente são destacados em azul e vermelho respectivamente. Átomos eletropositivos e eletronegativos são destacados em azul celeste e salmão respectivamente.

Figura 3.5: Visão geral do processo de *Tradução* bacteriana. Por simplicidade, nem todos os passos intermediários. aa-tRNA, aminoacil-tRNA; EF, fator de alongação; IF, fator de iniciação; RF, fator de liberação. FONTE: Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1234-42.

Figura 3.6: Estrutura química única, regiões de interação e mapa de potencial eletrostático do aminoglicosídeo higromicina B em pH fisiológico (7.2-7.4).....

Figura 3.7: Estrutura tridimensional da subunidade ribossomal 30S do *Thermus thermophilus* co-cristalizada com a higromicina B, pdb 1HNZ. (A) Destaca-se o sítio de ligação droga-receptor de raio r ao redor do centróide (centro de massa) da higromicina, (B) enfatizando os nove resíduos mais importantes do 16S rRNA ligados à droga: C1403, C1404, G1405, U1406, A1493, G1494, U1495, C1496 and U1498.

Figura 3.8: Exemplo de blindagem considerado nos cálculos MFCC: resíduos G1405, U1406, C1496 e G1497 blindando a interação A1518-higromicina B.

Figura 3.9: Processo de convergência de energia do sistema higromicina B-30S a partir da variação energética em função do raio do ligante usando valores diferentes para constante dielétrica: 4 (traço), 10 (ponto), 20 (traço-ponto) and 40 (traço-ponto-ponto). Os raios para o sítio de ligação são medidos com base no centróide da higromicina B e englobam todos os nucleotídeos do rRNA 16S por eles inseridos.

Figura 3.10: Representação gráfica (A) e tabelada (B) das energias de ligação individuais de todos os nucleotídeos do rRNA 16S presentes dentro do sítio de ligação entre 4-18 Å do complexo higB-30S obtido pela técnica de MFCC usando as constantes dielétricas de 0, 4, 10, 20 and 40.

Figura 3.11: Contatos intermoleculares e energias de interação individuais entre a higromicina B e os nucleotídeos do rRNA 16S localizados em um grande sítio de ligação com raio de 18 Å. Os resultados foram obtidos por cálculo de bioquímica quântica usando constante dielétrica igual a 40. Somente aqueles com energia de interação maior (em valores absolutos) do que 3.0 kcal/mol são mostrados. .

Figura 3.12: Distância em angstrom (Å) das principais interações intermoleculares – pontes de hidrogênio convencionais e não convencionais – entre a higromicina B e os resíduos do rRNA 16S localizados no sítio de ligação da droga na subunidade ribossomal 30S.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Energias das conformações obtidas para os dipeptídeos constituintes dos oligopeptídeos $\alpha 3$ e seus variantes (5Q,7Q) $\alpha 3$ ao término das simulações de otimização executadas através dos módulos *Forcite*, *VAMP* e *DMol - Materials Studios software*. 61

Tabela 2: Potencial de ionização dos aminoácidos (IP) constituintes dos dipeptídeos, energias dos orbitais moleculares ocupados de maior energia dos mesmos (HOMO e HOMO-1) e respectivos termos de *hopping* (t) obtidos após simulações energéticas efetuadas através do módulo *DMOL - Materials Studio software*^a 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Escopo da Dissertação	15
Referências.....	17
2 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS DO OLIGOPEPTÍDEO $\alpha 3$ E SEUS VARIANTES (5Q,7Q)$\alpha 3$	19
2.1 Introdução	19
2.2 Modelos Peptídicos em Estudo	23
2.3 Metodologia e Ferramentas	27
2.3.1 Construção dos Modelos.....	27
2.3.2 Processos de Otimização.....	29
2.3.3 Cálculos Energéticos (Potencial Eletrostático, Orbitais de Fronteira, Energia de Ionização e Termos de <i>Hopping</i>).....	50
2.4 Resultado e Discussão	58
2.4.1 Dipeptídeos Otimizados	58
2.4.2 Potenciais Eletrostáticos	61
2.4.3 Orbitais de Fronteira	65
2.4.4 Potenciais de Ionização e Termos de <i>Hopping</i>	67
2.5 Conclusão	68
Referências.....	69
3 DESCRIÇÃO QUÂNTICA DA INTERAÇÃO HIGROMICINA B-RIBOSSOMO	
3.1 Introdução	
3.1.1 Aminoglicosídeos.....	
3.1.2 Higromicina B	
3.2 Metodologia	
3.2.1 Aspectos Computacionais	
3.2.2 Ajustes Estruturais do Complexo Subunidade 30S - Higromicina B.....	
3.2.3 Cálculo das Energias de Ligação	
3.3 Resultados e Discussão	
3.3.1 Efeitos das Constantes Dielétricas nas Energias de Interação Calculadas pelo MFCC.....	
3.3.2 Identificação Estrutural e Quantificação das Interações entre Higromicina B e a Subunidade ribossomal 30S	
3.3.3 Percepção Energética dos Pontos de Mutação Responsáveis pela Resistência à Higromicina B.....	
3.3.4 Conclusão	
Referências.....	
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
APÊNDICE A – ARTIGO 1	121