

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo Químico-Teórico da Reação de Síntese da
Corismato Sintase

MADSON SILVA DO NASCIMENTO

Prof. Dr. Moacyr Comar Jr.
Orientador

Manaus - AM

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MADSON SILVA DO NASCIMENTO

Estudo Químico-Teórico da Reação de Síntese da
Corismato Sintase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Comar Jr.

Manaus - AM

2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244e Nascimento, Madson Silva do
Estudo Químico-Teórico da Reação de Síntese da Corismato Sintase / Madson Silva do Nascimento. 2013
82 f.: il. color; 31 cm.

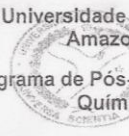
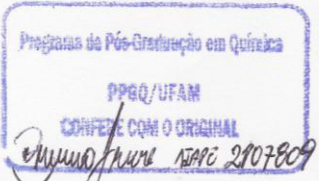
Orientador: Dr. Moacyr Comar Junior
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Reações Enzimáticas. 2. Corismato Sintase. 3. Estudo Químico-Teórico. 4. DFT. I. Comar Junior, Dr. Moacyr II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

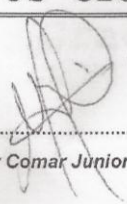
MADSON SILVA DO NASCIMENTO

Estudo Químico-Teórico da Reação de Síntese da
Corismato Sintase

Ata CCPGQ e Banca Examinadora. Aprovado em 18 de abril de 2013.

 <p>Universidade Federal do Amazonas Programa de Pós-Graduação em Química</p>	<p>Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA</p> <p>ATA – CCPGQ</p>
<p>Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do aluno Madson Silva do Nascimento, do Curso de Pós-Graduação em Química, realizada no dia 18 de abril de 2013.</p> <p>Às quinze horas do dia 18 de abril de 2013, no Auditório da Faculdade da Química da Universidade Federal do Amazonas, foi realizada a defesa pública de dissertação do aluno Madson Silva do Nascimento intitulada: <i>“Estudo Químico – Teórico da Reação de Síntese da Corismato Sintase”</i>, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química. A Banca Examinadora constituiu-se dos seguintes professores: <i>Dr. Moacyr Comar Junior – Presidente (UFSJ)</i>, <i>Dr. Puspitapallab Chaudhuri – Membro (UFAM)</i> e <i>Dr. Roberto Barbosa de Castilho (UFAM)</i>. Após a apresentação do trabalho pelo aluno, os examinadores fizeram as observações de praxe. Todas as sugestões da Banca Examinadora serão consideradas ao preparar a versão final do seu trabalho escrito. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se para a definição do conceito do trabalho apresentado, tendo considerado o aluno <u>APROVADO</u>. Por decisão do colegiado, o aluno deverá entregar a versão definitiva da dissertação em 30 dias, prorrogáveis por mais 30 dias. Em conformidade com o RI do PPGQ (Art. 89, § 7º e 8º), a emissão de qualquer documento comprobatório da defesa da dissertação está condicionada a entrega dessa versão no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, o Presidente agradeceu a presença de todos e deu por encerrada a sessão. <i>Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas</i>, em Manaus, 18 de Abril de 2013.</p> <p style="text-align: right;"></p>	

Programa de Pós-Graduação em Química -2-



.....
Prof. Dr. *Moacyr Comar Junior* – Presidente (UFSJ)

Puspitapallab Chaudhuri
.....
Prof. Dr. *Puspitapallab Chaudhuri* – Membro (UFAM)

Roberto Castilho
.....
Prof. Dr. *Roberto Barbosa de Castilho* – Membro (UFAM)

DEDICATÓRIA

- A Deus: O Pai, Jesus e o Espírito Santo, sempre presente na minha vida, ajudando-me e me guiando de maneira que cheguei a lugares que não imaginava, me dando forças para realizações que nunca teria alcançado. Pelo dom da vida e por tantos livramentos que me permitiram estar hoje, alcançando mais este feito.

- Aos meus pais, Mário Nascimento e Mariana Nascimento que não pouparam esforços para que eu tivesse condições de ter saúde e educação, oportunizando-se a chance de um futuro promissor.

- Ao meu irmão Maison por ser fonte de inspiração e talento na minha vida.

- Às minhas irmãs Elisângela e Larissa, pois suas existências são para mim motivo de alegria.

“Oh! Provai e vede que o Senhor é bom; bem-aventurado o homem que
nEle se refugia.” Salmo 34:8

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa muito antiga causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Com 9,2 milhões de casos no mundo a cada ano até 2008, segundo a OMS e a gradual perda de eficácia dos fármacos existentes frente à resistência dos microorganismos, merece especial atenção das autoridades de nosso país e motiva pesquisas na descoberta de novos fármacos que venham a ser bem-sucedidos no tratamento dessa enfermidade. Para isso, uma abordagem muito usada é a busca de inibidores do metabolismo dos agentes patogênicos. A via do ácido chiquímico é uma rota biossintética fundamental para a manutenção da bactéria e, assim, as enzimas pertencentes à via do chiquimato constituem um excelente alvo no desenho de novos agentes antibacterianos. A enzima corismato sintase catalisa a sétima e última etapa dessa rota, convertendo o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP) em corismato, este é um importante precursor em outras rotas metabólicas, como as de aminoácidos aromáticos, folato, ubiquinona, vitamina K e outros produtos. A compreensão da reação de síntese do corismato é controversa, pois não há unanimidade com relação ao mecanismo nem quanto ao papel dos aminoácidos envolvidos. A elucidação da mesma trará um significativo avanço científico, ajudando a entender toda a complexidade envolvida nessa etapa bioquímica, e também contribuirá para o desenvolvimento de novos inibidores da enzima. O estudo da reação de síntese em questão foi desenvolvido empregando o uso da química quântica computacional em nível DFT utilizando o funcional B3LYP e a base 6-31+G(d,p). A partir dos orbitais Homo-Lumo e da otimização do estado de transição entre reagente e produto da reação (QST2), foi possível esclarecer alguns pontos importantes sobre a reação. Foi possível propor um mecanismo de reação à luz deste estudo químico teórico.

Palavras-Chaves: corismato sintase, reações enzimáticas, estudo químico-teórico, DFT.

ABSTRACT

Tuberculosis is an ancient infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. With 9.2 million cases worldwide each year by 2008, According to WHO and the gradual loss of effectiveness of existing drugs through the resistance of microorganisms, deserves special attention from our country's authorities and encourages research in discovering new drugs that may be successful in treating this disease. For this, a widely used approach is to search for the pathogens metabolism inhibitors. The shikimic acid pathway is a biosynthetic pathway critical to maintaining the bacteria, and thus the enzymes belonging to the shikimate pathway are a prime target in the design of new antibacterial agents. The enzyme chorismate synthase catalyzes the seventh and final step of this route, converting the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) in chorismate, this is an important precursor in other metabolic pathways, such as aromatic amino acids, folate, ubiquinone, vitamin K and other products. Understanding the chorismate synthesis reaction is controversial because there is no unanimity regarding the mechanism or the role of amino acids involved. The elucidation of it will bring a significant scientific advance, helping to understand the complexity involved in this biochemical step, and also contribute to the development of new enzyme inhibitors. The study of the synthesis reaction in question was developed employing the use of quantum chemistry computational in DFT level using the functional B3LYP and 6-31 + G (d, p) basis set. From the orbital Homo-Lumo orbitals and optimization of transition state between reactant and reaction product (QST2), it was possible to clarify some important points about the reaction . It was possible to propose a reaction mechanism in the light of this theoretical chemical study .

Keywords: chorismate synthase, enzymatic reactions, theoretical chemical study, DFT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A ENZIMA CORISMATO SINTASE	13
2.2 MECANISMOS DE REAÇÃO	14
3. O MODELO TEÓRICO	18
3.1 MÉTODO DE HARTREE-FOCK	18
3.2 TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE – <i>DENSITY FUNCTIONAL THEORY</i> (DFT)	30
3.3 CONJUNTOS DE BASE	38
4. OBJETIVOS	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 MODELO UTILIZADO	44
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	46
6.1 DADOS ESTRUTURAIS	46
6.2 REAGENTE EPSP	47
6.2.1 <i>Distâncias Interatômicas</i>	47
6.3 O ESTADO DE TRANSIÇÃO	50
6.4 DADOS ELETRÔNICOS	52
6.4.1 <i>Cargas Atômicas</i>	53
6.4.2. ORBITAIS HOMO E LUMO	58
6.4.3. ORBITAIS HOMO E LUMO DA ESPÉCIE PROTONADA.	63
7. ABORDAGEM QUÍMICO-TEÓRICA ATRAVÉS DE ORBITAIS HOMO/LUMO E QST2 LANÇANDO MAIS LUZ AOS MECANISMOS DE REAÇÃO PROPOSTOS	67
7.1. O QUE A ABORDAGEM HOMO/LUMO E QST2 CORROBORA OU NÃO EM RELAÇÃO AOS ESTUDOS FEITOS ATÉ ENTÃO?	69
7.1.1 <i>Congruência relativa à saída do grupo fosfato. O procedimento QST2 corrobora.</i>	70
7.1.2 <i>Congruência relativa ao ataque nucleofílico em C1. O orbital LUMO da espécie protonada corrobora</i>	70
7.1.3 <i>Incongruência quanto ao ataque nucleofílico em C1 preceder a protonação do grupo fosfato. Os orbitais HOMO/LUMO da espécie iônica não corrobora.</i>	71
8. UMA PROPOSTA DE MECANISMO PARA A REAÇÃO DE SÍNTESE DO CORISMATO	73
9. CONCLUSÕES	75
10. LISTA DE TABELAS	76
11. REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conversão de EPSP em Corismato pela enzima corismato sintase, considerada única na natureza com configuração <i>anti</i>	13
Figura 2: Mecanismo onde é mostrada a participação dos resíduos His 17 e His 106 na reação de síntese do corismato.	14
Figura 3: Mecanismo proposto onde é mostrada a participação do Asp367.	15
Figura 4: Mecanismo de reação proposto com a participação dos resíduos Ser16 e Ser127.....	16
Figura 5: Propostas de mecanismos para a reação da corismato sintase.....	17
Figura 6: Esquema de um ciclo do Método do Campo Auto-Consistente.	26
Figura 7: Comportamento de uma FTGs em relação a uma FTSS.	40
Figura 8: Representação do orbital 1s do H utilizando uma FTGs (linha sólida) e uma FTSS (linha pontilhada).....	41
Figura 9: Representação do orbital 1s do H utilizando quatro FTGs (linha sólida) e uma FTSS (linha pontilhada).	41
Figura 10: Numeração dos átomos adotadas para a análise dos resultados do EPSP iônico.....	47
Figura 11: Numeração dos átomos adotadas para a análise dos resultados do Corismato iônico.	47
Figura 12: Estrutura do EPSP otimizado (perspectiva 1)	48
Figura 13: Estrutura do EPSP otimizado (perspectiva 2)	48
Figura 14: Interações intramoleculares no íon EPSP, uma entre H-22 e O-7 e uma possibilidade entre H-22 e O-10.	48
Figura 15: Estrutura do EPSP protonado otimizado (perspectiva 1).....	49
Figura 16: Estrutura do EPSP protonado otimizado (perspectiva 2).....	49
Figura 17: Corismato e subprodutos iônicos otimizados (1)	50
Figura 18: Corismato e subprodutos iônico otimizados (2).....	50

Figura 19: Representação do input do Gaussian para o procedimento qst2. O reagente está à esquerda e o produto à direita	51
Figura 20: Estado de transição iônico otimizado (1)	52
Figura 21: Estado de transição iônico otimizado (2)	52
Figura 22: Substrato EPSP convertendo-se na estrutura de transição.	53
Figura 23: Conversão do EPSP em corismato através de uma eliminação com estereoquímica anti-1,4 com as perdas do grupo fosfato em C-3 e hidrogênio em C-6.	54
Figura 24: Densidade de carga NBO dos átomos do substrato e do intermediário;	55
Figura 25: Estrutura da transição da reação de síntese do EPSP a partir do Corismato obtida pelo procedimento QST2.	59
Figura 26: Esquema geral para a síntese do Corismato a partir do EPSP	60
Figura 27: A eliminação anti-1,4 no EPSP envolve a saída do grupo fosfato e um hidrogênio H-27.	60
Figura 28: Localizações dos orbitais HOMO (região de ataque eletrofílico) e LUMO (região de ataque nucleofílico) no reagente EPSP.	61
Figura 29: HOMO-1 e LUMO+1 do reagente EPSP	62
Figura 30: HOMO-2 e LUMO+2 do reagente EPSP	62
Figura 31: HOMO do Reagente EPSP protonado.	63
Figura 32: LUMO do Reagente EPSP protonado	64
Figura 33: Átomos de carbono onde ocorre a hiperconjugação estão representados pelos números 1, 2, 3 e 19.	65
Figura 34: HOMO do estado de transição iônico.	65
Figura 35: LUMO do estado de transição iônico.	66
Figura 36: Mecanismo catiônico proposto para a síntese do Corismato.	67
Figura 37: Mecanismo radicalar proposto para a síntese do corismato.	67
Figura 38: Localização de H27 e C1 na molécula	68

Figura 39: Otimização do estado de transição via QST2 mostrando saída do grupo fosfato precedendo a saída de H27.....	70
Figura 40: C1 encontra-se na região do Orbital LUMO do reagente protonado.	71
Figura 41: Orbitais HOMO e LUMO da espécie iônica.	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distâncias interatômicas no EPSP aniônico. A Tabela 1 detalha cada ligação do Gráfico 1.	49
Gráfico 2: Cargas NBO do substrato, intermediário e do produto dos átomos carbono e oxigênio não pertencentes ao anel de seis átomos. São omitidas as cargas dos átomos O-7, O-9, O-10 e O-11 do produto porque não fazem parte da otimiza	55
Gráfico 3: Cargas NBO do substrato, intermediário e produto dos átomos de carbono pertencentes ao anel de seis átomos.....	56
Gráfico 4: Variação do comprimento da ligação entre os átomos envolvidos diretamente na quebra e formação de ligações duplas (C1, C2, C3 e C6) na reação de síntese do corismato.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distâncias interatômicas no íon EPSP	76
Tabela 2: Cargas NBO para o substrato, intermediário e produto.	77

1. INTRODUÇÃO

A enzima corismato sintase catalisa a sétima e última etapa da via do ácido chiquímico ou comumente conhecida como via chiquimato, a qual converte o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP) em corismato, que é um precursor de outras rotas metabólicas, como as de aminoácidos aromáticos, folato, ubiquinona, vitamina K e outros produtos.

Uma vez que esta via metabólica é ausente em mamíferos, porém presente em bactérias fungos e plantas, ela se torna um excelente alvo para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas, pois os inibidores da mesma teoricamente seriam inertes nos seres humanos.

A compreensão da reação de síntese da sétima última via do chiquimato ainda é controversa, pois não há unanimidade com relação ao mecanismo nem quanto ao papel dos aminoácidos envolvidos. Assim, a elucidação da mesma trará um significativo avanço científico, ajudando a entender toda a complexidade envolvida nessa etapa bioquímica, e também contribuirá para o desenvolvimento de novos inibidores da enzima.

Abordagens químico quântica computacionais do estudo da reação da síntese do corismato em nível da Teoria do Funcional da Densidade química são carentes, existindo apenas uma publicação desta natureza.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Enzima Corismato Sintase

A enzima corismato sintase (CS) catalisa a sétima e última etapa da via do chiquimato, sendo o corismato o produto final desta via e o precursor na biossíntese de numerosos compostos aromáticos em bactérias, fungos, plantas e protozoários. Uma vez que o corismato está ausente em desta via em mamíferos, esta enzima torna-se alvo potencial para o projeto racional de medicamentos (Coggins *et al*, 2003; Zheng *et al* 2008).

A CS catalisa a conversão do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP) em corismato e necessita da flavina mononucleotídeo na forma reduzida como cofator (FMNH₂) (Hassan & Nester, 1978). Esta reação é considerada única na natureza, pois envolve a perda do grupo 3-fostato e a clivagem da ligação do hidrogênio em C-6 caracterizando uma eliminação anti-1,4, contrariando as expectativas, pois eliminações 1,4 são orientadas em configurações *syn* e, além disso, a reação não envolve mudança do estado redox do substrato (Figura 1) (Hill & Newkome, 1969; Floss *et. al.*, 1972; Onderka & Floss, 1969).

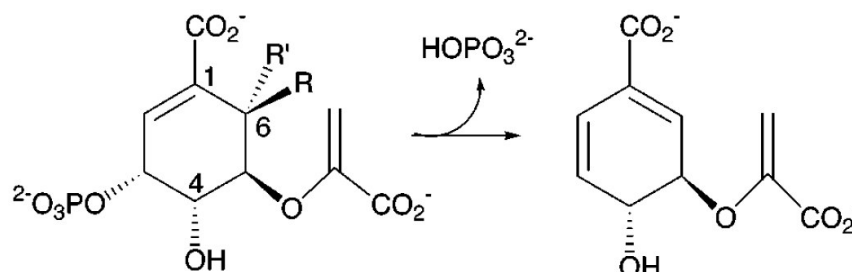


Figura 1: Conversão de EPSP em Corismato pela enzima corismato sintase, considerada única na natureza com configuração *anti*.

2.2 Mecanismos de Reação

Embora todos os pormenores a respeito desta reação ainda não foram completamente elucidados, dados publicados ao longo dos anos têm revelado aspectos químicos importantes da reação em questão.

Estudos experimentais demonstraram que:

1) A saída do grupo fosfato precede a saída do hidrogênio em C-6(Pro-R) (Bornemann *et. al.*, 1996).

2) A FMNH₂ atua como nucleófilo doando um elétron ao substrato EPSP facilitando a saída do grupo fosfato (Bornemann, 2002; Macheroux *et. al.*, 1999).

3) Os aminoácidos histidina 17 (His 17) e histidina 106 (His 106) funcionam como ácido no sítio ativo. Com a his 106 protonando a FMNH₂ em N(1)-C(2)=O, enquanto que a His 17 está envolvida na protonação que facilitaria a saída do grupo fosfato, conforme a ilustração do mecanismo proposto (Figura 2) (Kitzing *et. al.*, 2004).

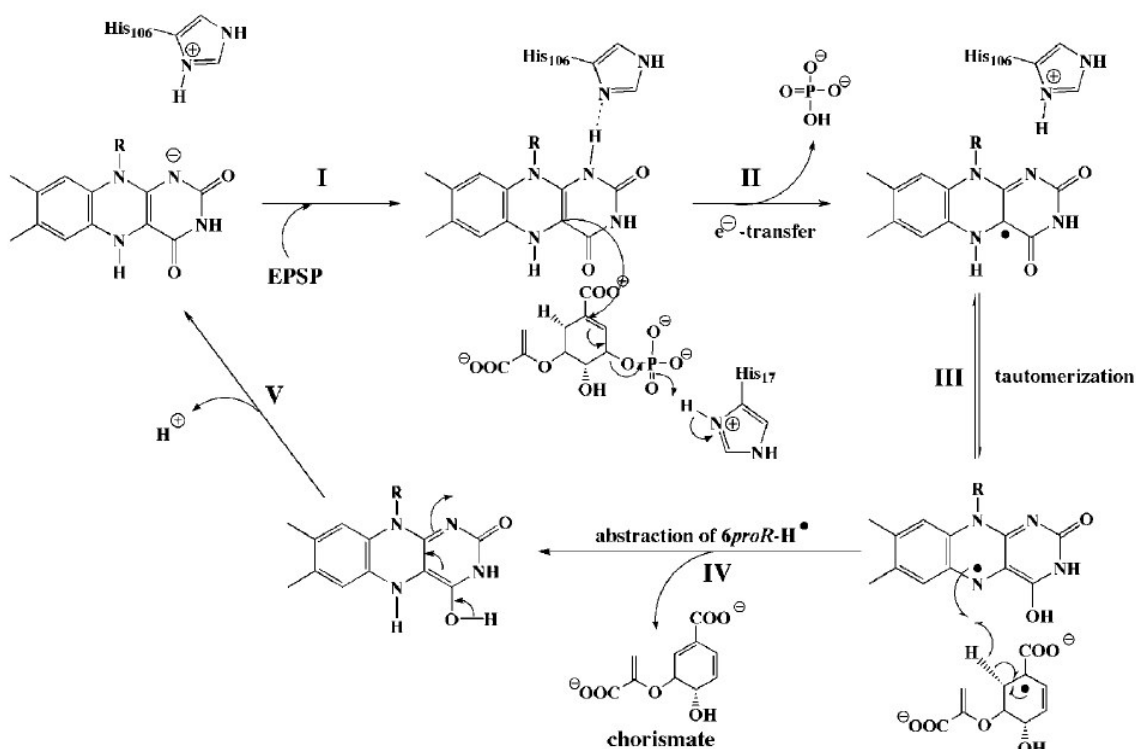


Figura 2: Mecanismo onde é mostrada a participação dos resíduos His 17 e His 106 na reação de síntese do corismato. (Kitzing *et. al.* 2004).

4) O resíduo de ácido aspártico 367 (Asp 367) se mostrou importante para a reação de síntese, pois mutações feitas com alanina e asparagina mostraram uma redução de 300 e 600 vezes da atividade enzimática. A posição deste resíduo próxima ao substrato e ao átomo de N(5) do anel isoaloxazina da FMNH₂, o torna forte candidato na participação da etapa de retirada do hidrogênio do substrato EPSP pela flavina mononucleotídeo conforme o mecanismo proposto na figura 3 (Rauch *et. al.*, 2007).

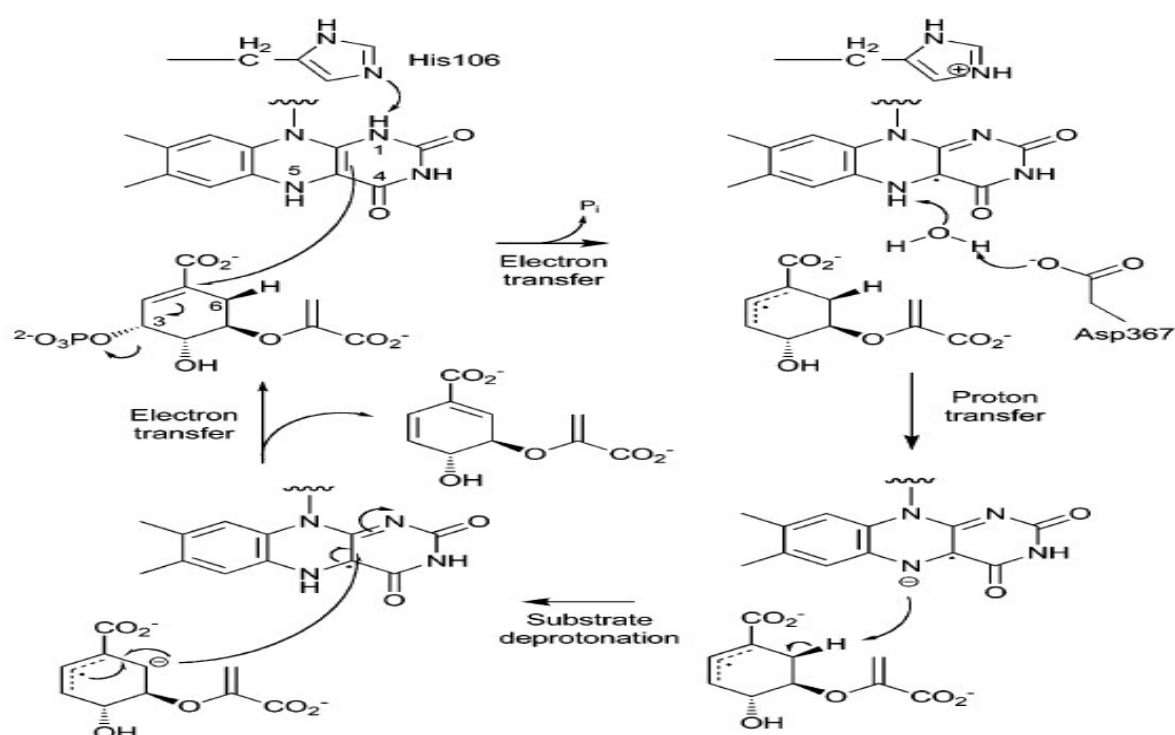


Figura 3: Mecanismo proposto onde é mostrada a participação do Asp367. O resíduo de Asp367 retira um hidrogênio de uma molécula de água, esta retira um hidrogênio de N(5) do anel isoaloxazina da flavina mononucleotídeo, que por sua vez participa na abstração do hidrogênio em C(6), o que resultará na formação do corismato. (Rauch *et. al.* 2007).

5) Os resíduos de serina 16 e 127 (Ser16, Ser 17), também se mostraram importantes no mecanismo de reação, pois mutações feitas com alanina (Ala) em duas proteínas mutantes mostraram uma diminuição da atividade enzimática em 6 vezes para a mutação (Ser127-Ala) e 70 vezes para e (Ser16-Ala). A relevância desses resíduos ficou ainda mais evidente quando a enzima com mutação dupla

(Ser16-Ala-Ser-127-Ala) não apresentou atividade enzimática. O mecanismo de reação proposto com a participação desses resíduos é mostrado na Figura 4 (Rauch *et. al.*, 2008).

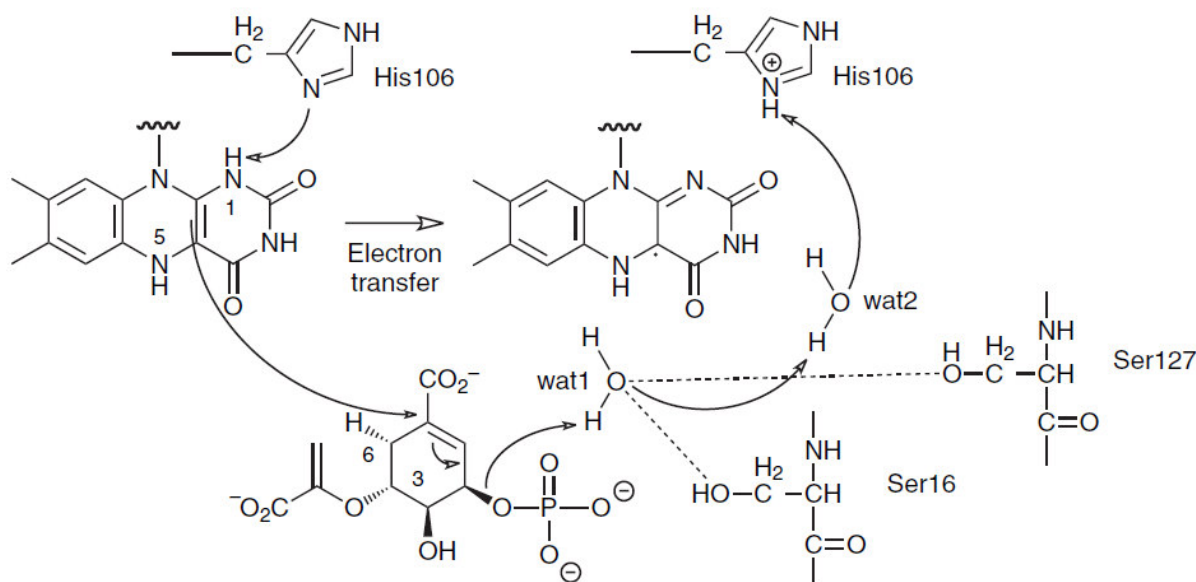


Figura 4: Mecanismo de reação proposto com a participação dos resíduos Ser16 e Ser127. (Rauch *et. al.* 2008).

A despeito desses mecanismos, onde a participação dos aminoácidos é evidenciada, embora ainda não se tenha um veredito sobre os papéis exatos de cada qual o mecanismo realmente ocorre, são propostas duas linhas gerais de mecanismo para esta reação, um mecanismo radicalar e outro catiônico (Figura 5) (Maclean & Ali, 2003).

Conforme a proposta de mecanismo A (Figura 5), o intermediário formado pelo reagente EPSP é catiônico, enquanto que na proposta B (Figura 5) o intermediário é um radical. Neste mecanismo, a FMNH₂ participa realizando um ataque nucleofílico radicalar direto no substrato levando à perda do grupo fosfato, enquanto que no mecanismo de intermediário catiônico a FMNH₂ não participa da clivagem da ligação do grupo fosfato. Em ambos os mecanismos a FMNH₂ participa abstraindo o átomo de hidrogênio que finalizará a reação.

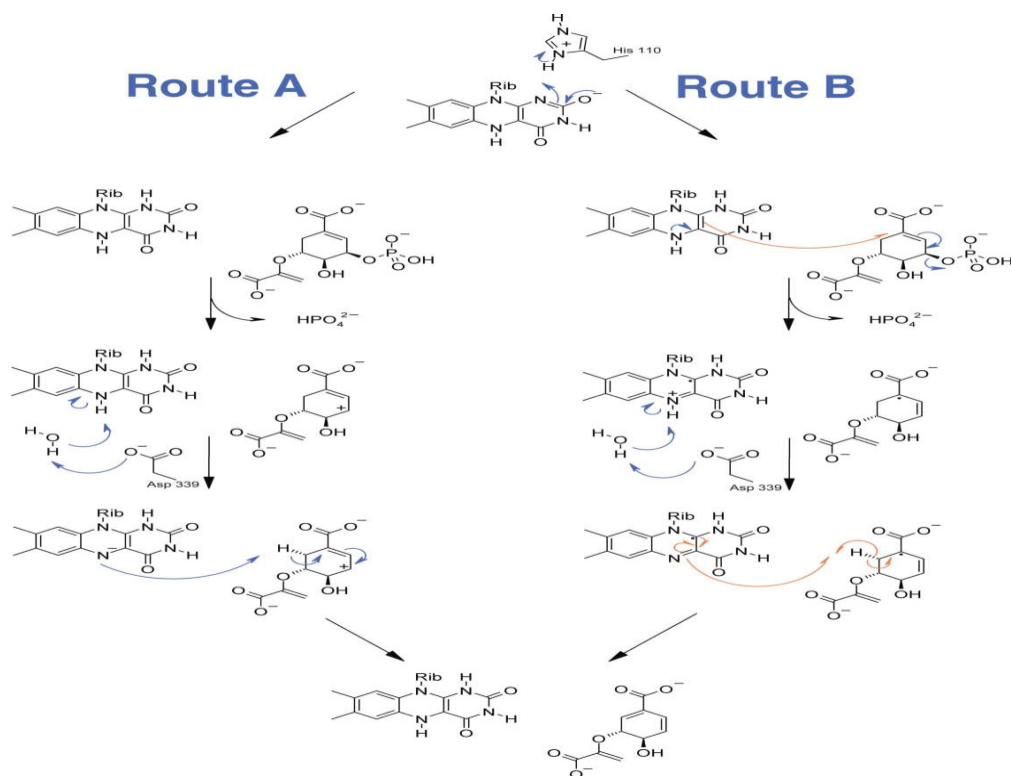


Figura 5: Propostas de mecanismos para a reação da corismato sintase. (Maclean & Ali 2003).

3. O MODELO TEÓRICO

3.1 Método de Hartree-Fock

A aproximação de Hartree-Fock é central na química quântica, pois permitiu que o cálculo de propriedades atômicas e moleculares fosse realizado de uma forma mais simples e, apesar de fornecer resultados pobres em alguns casos, é central no sentido de que muitos métodos que foram além desta aproximação usam-na para construção de suas metodologias.

Pode-se entender a aproximação de Hartree-Fock (HF) como sendo um método de escrever a melhor função de onda do estado fundamental de um sistema a partir de um determinante simples formado por spin-orbitais e descrito pelo hamiltoniano \mathcal{H} :

$$|\Psi_0\rangle = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_a \chi_b \dots \chi_N\rangle$$

Equação 1

De acordo com o princípio variacional, pode-se encontrar o melhor conjunto de orbitais de spin que minimizem a energia eletrônica total não-relativística. Na aproximação de HF, a equação abaixo é usada para encontrar o valor da energia eletrônica:

$$h(1)\chi_a(1) + \sum_{b \neq a} \left[\int dx_2 |\chi_b(2)|^2 r_{12}^{-1} \right] \chi_a(1) - \sum_{b \neq a} \left[\int dx_2 \chi_b^*(2) \chi_a(2) r_{12}^{-1} \right] \chi_b(1) = \varepsilon_a \chi_a(1)$$

Equação 2

Onde:

$$h(1) = -\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}}$$

Equação 3

é a energia cinética e potencial de atração do núcleo A em relação ao elétron 1. A quantidade ε_a é a energia do spin-orbital χ_a .

Na Equação 2, os termos de soma de índice b representam as interações entre os elétrons. Sem estes termos, a equação de HF torna-se a equação de Schrödinger para um elétron no campo criado pelo núcleo A. O primeiro termo da soma em b é o termo conhecido como o *termo de Coulomb*. Este termo representa o potencial sentido pelo elétron 1, que está em χ_a , produzido pelo elétron 2 que está em χ_b . Pela soma sobre todos os elétrons $b \neq a$ obtém-se um potencial médio criado pelos N-1 elétrons do sistema. Associado a esta interpretação, é conveniente definir o operador:

$$J_b(1) = \int dx_2 |\chi_b(2)|^2 r_{12}^{-1}$$

Equação 4

que representa o potencial criado pelos elétrons em χ_b sentido pelo elétron em χ_a .

O segundo termo na equação representa o *termo de troca* que aparece devido à natureza antissimétrica da função de onda HF. Definindo o operador de troca:

$$K_b(1)\chi_a(1) = \left[\int dx_2 \chi_b^*(2) r_{12}^{-1} \chi_a(2) \right] \chi_b(1)$$

Equação 5

A operação de K_b sobre χ_a envolve a “troca” do elétron 1 e do elétron 2. Diferentemente do operador de Coulomb, o operador de troca é um operador *não-local*, desde que ele não existe como um potencial em um ponto determinado do espaço.

Utilizando os operadores definidos nas equações acima, a equação de Hartree-Fock pode ser escrita da seguinte forma:

$$\left[h(1) + \sum_{b \neq a} J_b(1) - \sum_{b \neq a} K_b(1) \right] \chi_a(1) = \varepsilon_a \chi_a$$

Equação 6

e, eliminando a condição da soma, define-se o operador de Fock por:

$$f(1) = h(1) + \sum_b J_b(1) - K_b(1)$$

Equação 7

Assim, a equação de Hartree-Fock pode ser escrita da seguinte forma:

$$f_a |\chi_a\rangle = \varepsilon_a |\chi_a\rangle$$

Equação 8

O operador de Fock, definido acima, é a soma do hamiltoniano monoelétrônico $h(1)$ e de um operador potencial de um elétron chamado de potencial de Hartree-Fock, $v^{HF}(1)$.

Assim:

$$v^{HF}(1) = \sum_b J_b(1) - K_b(1)$$

e

$$f(1) = h(1) + v^{HF}(1)$$

Equação 9

Os resultados da resolução da equação de Hartree-Fock têm informações preciosas para os químicos, tais como a afinidade eletrônica e o potencial de ionização estabelecidos pelo Teorema de Koopmans. Entretanto, a equação de HF é uma equação íntegro-diferencial. Seria oportuna uma forma de resolver a equação de HF de forma algébrica, o que economizaria esforço computacional. Este avanço foi dado pela introdução de um conjunto de funções de base, proposto por Roothaan, que mostrou que as equações íntegro-diferenciais poderiam ser resolvidas através de cálculos com matrizes. Assim, a função de onda seria expandida em um conjunto de funções, da seguinte forma:

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \phi_{\mu} \quad i = 1, 2, \dots, K$$

Equação 10

Pela Equação 10, a função de onda ψ_i seria exatamente expandida se o conjunto de base ϕ_{μ} fosse infinito. Entretanto, este requerimento não pode ser satisfeito por razões técnicas. Assim, deve-se escolher um conjunto de funções que possam descrever da melhor maneira possível a função de onda ψ_i .

Dado, então, um conjunto de funções de base conhecido, o problema de se expandir a função de onda ψ_i torna-se uma questão de descobrir-se o melhor

conjunto de coeficientes $C_{\mu i}$, que pode ser obtido pela substituição da Equação 10 em 8, dando:

$$f(1) \sum_{\mu} C_{\mu i} \phi_{\mu}(1) = \varepsilon_i \sum_{\mu} C_{\mu i} \phi_{\mu}(1)$$

Equação 11

Através da multiplicação pela esquerda por $\phi_{\mu}^*(1)$ e integrando, transforma-se a Equação 11 em uma equação matricial:

$$\sum_{\mu} C_{\mu i} \int dr_1 \phi_{\mu}^*(1) f(1) \phi_{\mu}(1) = \varepsilon_i \sum_{\mu} C_{\mu i} \int dr_1 \phi_{\mu}^*(1) \phi_{\mu}(1)$$

Equação 12

da qual pode-se definir duas matrizes importantes para o cálculo HF: a matriz de *overlap*, **S** e a matriz de *Fock*, **F**.

A matriz de *overlap* pode ser escrita da seguinte forma:

$$S_{\nu\mu} = \int dr_1 \phi_{\nu}^*(1) \phi_{\mu}(1)$$

Equação 13

sendo uma matriz $K \times K$ hermitiana com $0 \leq S \leq 1$.

A matriz de *Fock* é:

$$F_{\nu\mu} = \int dr_1 \phi_{\nu}^*(1) f(1) \phi_{\mu}(1)$$

Equação 14

onde $f(1)$ é o operador de um elétron e qualquer conjunto de funções de um elétron define uma representação matricial deste operador.

Com estas matrizes definidas, pode-se reescrever a Equação 10 da seguinte forma:

$$\sum_{\mu} F_{\nu\mu} C_{\mu i} = \varepsilon_i \sum_{\mu} S_{\nu\mu} C_{\mu i} \quad i = 1, 2, \dots, K$$

Equação 15

A Equação 15, escrita na forma matricial, ou seja, usando as representações matriciais dos operadores tem a seguinte forma:

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\boldsymbol{\varepsilon}$$

Equação 16

Para resolver a Equação 16, entretanto, é necessário uma forma explícita para a matriz de Fock e para isso é preciso a introdução do conceito de matriz densidade.

Para um elétron descrito pela função espacial $\psi_a(\mathbf{r})$, então a probabilidade de encontrar o elétron em um elemento de volume $d\mathbf{r}$ em um ponto \mathbf{r} é $|\psi_a(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r}$ e pode-se definir a **densidade de carga**, $\rho(\mathbf{r})$, como $|\psi_a(\mathbf{r})|^2$ que pode ser escrita como:

$$\rho(\mathbf{r}) = 2 \sum_a^{N/2} |\psi_a(\mathbf{r})|^2$$

Equação 17

Para uma molécula de camada fechada, onde cada ψ_a contenha dois elétrons, sendo que se for realizada a integração da Equação 17, deve corresponder ao número total de elétrons:

$$\int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) = 2 \sum_a^{N/2} |\psi_a(\mathbf{r})|^2 = 2 \sum_a^{N/2} 1 = N$$

Equação 18

Para um determinante simples, a Equação 18 mostra que a densidade total de carga é a soma da densidade de carga de cada um dos elétrons.

Inserindo a Equação 10 na Equação 17, tem-se:

$$\begin{aligned} \rho(\mathbf{r}) &= 2 \sum_a^{N/2} \psi_a^*(\mathbf{r}) \psi_a(\mathbf{r}) \\ &= 2 \sum_a^{N/2} \sum_{\mu} C_{\mu a}^* \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}) \sum_{\nu} C_{\nu a} \phi_{\nu}(\mathbf{r}) \\ &= \sum_{\nu\mu} \left[2 \sum_a^{N/2} C_{\nu a} C_{\mu a}^* \right] \phi_{\nu}(\mathbf{r}) \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}) \\ &= \sum_{\nu\mu} P_{\nu\mu} \phi_{\nu}(\mathbf{r}) \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}) \end{aligned}$$

Equação 19

onde é definida a **matriz densidade**:

$$P_{\nu\mu} = 2 \sum_a^{N/2} C_{\nu a} C_{\mu a}^*$$

Equação 20

A matriz de Fock é a representação matricial do operador de Fock, mostrado na equação 7, na base $\{\phi_{\mu}\}$, ou seja:

$$\begin{aligned}
F_{v\mu} &= \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) f(1) \phi_\mu(1) \\
&= \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) h(1) \phi_\mu(1) + \sum_a^{\frac{N}{2}} \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) [2J_a(1) - K_a(1)] \phi_\mu(1) \\
&= H_{v\mu}^{core} + \sum_a^{\frac{N}{2}} 2(v\mu|aa) - (v\mu|a\mu)
\end{aligned}$$

Equação 21

onde a matriz do Hamiltoniano do core é definida como:

$$H_{v\mu}^{core} = \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) h(1) \phi_\mu(1)$$

Equação 22

Os elementos de matriz do Hamiltoniano do core são integrais envolvendo o operador de um elétron, $h(1)$, descrevendo a energia cinética e potencial do elétron. Assim, as expressões da energia cinética (T) e potencial (V) podem ser escritas:

$$\begin{aligned}
T_{v\mu} &= \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) \left[-\frac{1}{2} \nabla_1^2 \right] \phi_\mu(1) \\
V_{v\mu}^{nuclear} &= \int d\mathbf{r} \phi_v^*(1) \left[-\sum_A \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{R}_A|} \right] \phi_\mu(1)
\end{aligned}$$

Equação 23

podendo-se com estas definições escrever o Hamiltoniano do core da seguinte forma:

$$H_{v\mu}^{core} = T_{v\mu} + V_{v\mu}^{nuclear}$$

Equação 24

O próximo passo na representação da matriz de Fock é a representação específica da parte que representa as integrais de dois elétrons. Assim, retornando à Equação 21 e inserindo a expansão para representação dos orbitais moleculares, tem-se:

$$\begin{aligned}
 F_{\nu\mu} &= H_{\nu\mu}^{core} + \sum_a \sum_{\lambda\sigma}^{N/2} C_{\lambda a} C_{\sigma a}^* [2(\nu\mu|\sigma\lambda) - (\nu\lambda|\sigma\mu)] \\
 &= H_{\nu\mu}^{core} + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} [(\nu\mu|\sigma\lambda) - \frac{1}{2}(\nu\lambda|\sigma\mu)] \\
 &= H_{\nu\mu}^{core} + G_{\nu\mu}
 \end{aligned}$$

Equação 25

sendo $G_{\nu\mu}$ a parte que representa as integrais de dois elétrons na matriz de Fock. Assim, esta expressão contém uma parte que representa o cálculo das integrais de um elétron (H^{core}) e outra parte que depende da matriz densidade \mathbf{P} , a parte das integrais de dois elétrons \mathbf{G} .

Devido ao fato dos termos de repulsão intereletrônica não serem separáveis, deve-se recorrer a um procedimento iterativo para sua resolução. Este procedimento foi introduzido por Douglas Hartree, em 1928, e é chamado de Método do Campo Auto-Consistente de Hartree, SCF (do inglês *Self-Consistent Field Method*) e pode ser observado em seu funcionamento através da Figura 6 a seguir:

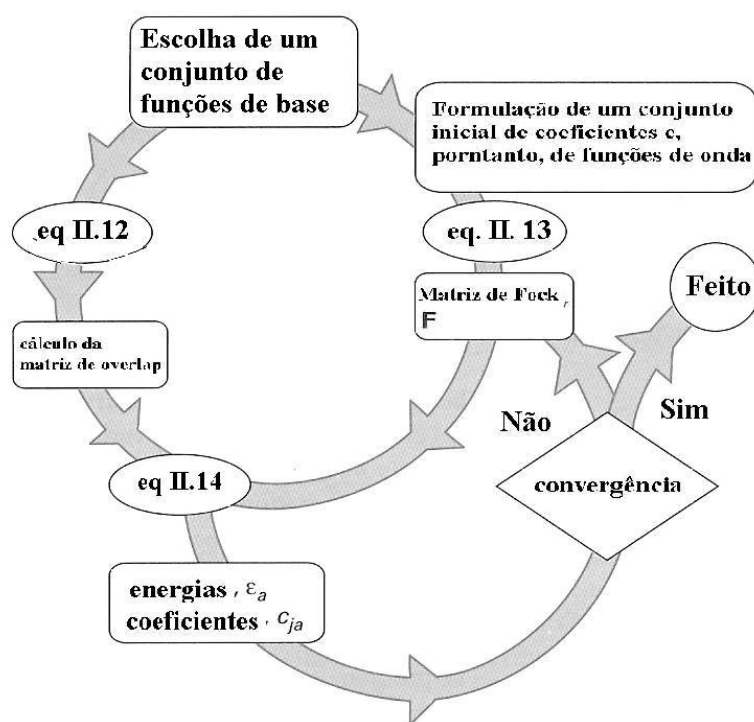


Figura 6: Esquema de um ciclo do Método do Campo Auto-Consistente.

Os cálculos HF podem ser considerados de duas formas diferentes. Quando se realizam cálculos sobre um sistema no qual se considera que os orbitais que representam os elétrons de spin *up* e aqueles que representam os de spin *down* são condicionados a terem a mesma parte espacial, diz-se que o cálculo HF realizado é um cálculo HF restrito. Neste caso, as equações usadas são as equações de Roothaan, vistas anteriormente.

Todavia, quando esta condição não é imposta, ou seja, a parte espacial dos orbitais que representam os spins *up* e *down* são diferentes, tem-se um cálculo HF não-restrito, que faz uso das equações de Pople-Nesbet descritas abaixo.

Levando em conta, então, esta diferença espacial, deve-se construir funções de onda da seguinte forma:

$$|\Psi_{\text{UHF}}\rangle = |\Psi_1^\alpha \bar{\Psi}_1^\beta \dots\rangle$$

Equação 26

A equação de HF é escrita como a Equação 8:

$$f(I)\chi_i = \varepsilon_i \chi_i$$

Equação 27

mas, devem ser inseridos os orbitais não-restritos:

$$\chi_i(x) = \begin{cases} \psi_j^\alpha(r)\alpha(\omega) \\ \psi_j^\beta(r)\beta(\omega) \end{cases}$$

Equação 28

Assim, considerando apenas o orbital ψ_j^α para efeito de simplicidade a substituição da Equação 28 em 27 resulta em:

$$f(I)\psi_j^\alpha(\mathbf{r})\alpha(\omega) = \varepsilon_j^\alpha \psi_j^\alpha(\mathbf{r})\alpha(\omega)$$

Equação 29

A energia obtida na Equação 29 diz respeito ao orbital α , pois com diferentes partes espaciais as energias para os orbitais não-restritos seriam também diferentes. A Equação 29 considerou apenas a parte α , mas a parte em β também pode ser escrita da mesma forma, ou seja, fazendo as multiplicações necessárias para a eliminação do spin dessas equações obtém-se:

$$\begin{aligned} f(I)\psi_j^\alpha(1) &= \varepsilon_j^\alpha \psi_j^\alpha(1) \\ f(I)\psi_j^\beta(1) &= \varepsilon_j^\beta \psi_j^\beta(1) \end{aligned}$$

Equação 30

Para a resolução das equações II.30, deve-se, da mesma forma que para as equações formadas no caso restrito, introduzir um conjunto de base para expandir a função de onda. Assim, as funções de onda podem ser escritas da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \psi_j^\alpha &= \sum_{\mu=1}^K C_{\mu j}^\alpha \phi_\mu & i = 1, 2, \dots, K \\ \psi_j^\beta &= \sum_{\mu=1}^K C_{\mu j}^\beta \phi_\mu & i = 1, 2, \dots, K \end{aligned}$$

Equação 31

Realizando as devidas multiplicações, chega-se à forma não-restrita da Equação 15, que em forma matricial é escrita como:

$$\mathbf{F}^{\alpha} \mathbf{C}^{\alpha} = \mathbf{S} \mathbf{C}^{\alpha} \boldsymbol{\varepsilon}^{\alpha}$$

$$\mathbf{F}^{\beta} \mathbf{C}^{\beta} = \mathbf{S} \mathbf{C}^{\beta} \boldsymbol{\varepsilon}^{\beta}$$

Equação 32

As Equações 32 são generalizações não-restritas das equações restritas de Roothaan. A maneira de se resolver o procedimento SCF, mostrado na Figura 6, é essencialmente o mesmo. Vale ainda lembrar que quando o número de elétrons α é igual ao de elétrons β , os resultados apresentados pelas equações de Roothaan são os mesmos obtidos pelas equações de Pople-Nesbet.

O método Hartree-Fock é imprescindível para que cálculos em sistemas com muitos elétrons sejam factíveis. Entretanto, existe um fator importante não levado totalmente em consideração pelo método de HF, a correlação eletrônica. Tal propriedade pode ser entendida como a influência sentida por um elétron devido à presença dos outros elétrons do sistema.

Esta correlação pode ser avaliada através da Energia de Correlação (E_{corr}), definida como:

$$E_{corr} = \varepsilon_0 - E_0$$

Equação 33

onde ε_0 é a energia exata não relativística do sistema e E_0 é a energia HF.

Esta energia é responsável pela predição mais exata de várias propriedades, tal como a energia de dissociação da molécula de H_2 , ou seja, a dissociação de uma molécula de camada fechada em fragmentos que apresentam camada aberta.

Assim, para se obter uma descrição mais exata de várias propriedades e do sistema como um todo, alguns métodos que levam em consideração a E_{corr} foram

desenvolvidos, podendo-se citar, entre eles, o Método da Interação de Configurações, MIC (CI – *Configuration Interaction*), o método que aplica a Teoria de Perturbação (TP), o método de Coupled Cluster (CC) e a Teoria do Funcional da Densidade TFD – (**em inglês DFT – *Density Functional Theory***), que, apesar de não derivar do método de HF, leva em consideração a correlação eletrônica quando da formulação dos funcionais, como será demonstrado quando se tratar da DFT.

3.2 Teoria do Funcional da Densidade – *Density Functional Theory* (DFT)

Em 1927 e 1928 foram lançadas, por Thomas e Fermi (Thomas, 1927; Fermi, 1928), as bases do que mais tarde seria o ponto de partida para Hohenberg e Kohn (Hohenberg & Kohn, 1964) proporem a Teoria do Funcional da Densidade –DFT (sigla em inglês). Segundo estes pesquisadores, o movimento dos elétrons deveria ser considerado não-correlacionado e que a energia cinética do sistema poderia ser descrita como uma aproximação baseada em elétrons livres através da relação:

$$n(\mathbf{r}) = N \int d\mathbf{r}_2 \dots \int d\mathbf{r}_N \Psi^*(\mathbf{r}, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$$

Equação 34

sendo que esta integral pode ser mais facilmente descrita que a função de onda Ψ .

Pouco tempo após estes trabalhos iniciais, Dirac propôs que os efeitos de troca poderiam ser incluídos como um termo derivado da densidade de troca de um sistema homogêneo (Dirac, 1930). Os resultados obtidos por Dirac foram

adotados por Gaspar que obteve resultados segundo os quais o potencial de troca poderia ser obtido de uma forma um pouco diferente a partir de um argumento variacional (Gaspar, 1954). Estes resultados mostraram que as aproximações baseadas em sistemas homogêneos poderiam ser utilizadas com algum sucesso mesmo em sistemas que não fossem uniformes.

No tratamento de Thomas-Fermi, os elétrons são tratados como partículas independentes e as interações elétron-elétron aparecem apenas na forma de energia eletrostática:

$$E_{ee}[n] = \frac{e^2}{2} \int d\mathbf{r} \int d\mathbf{r}' \frac{n(\mathbf{r})n(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}$$

Equação 35

Ademais, é assumido que a energia cinética é dada por:

$$T[n] = \int d\mathbf{r} t[n(\mathbf{r})]$$

Equação 36

onde $t[n]$ é a densidade energia cinética para um sistema de elétrons não interagentes, o que seria uma boa aproximação apenas se $n(\mathbf{r})$ variasse muito vagarosamente no espaço, ou seja, que os elétrons “sentissem” como em um meio homogêneo.

A energia cinética inicial para este sistema é dada por:

$$T_0[n] = C_k \int d\mathbf{r} [n(\mathbf{r})]^{5/3}$$

Equação 37

Onde:

$$C_k = 3\hbar(3\pi^2)^{2/3} / 10m$$

Equação 38

Realizando a minimização do funcional $E[n]$, com a condição de que o número de elétrons permaneça constante, tem-se a equação de Thomas-Fermi:

$$\frac{5}{3} C_k n(\mathbf{r})^{2/3} + e^2 \int d\mathbf{r}' \frac{n(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} - V_{ext}(\mathbf{r}) + \lambda = 0$$

Equação 39

O método de Thomas-Fermi foi bastante utilizado no passado, apesar de fornecer resultados não tão bons para algumas propriedades, como a densidade de carga e o potencial eletrostático, além de apresentar algumas deficiências, como não prever ligação química. Apesar disso, ele é um método exato no limite da carga nuclear infinita.

Contudo, mesmo com algumas deficiências, todos estes trabalhos firmaram uma sólida base no conceito de que a densidade poderia ser utilizada como uma maneira alternativa para a realização de cálculos quânticos. Entretanto, a demonstração de que as propriedades do estado fundamental de um sistema com partículas interagentes, particularmente a energia total E , foi dada por Hohenberg e Kohn, no qual o formalismo mostrado por estes pesquisadores é, em princípio, exato e o formalismo de Thomas-Fermi pode ser derivado como uma aproximação.

De fato, Hohenberg e Kohn propuseram alguns teoremas que fundamentaram o formalismo da DFT e suas mais variadas aplicações. Eles provaram que:

- Qualquer observável em um sistema quantum-mecânico estacionário (incluindo a energia) pode ser calculada exatamente, a princípio, a partir da densidade do estado fundamental apenas, ou seja, qualquer observável pode ser escrita como um funcional da densidade do estado fundamental.
- A densidade do estado fundamental pode ser calculada exatamente, a princípio, usando o método variacional envolvendo apenas a densidade.

Estes teoremas, que embora tenham sido propostos originalmente para o estado fundamental e independente do tempo, originaram-se como perguntas interessantes sobre um assunto bem conhecido dentro do escopo da quântica: a relação dos núcleos atômicos e o movimento dos elétrons, o que leva à aproximação de Bohr-Oppenheimer, na qual o estado fundamental do sistema eletrônico é resultado da posição dos núcleos, ou seja, dentro do Hamiltoniano eletrônico:

$$H_{ele} = T_e + U_{ee} + V_{ext}$$

Equação 40

onde a energia cinética dos elétrons, T_e , e a energia potencial intereletrônica, U_{ee} , são condicionadas pelo potencial externo V_{ext} . Uma vez que este potencial é determinado e aplicado, estas quantidades “ajustam-se” a ele para obter o estado energético mais estável possível.

Hohenberg e Kohn propuseram a questão relacionada ao potencial externo de uma maneira alternativa: o potencial externo, V_{ext} , pode ser completamente determinado pelo conhecimento da densidade eletrônica, $n(\mathbf{r})$? Pode-se encontrar onde e como os núcleos estão conhecendo-se a densidade, $n(\mathbf{r})$? A resposta para estas questões, caso seja afirmativa, é importante, pois a partir do conhecimento

da densidade eletrônica qualquer informação sobre o sistema pode ser determinada. E esta resposta é afirmativa.

Dois pontos são importantes para entender as deficiências do tratamento proposto por Thomas-Fermi: um deles é a descrição problemática da energia cinética dos elétrons e o outro é assumir que os elétrons movimentam-se de forma independente, ou seja, sem correlação. Várias tentativas de melhora foram propostas, mas a melhor forma de refinar o cálculo da energia total foi proposta por Kohn e Shan, levando à equação (Sham & Kohn, 1966):

$$E[n] = T_0[n] + \int d\mathbf{r} n(\mathbf{r}) [V_{ext}(\mathbf{r}) + \frac{1}{2} \Phi(\mathbf{r})] + E_{XC}[n]$$

Equação 41

onde T_0 é a energia cinética que o sistema de densidade n teria se não houvesse interação eletrônica, Φ é o potencial coulombiano clássico para elétrons e E_{XC} não pode ser calculada exatamente tornando-se, assim, importante para a descrição da energia e de todas as outras propriedades do sistema. Este funcional, E_{XC} , conhecido como funcional de troca e correlação, inclui todos os fatores importantes para a descrição das propriedades do sistema que não foram incluídos nos termos anteriores, ou seja:

- o fator de troca eletrônica
- a correlação eletrônica
- a parte da energia cinética que é necessária para corrigir T_0
- a correção de auto-interação introduzida pelo potencial coulombiano

O potencial químico, μ , é uma expressão importante que pode ser descrita em termos da densidade através da relação:

$$\mu = \frac{\delta E[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})} = \frac{\delta T_0[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})} + \hat{V}_{ext}(\mathbf{r}) + \hat{U}_{cl}(\mathbf{r}) + \frac{\delta E_{xc}[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})}$$

Equação 42

Através desta relação pode-se definir um potencial efetivo:

$$\mu = \frac{\delta E[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})} = \frac{\delta T_0[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})} + \hat{V}_{ef}(\mathbf{r})$$

Equação 43

onde foram agrupados todos os termos, exceto a energia cinética das partículas não interagentes. Assim, este potencial efetivo é descrito por:

$$V_{ef}(\mathbf{r}) = V_{ext}(\mathbf{r}) + U_{cl}(\mathbf{r}) + V_{xc}(\mathbf{r})$$

Equação 44

onde o potencial de troca e correlação é definido como uma derivada funcional:

$$V_{xc} = \frac{\delta E_{xc}[n(\mathbf{r})]}{n(\mathbf{r})}$$

Equação 45

A equação que descreve o potencial químico assemelha-se à equação de Schrödinger para partículas não interagentes e pode ser resolvida a partir da expressão:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_{ef}(\mathbf{r}) \right] \phi_i^{KS}(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \phi_i^{KS}(\mathbf{r})$$

Equação 46

onde existe uma diferença bastante importante com relação à equação de Hartree-Fock, ou seja, nesta equação, o potencial efetivo depende de cada elétron criando um potencial que é diferente para cada elétron. No caso da Equação 46, o potencial não depende de cada elétron, mas sim apenas de \mathbf{r} , ou seja, é o mesmo potencial sentido por todos os elétrons. Os orbitais de Kohn-Shan são derivados desta equação e podem ser usados para computar a densidade total:

$$n(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^n |\phi_i^{KS}(\mathbf{r})|^2$$

Equação 47

Estes orbitais podem ser usados para melhorar a descrição de \hat{V}_{ef} que pode ser usado para iniciar um novo ciclo SCF. Assim, a procura por funcionais que descrevam o mais exatamente possível os efeitos de n em ambientes moleculares é, assim, tema de intenso trabalho, pois a partir de uma densidade inicial, n_0 , calcula-se o potencial, V_{xc} que é usado para calcular os orbitais de Kohn-Shan, e a partir daí a energia e todas as outras propriedades.

Alguns métodos são utilizados para escrever os funcionais. Como uma primeira aproximação neste sentido, pode-se considerar que a densidade local pode ser tratada como um gás de elétron homogêneo, ou seja, um sistema onde a densidade varia lentamente com as coordenadas. Neste caso pode-se escrever o funcional considerando-se a *Local Density Approximation* (LDA):

$$E_X^{LDA}[n] = \int \hat{\mu}(r) \varepsilon_x n(r) dr$$

Equação 48

Onde:

$$\varepsilon_x^{LDA}[n] = -C_x n^{1/3}$$

Equação 49

e:

$$C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3}$$

Equação 50

Todavia, em ambientes moleculares, esta aproximação não é suficientemente boa, pois a densidade varia rapidamente com as coordenadas e uma aproximação melhorada surgiu da consideração do spin dos elétrons na densidade, embora não sejam necessários para o cálculo da densidade local. Deste modo passou-se a utilizar a LSDA, (*Local Spin Density Aproximation*):

$$E_X^{LSDA}[n] = \int \hat{f}(r) \varepsilon_x [n_\downarrow(r) n_\uparrow(r)] dr$$

Equação 51

Onde:

$$\varepsilon_x^{LSDA}[n] = -2^{1/3} C_x \left[n_\downarrow^{1/3} + n_\uparrow^{1/3} \right]$$

Equação 52

A energia de correlação de um gás uniforme de elétrons pode ser calculada através do método de Monte Carlo para um número diferente de densidades.

Vosko têm construído algumas fórmulas para a estimativa desta energia (Vosko *et. al.*, 1980). Caso a densidade não seja uniforme, a energia de troca e correlação calculada usando a aproximação de um gás de elétrons uniforme não é uma boa aproximação. Uma forma de se melhorar a descrição do sistema é calcular a energia de troca e correlação através do gradiente da densidade total em uma aproximação conhecida como GGA (*Generalized Gradient Approximation*).

Existem várias propostas para o funcional E_{XC}^{GGA} , sendo as mais utilizadas atualmente as de Perdew-Burke-Erzenhof (Perdew *et. al.*, 1996), de Lee-Yang-Parr (Lee *et. al.*, 1988), de Perdew e Wang (Perdew & Wang, 1992) e de Becke (Becke, 1993).

Outros funcionais são construídos de uma forma mista, híbrida, no sentido de inserirem uma fração do termo de troca advindo do método de HF no funcional de troca da DFT, partindo-se de resultados experimentais obtidos para sistemas moleculares bem conhecidos, ou seja, constituindo uma forma semi-empírica de tratar o problema. Um exemplo deste tipo de funcional é o descrito na Equação 53:

$$E_{XC}^{B3} = (1 - a)E_X^{LSDA} + aE_X^{exata} + b\Delta E_X^{B88} + E_C^{LSDA} + c\Delta E_C^{GGA}$$

Equação 53

3.3 Conjuntos de Base

A utilização de conjuntos de base para a realização de cálculos químico-quânticos surgiu em 1954 com a proposta de Roothaan (Roothaan, 1951). A introdução destes conjuntos permitiu que cálculos moleculares pudessem ser realizados sem a necessidade de se resolver as equações de Hartree-Fock, como

era prática até então (Levine, 1991). Dessa forma, iniciou-se a busca por conjuntos de base que melhor respondessem às necessidades de cada utilização.

O procedimento de construção de um conjunto de base demanda um esforço considerável, no que diz respeito ao tempo de busca do melhor conjunto de funções para descrever o sistema e as propriedades desejadas. Este tempo é plenamente justificável, desde que a qualidade de tal conjunto é fator imprescindível na obtenção de resultados de qualidade aliado ao formalismo utilizado para a construção da função de onda.

Estes conjuntos de base podem ser construídos utilizando-se funções que possuam algumas propriedades, tais como serem bem comportadas no intervalo utilizado e, também, serem contínuas. Assim, qualquer função que obedeça, entre outras, a estas condições, pode servir como uma função de base. E entre as funções de base mais conhecidas estão as Funções do Tipo Slater (FTSSs) e as Funções Tipo Gaussianas (FTGSs). As FTSSs podem ser escritas a seguinte forma:

$$\phi(r, \theta, \varphi) = [(2n!)]^{-1/2} (2\alpha)^{n+1/2} r^{n-1} e^{-\alpha r} Y_{l,m}(\theta, \varphi)$$

Equação 54

onde n e α são parâmetros variacionais, l e m são números quânticos e $Y_{l,m}(\theta, \varphi)$ é um harmônico esférico. Estas funções apresentam um comportamento em valores pequenos e grandes de r e sua semelhança com as funções que são soluções do átomo de Hidrogênio fazem dela uma opção natural para cálculos atômicos. Entretanto, quando o cálculo deve ser transferido para uma molécula, as integrais multicêntricas geradas pela utilização de FTSSs são de difícil resolução, o que fez com que os pesquisadores buscassem outra alternativa que surgiu na forma de FTGs que podem ser representadas da seguinte forma:

$$\phi(\mathbf{r}, \theta, \varphi) = N r^{n-1} e^{-\alpha r^2} Y_{l,m}(\theta, \varphi)$$

$$N = \frac{2^{2n+3/2}}{(2n-1)! \sqrt{\pi}} \alpha^{(2n+1)/4}$$

Equação 55

onde N é uma constante de normalização, α é um parâmetro variacional e $Y_{l,m}(\theta, \varphi)$ é um harmônico esférico. A introdução destas funções foi feita por Boys (Boys, 1950) e, apesar de não apresentarem o mesmo comportamento mostrado pelas FTSSs para valores de r grandes ou pequenos, sua popularidade reside no fato de que a resolução das integrais multicêntricas torna-se mais fácil do que quando se utiliza FTSSs.

Assim, deve-se utilizar uma combinação de FTGs para que represente de maneira satisfatória uma FTSS, como pode ser observado pelas Figuras 7, 8 e 9 a seguir:

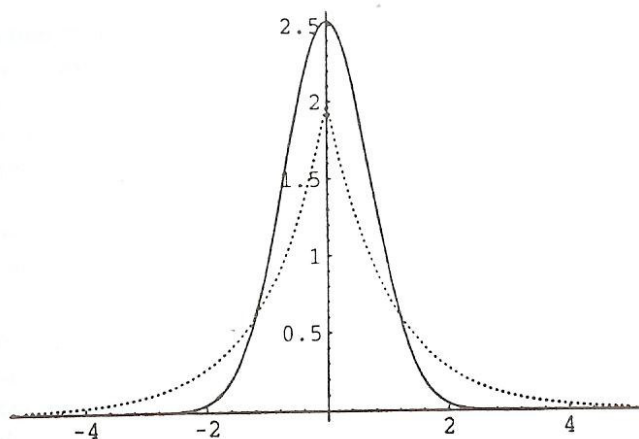


Figura 7: Comportamento de uma FTGs em relação a uma FTSSs.

A Figura 7 mostra o comportamento de uma FTGs em relação a uma FTSSs. Pode-se observar que a curva que representa a FTSSs (linha pontilhada) tem um comportamento mais adequado às necessidades do problema de representação da

parte radial dos “orbitais”, ou seja, um decaimento suave e uma boa representação da região próxima do núcleo. Para que as FTGs possam representar o melhor possível as FTSs deve-se utilizar uma combinação de FTGs, como mostrado nas Figuras 8 e 9.

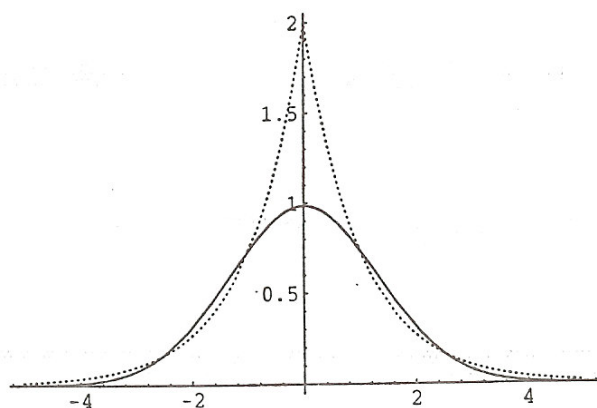


Figura 8: Representação do orbital 1s do H utilizando uma FTGs (linha sólida) e uma FTSs (linha pontilhada).

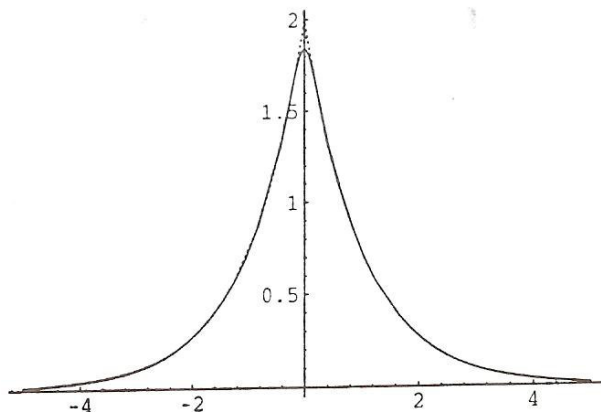


Figura 9: Representação do orbital 1s do H utilizando quatro FTGs (linha sólida) e uma FTSs (linha pontilhada).

Assim, apesar do uso de FTGS aumentar o número de funções de base, o que aumenta o esforço computacional, a resolução de integrais multicêntricas fica facilitada, justificando, assim o uso de FTGS.

Para que estes conjuntos possam melhor descrever o sistema em estudo alguns parâmetros são otimizados, ou seja, os expoentes das funções, que podem

ser otimizados individualmente (conhecido como “otimização bruta”) e que apesar de produzir bons resultados exige um esforço computacional considerável, levando-se em conta o número de expoentes a serem otimizados, favorecendo, então, a construção de conjuntos de base de pequena dimensão.

A descrição da estrutura eletrônica de átomos pode ser feita para cada átomo individualmente, sendo o conjunto de base dessa forma construído conhecido como “conjunto de base adaptado”, tendo como trabalho inicial os conjuntos desenvolvidos por Huzinaga (Huzinaga, 1965), foram construídos especialmente para os elementos de número atômico de 1 a 10. Alternativamente, tais conjuntos podem ser construídos para descrever uma série de átomos, ou seja, a construção de um conjunto de base universal. A primeira referência na literatura deste tipo de conjunto de base aponta para o trabalho de Silver e Nieuwpoort (Silver & Nieuwpoort, 1978), que construíram um conjunto de base universal utilizando FTSs, contando com 9 funções para a simetria s e 6 para a simetria p (para o maior conjunto) para os átomos de He, Be, B, C, N, O, F, Ne, Mg, e Ar. Este tipo de conjunto de base, denominado “conjunto de base universal”, foi depois desenvolvido por outros grupos utilizando-se também FTGs (Dasilva 1993; Dasilva *et. al.*, 1989).

Além de poderem ser construídos para descrever átomos únicos ou um grupo deles, os conjuntos de base podem, também, ser construídos para descrever propriedades específicas, tais como as propriedades elétricas, como os conjuntos construídos por Sadlej (Sadlej, 1988; Roos & Sadlej, 1985; Wolinski *et. al.*, 1985) ou os conjuntos desenvolvidos por Pople, para descrever a geometria molecular (Hehre *et. al.*, 1972; Dill & Pople, 1975; Collins, 1976; Binkley & Pople, 1977; Binkley *et. al.*, 1980; Gordon, 1982).

4. OBJETIVOS

4.1 Geral: Estudar teoricamente a reação de síntese do corismato a partir do EPSP realizado pela enzima corismato sintase.

4.2 Específicos:

a) Descobrir as conformações geométricas mais estáveis para os compostos da reação.

b) Obter o estado de transição da reação.

c) Obter informações sobre propriedades eletrônicas, tais como, orbitais HOMO, LUMO, e densidade eletrônica NBO.

d) Analisar as informações e publicá-las de modo a fornecer dados químicos ainda não existentes subsidiando maior entendimento da controversa reação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O método aplicado consistiu em uma abordagem químico-teórica utilizando-se cálculos de mecânica quântica para o estudo da reação, para tanto, as ferramentas a serem utilizadas foram: a) Pacote Gaussian 03W; b) Visualizador gráfico Gauss03 ViewTM; c) Hyperchem 7.0, d) 1 computador pentium IV, 1G de memória ram.

5.1 Modelo Utilizado

O modelo adotado para estudar a reação utilizou as estruturas da enzima corismato sintase, da coenzima flavinamonucleotideo (FMN) e a do substrato Enolpiruvilchimato-3-fosfato (EPSP) alocados no sitio ativo da enzima obtidas no Protein Data Bank (PDB), sob o código 1QXO. As estruturas foram então visualizadas e editadas utilizando o software HyperChem 7.0 (HyperChem TM), onde foi isolado primeiramente o sitio ativo da enzima e posteriormente apenas o substrato (EPSP). O produto da reação da enzima corismato sintase, foi modelado a partir do reagente EPSP no software HyperChem 7.0.

O estudo iniciou-se com uma otimização com o software Gaussian 03WTM (Frisch, *et. al.*, 2003) a 310.15 K utilizando funcional B3LYP, que combina o híbrido de troca de Becke de três parâmetros (B3) (Becke 1997) e funcional de correlação (LYP), de Lee-Yang-Parr (Lee *et. al.*, 1988) e a base 6-31+G(d,p) (Hehre, *et. al.*, 1972; Hariharan & Pople, 1973), que compreende 6 funções gaussianas primitivas para descrever os elétrons do core atômico e os números após o hífen indicam o número de primitivas nas funções de valência, sendo que

destas 3 estão contraídas e duas estão puras. O símbolo (d,p) indica que esta são duas funções polarizada, o que descreve melhor os orbitais. As funções difusas, simbolizadas por +, são importantes para a descrição de orbitais moleculares de ânions, estados eletrônicos excitados, interações intra e intermoleculares. Posteriormente, com ajuda do Hyperchem, a estrutura do substrato foi modificada de modo a ser convertida no produto da reação desejada, o corismato, que teve sua geometria otimizada sob as mesmas condições do reagente EPSP.

Posterior à otimização de geometria dos compostos, realizou-se os cálculos de diversas propriedades eletrônicas tais, como:

- Distâncias interatômicas
- Densidade eletrônica
- Energia molecular
- Orbitais moleculares HOMO e LUMO

O estado de transição foi obtido a partir das estruturas do reagente e do produto através do pacote Gaussian 03WTM por meio de um procedimento QST2 (Pleng & Schlegel, 1993; Plenge *et. al.*, 1996) onde a estrutura de transição é gerada tendo dois compostos iniciais (reagente e produto) como pontos de partida e chegada, então se encontra a estrutura intermediária entre os dois. As propriedades eletrônicas também foram calculadas para o estado de transição.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Dados Estruturais

Os resultados estão separados em dados estruturais e eletrônicos. Os dados estruturais são classificados em: distâncias interatômicas, que dizem respeito às geometrias mais estáveis para as espécies estudadas.

As espécies que tiveram sua geometria otimizada e suas respectivas propriedades calculadas foram: o reagente EPSP, produto Corismato e o estado de transição. Todos na forma aniônica, a mesma na qual se encontram em pH fisiológico (Westheimer, F. H. 1987).

A título de comparação, o mesmo procedimento adotado para as espécies iônicas foi repetido com todos os oxigênios agora hidrogenados podendo fornecer resultados acerca do papel da estabilização das cargas negativas das espécies envolvidas na reação.

Algumas considerações são necessárias acerca da numeração dos átomos, que é feita automaticamente pelo software Gaussian 03WTM, portanto não obedece necessariamente às regras de numeração estabelecidas pela IUPAC. Devido a isso, os dados serão analisados de acordo com a numeração utilizada pelo software, como mostrado nas Figuras 10 e 11.

Em cada gráfico, nos eixos das abscissas são encontrados pontos indicados pela letra “B” e seus respectivos numerais. Tais pontos representam as ligações atômicas e o número de cada uma. Portanto “B1” representa a ligação 1. As Tabelas associadas a cada gráfico mostram quais átomos formam cada ligação.

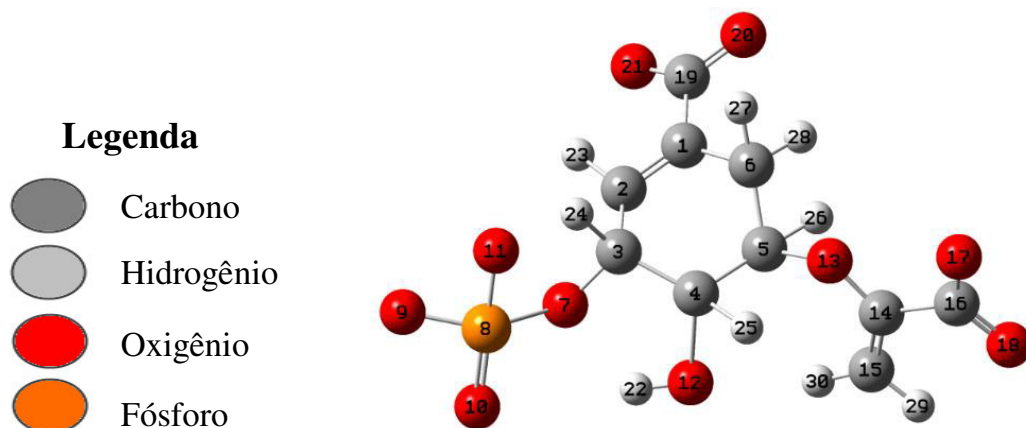


Figura 10: Numeração dos átomos adotadas para a análise dos resultados do EPSP iônico.

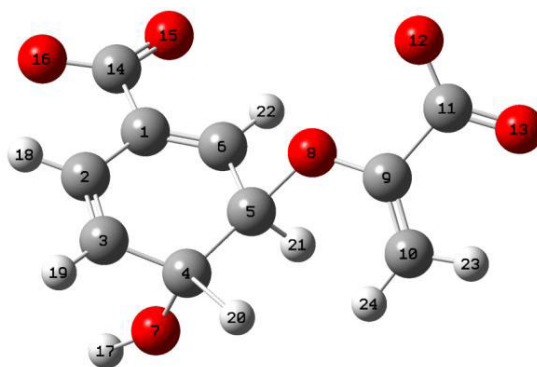


Figura 11: Numeração dos átomos adotadas para a análise dos resultados do Corismato iônico.

A posterior adição de hidrogênios será exibida nas estruturas otimizadas. A estrutura do estado de transição segue a mesma numeração do reagente EPSP.

6.2 Reagente EPSP

6.2.1 Distâncias Interatômicas

Com fórmula molecular $C_{10}H_9O_{10}P$, o reagente EPSP aniônico está definido com 29 ligações.

A estrutura do reagente após o procedimento de otimização geométrica, está mostrado nas figuras 12 e 13.

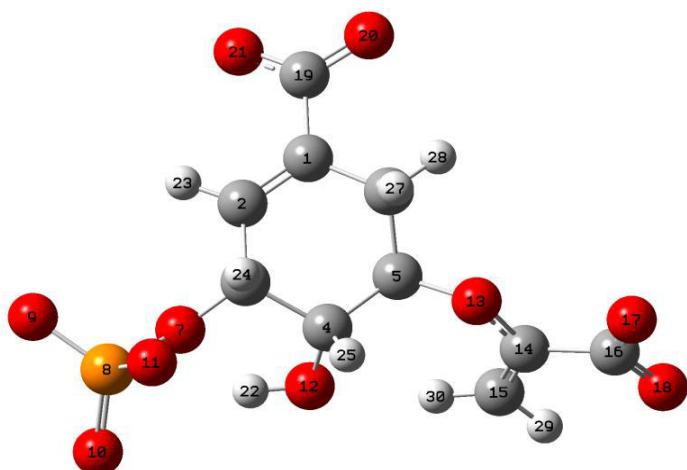


Figura 12: Estrutura do EPSP otimizado (perspectiva 1)

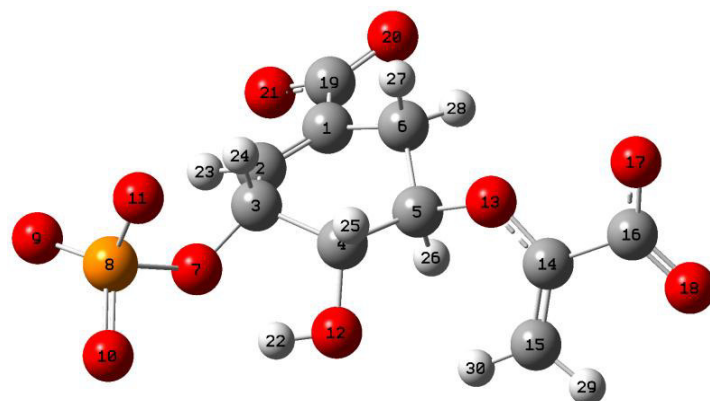


Figura 13: Estrutura do EPSP otimizado (perspectiva 2)

Nota-se que H-22 encontra-se projetado em direção ao O-7 e, a distância entre os dois é de 1,75196 Å, uma distância suficiente para uma ligação de hidrogênio intramolecular. Além desta, uma outra ligação de hidrogênio pode ser formada entre H-22 e O-10 com 3,06724 Å de comprimento (Figura 14).

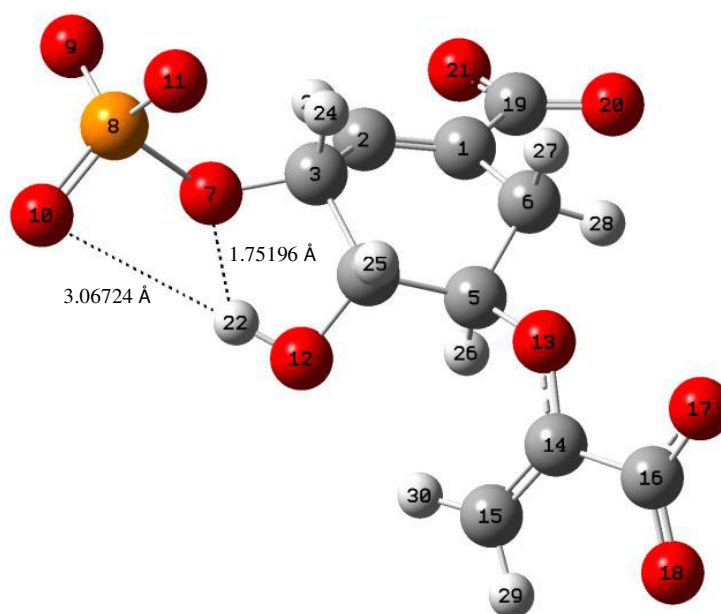
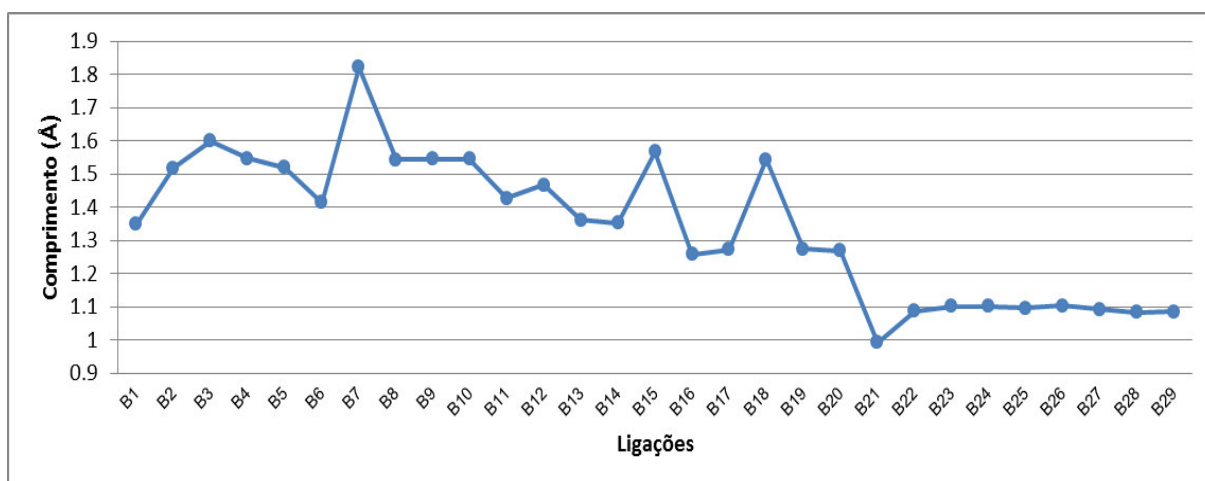


Figura 14: Interações intramoleculares no íon EPSP, uma entre H-22 e O-7 e uma possibilidade entre H-22 e O-10.

As distâncias interatômicas listadas na Tabela 1, podem ser melhor comparadas quando analisadas de acordo com o Gráfico 1.

Gráfico 1: Distâncias interatômicas no EPSP aniônico. A Tabela 1 detalha cada ligação do Gráfico 1.



As estruturas a seguir são as obtidas para o reagente protonado (figuras 15 e 16).

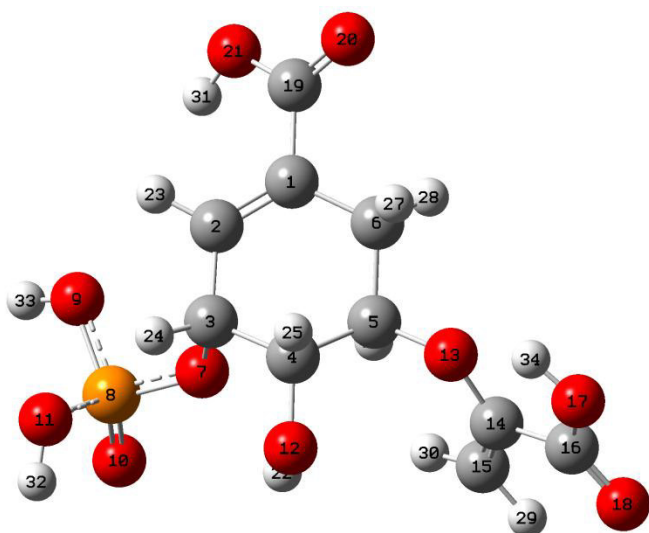


Figura 15: Estrutura do EPSP protonado otimizado (perspectiva 1)

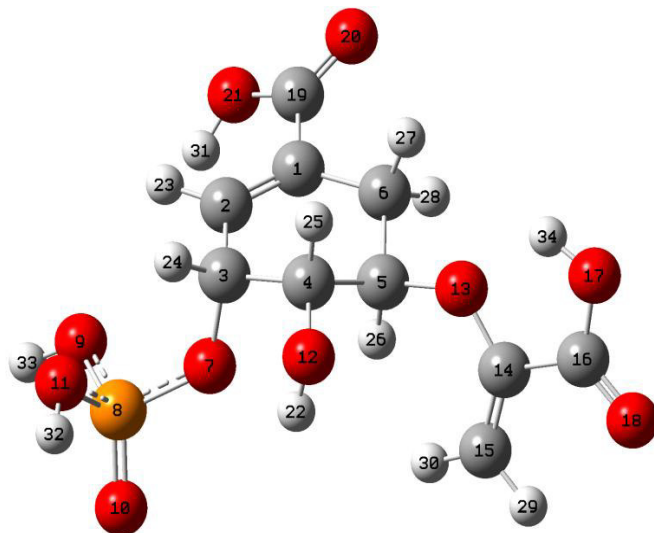


Figura 16: Estrutura do EPSP protonado otimizado (perspectiva 2)

Comparando-se as estruturas do EPSP protonado e iônico, a ligação de hidrogênio intramolecular entre H-22 e O-7 é dificultada, visto que o

comprimento da ligação aumenta de 1,75196 Å para 2.30710 Å e, a distância entre H-22 e O-10 de 3,06724 Å de comprimento, aumenta para 3,87081 Å, dificultando a formação de uma ligação de hidrogênio.

6.3 O Estado de Transição

O estado de transição é uma estrutura chave que pode fornecer respostas quanto ao mecanismo da reação.

Após a otimização do produto da reação na presença do fosfato e do hidrogênio que saem da estrutura do anel do EPSP a seguinte estrutura foi fornecida (Figuras 17 e 18) e usada no input como produto para o procedimento QST2.

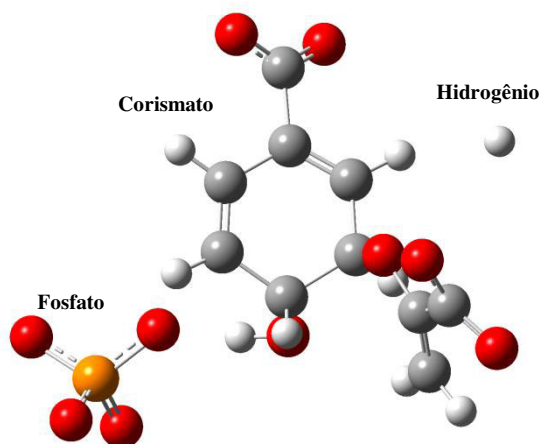


Figura 17: Corismato e subprodutos iônicos otimizados (1)

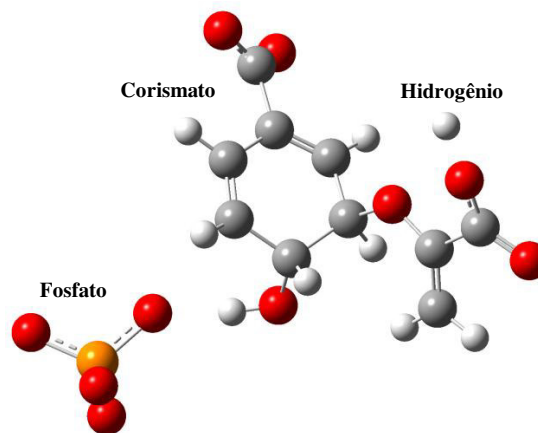


Figura 18: Corismato e subprodutos iônico otimizados (2)

Após a otimização do produto da reação na presença dos subprodutos fosfato e hidrogênio, preparou-se o input para então realizar o procedimento QST2, onde fornecemos como entradas no software Gaussian 03WTM as estruturas do reagente e do produto, obtêm-se então uma estrutura de transição que conecta as estruturas de entrada. O input está representado de acordo com a

Figura 19. Há a necessidade que os átomos do produto e reagente tenham a mesma numeração para o sucesso de cálculo.

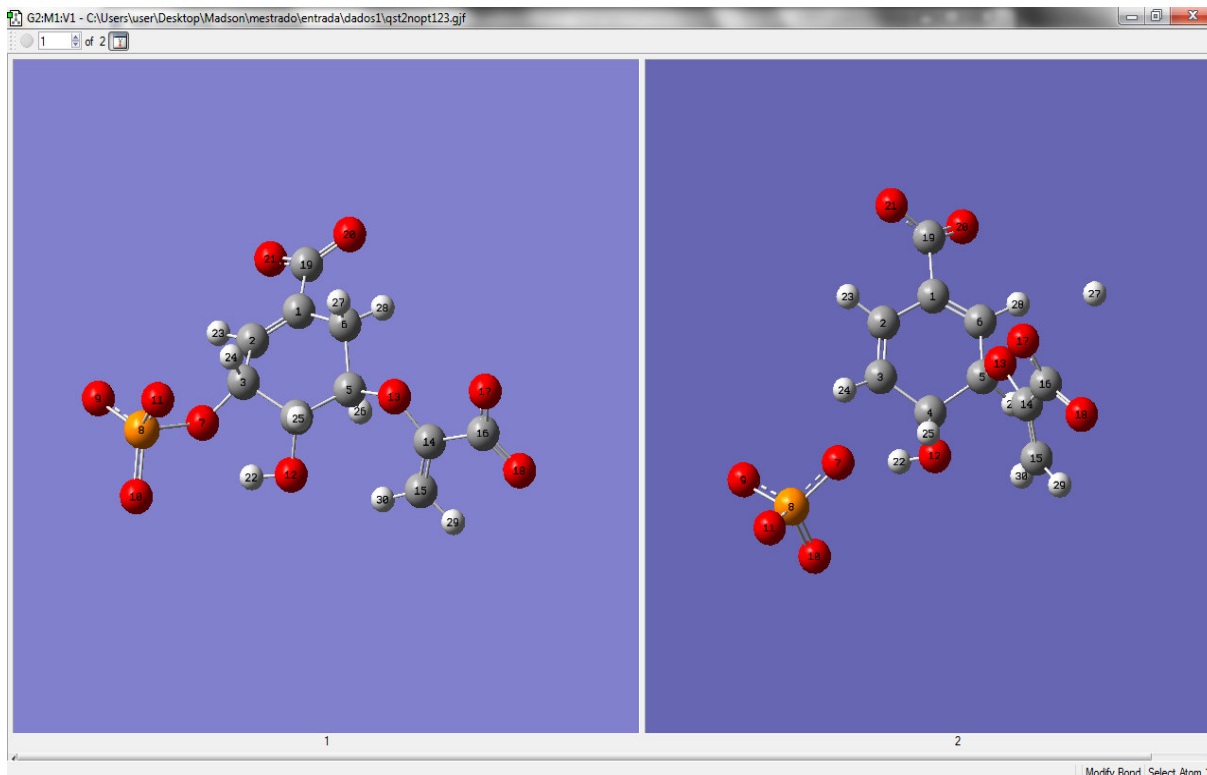


Figura 19: Representação do input do Gaussian para o procedimento qst2. O reagente está à esquerda e o produto à direita

Após a finalização do procedimento QST2, a estrutura resultante esclareceu a pergunta que advém ao observar o reagente e produto da reação: se o hidrogênio é retirado antes da saída do grupo fosfato ou se este primeiro sai para então a posterior saída do hidrogênio. As Figuras 20 e 21 mostram o estado de transição otimizado.

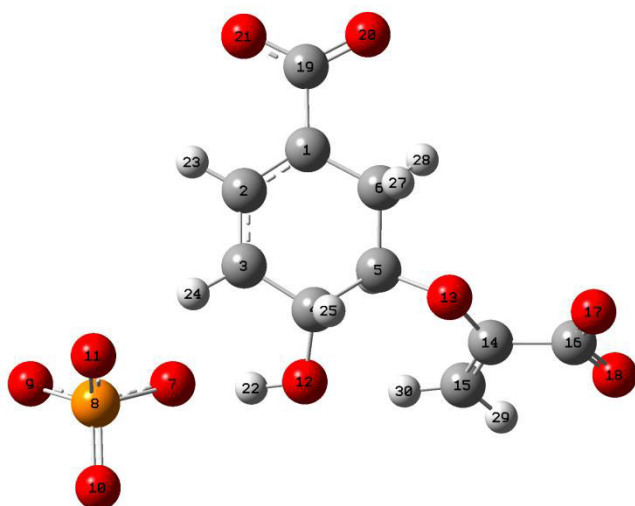


Figura 20: Estado de transição iônico otimizado (1)

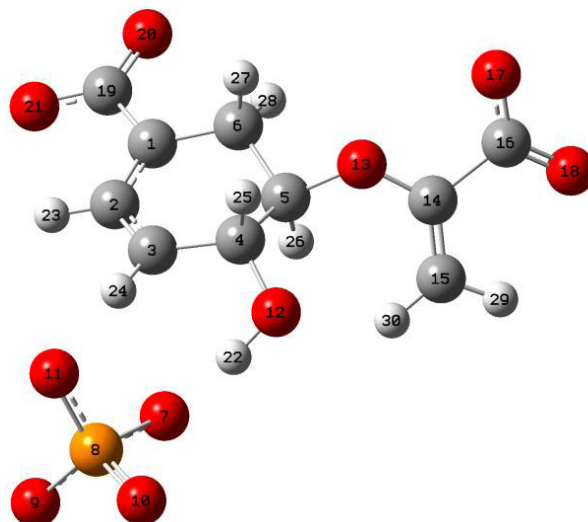


Figura 21: Estado de transição iônico otimizado (2)

O estado de transição revela que na reação de eliminação 1-4, o grupo fosfato é liberado antes da saída do hidrogênio. A estrutura também mostra que uma ressonância eletrônica é formada entre os carbonos C-1, C-2 e C-3, isso sugere que com saída do grupo fosfato, uma ligação dupla entre os carbonos C-2 e C-3 antes inexistente começa a se formar ao passo que a ligação duplas entre os carbonos C-1 e C-2 parece se romper, ou seja uma deslocalização eletrônica toma espaço na estrutura do anel do reagente.

O procedimento QST2 foi repetido para as espécies protonadas, no entanto não foi obtido sucesso.

6.4 DADOS ELETRÔNICOS

Os dados eletrônicos de interesse para o entendimento da reação são orbitais HOMO e LUMO, energias eletrônicas, populações eletrônicas e densidade eletrônica.

6.4.1 Cargas Atômicas

As cargas atômicas são representações pontuais localizadas em átomos que fazem parte de uma expansão da densidade de carga de uma molécula (Hall, 1985) e podem auxiliar na previsão e racionalização de reatividade química em processos controlados por interações eletrostáticas (Guadaguinini 1996).

No caso deste estudo, as cargas atômicas fornecem informações sobre a alteração da densidade de carga ao redor dos átomos nas espécies químicas envolvidas sobre a saída de H27 caracterizando uma eliminação anti e não H28 levando a uma eliminação com configuração *syn*, como seria de se esperar (Macheroux et al., 1999; Ftizpatrick et al., 2001). Modelos com ciclohexanos (Hill & Bock, 1978; Toromanoff, 1980) e cálculos de orbitais moleculares (Fukui, 1965; Anh, 1968) sugerem que reações de eliminação-1-4 favorecerem a estereoquímica *syn*.

Como mencionado anteriormente, os resultados da otimização geométrica mostram que a saída do grupo fosfato precede a do hidrogênio retirante no C6 (Figura 22):

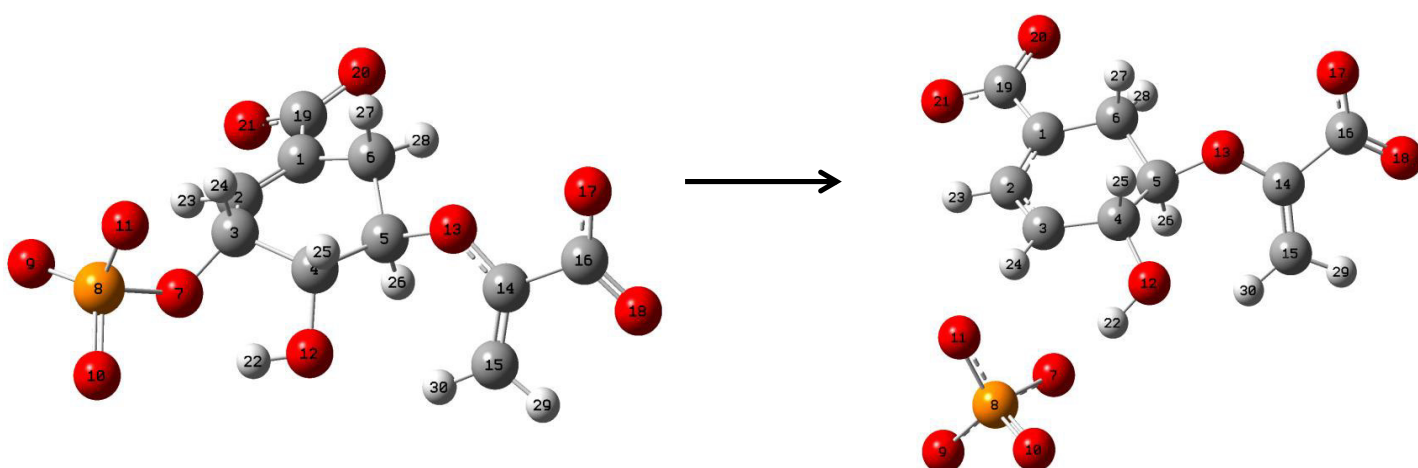


Figura 22: Substrato EPSP convertendo-se na estrutura de transição.

Esse resultado é interessante porque estudos têm suportado justamente que a saída do grupo fosfato é anterior à saída do próton (Osborne *et al.*, 2000; Bornemann *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura (Floss *et al.*, 1972), a reação de eliminação que a enzima corismato sintase realiza ocorre com a estereoquímica com configuração anti-1,4 (Figura 23), portanto o próton retirante é o H27 (figuras 22).

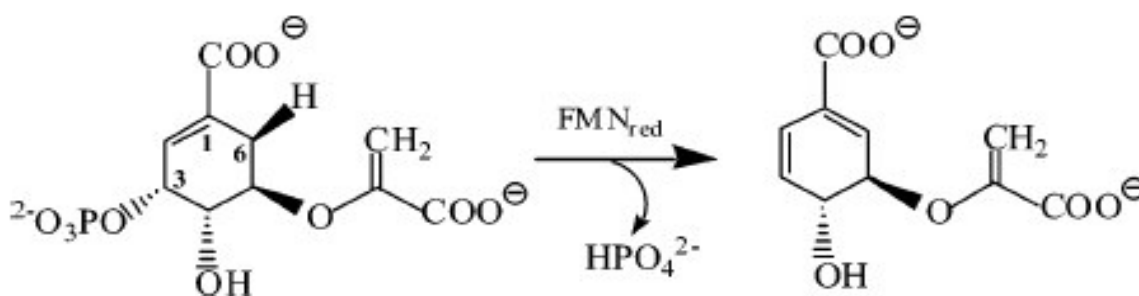


Figura 23: Conversão do EPSP em corismato através de uma eliminação com estereoquímica anti-1,4 com as perdas do grupo fosfato em C-3 e hidrogênio em C-6.

Os valores de cargas atômicas dos todos os átomos antes da reação (substrato) e durante o estado de transição (intermediário) e do produto estão listados de acordo com a Tabela 2.

A Figura 24 mostra os resultados da densidade de carga nos átomos obtidos a partir das cargas NBO, onde a análise das cargas é feita em termos de pares de elétrons ligantes (Reed, *et al.*, 1998)

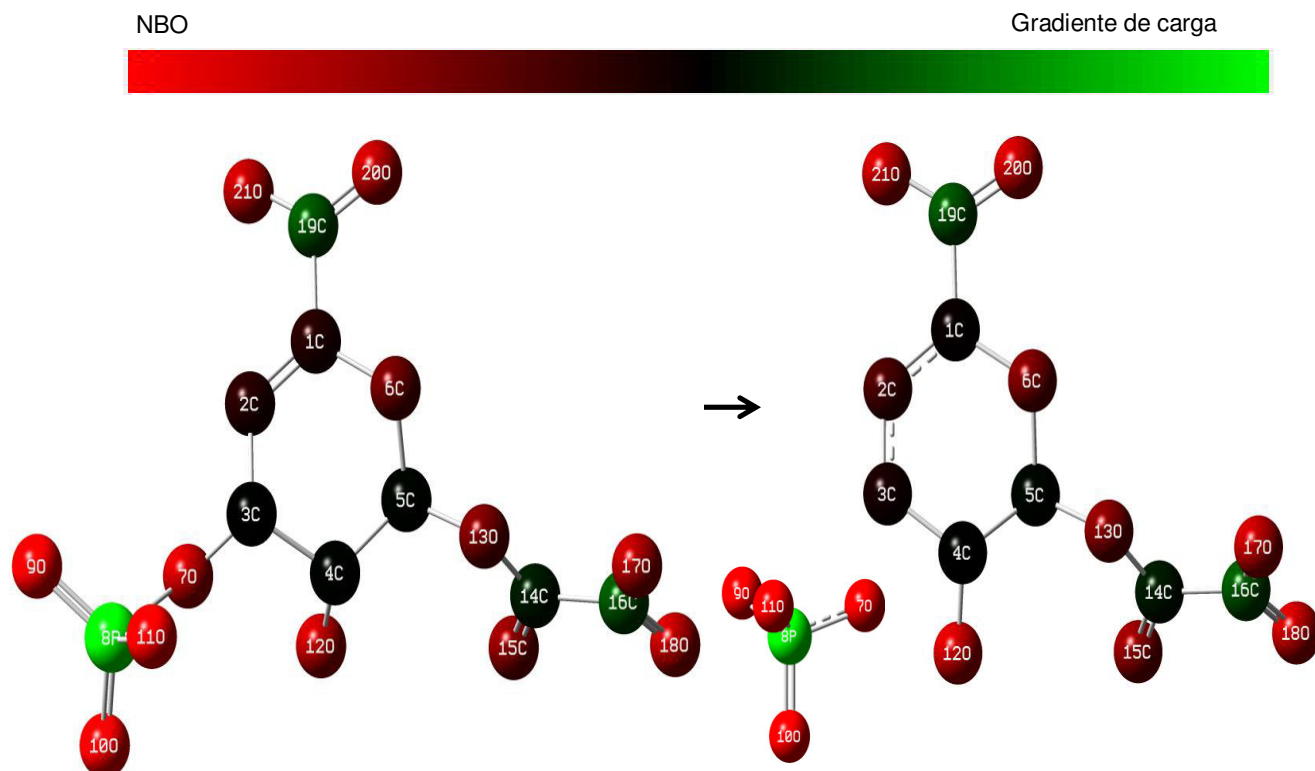


Figura 24: Densidade de carga NBO dos átomos do substrato (esquerda) e do intermediário (direita); o gradiente de carga varia do vermelho (carga negativa) ao verde (carga positiva) considerando os máximos e os mínimos para cada estrutura; os hidrogênios foram omitidos para melhor visualização.

Os gráficos seguir mostram a variação de carga dos átomos no substrato, intermediário e produto, exceto o átomo de fósforo que foi omitido para facilitar a visualização dos demais, aquele permaneceu invariável.

Gráfico 2: Cargas NBO do substrato, intermediário e do produto dos átomos carbono e oxigênio não pertencentes ao anel de seis átomos. São omitidas as cargas dos átomos O-7, O-9, O-10 e O-11 do produto porque não fazem parte da otimiza

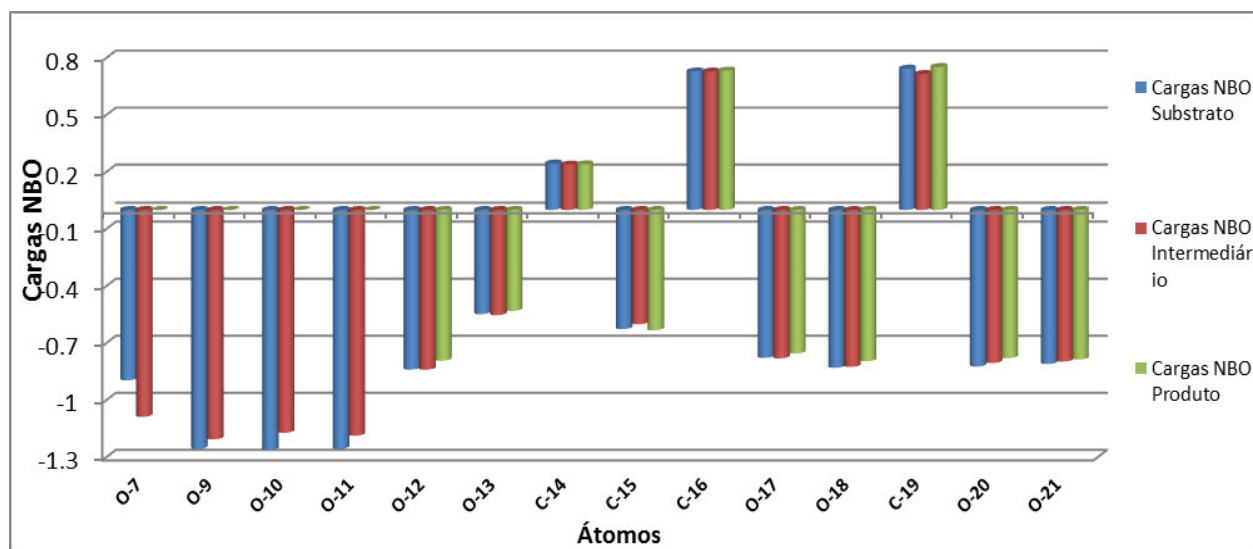
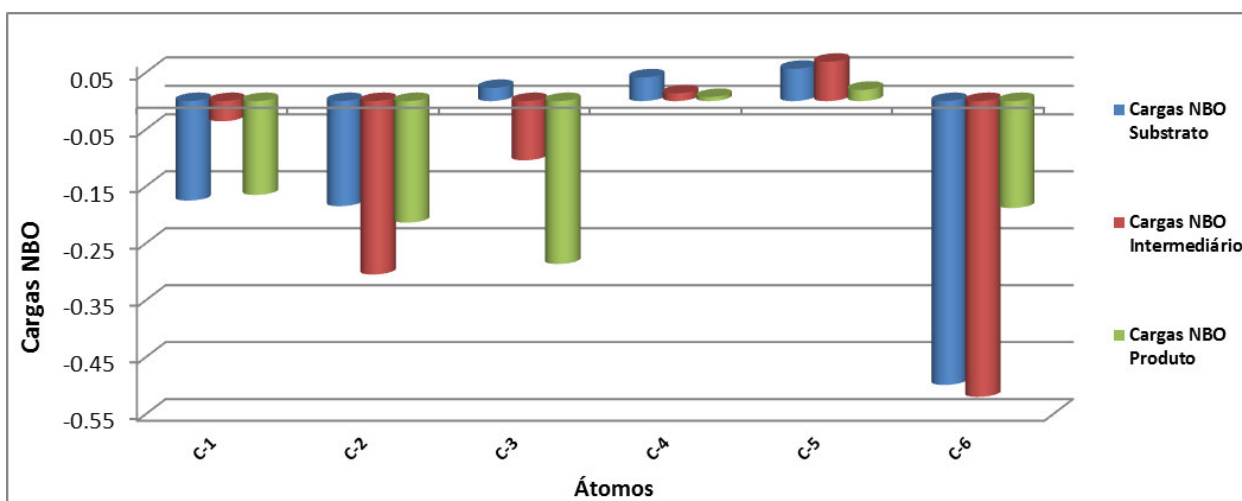


Gráfico 3: Cargas NBO do substrato, intermediário e produto dos átomos de carbono pertencentes ao anel de seis átomos.



Principiaremos a discussão na quebra de ligação que envolve a saída do grupo fosfato envolvendo a quebra de ligação entre C-3 e O-7: o átomo de oxigênio O7 tem sua carga negativa aumentada quando passamos do reagente para o intermediário (Gráfico 2). Além disso C3 também tem sua carga negativa aumentada no intermediário por ocasião da quebra (Gráfico 3).

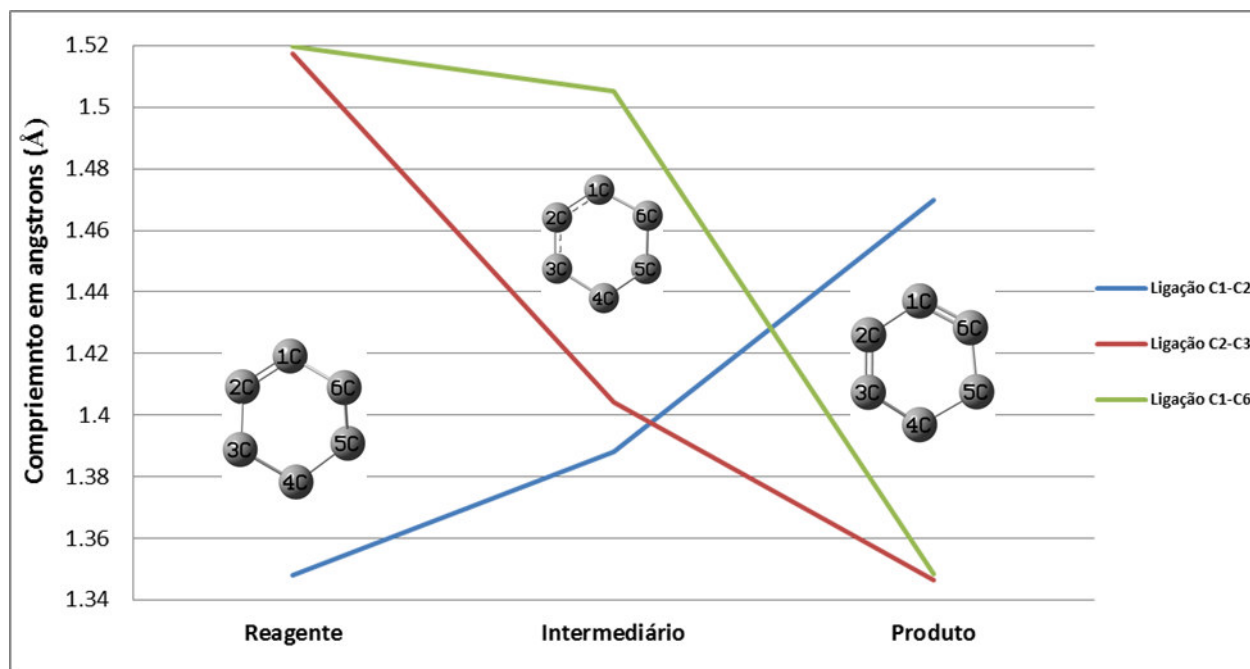
A alteração das cargas nos átomos vizinhos de C3 juntamente com os dados estruturais mostrados anteriormente justificam esse aumento de carga e nos dão uma explicação plausível para tal.

A clivagem da ligação entre O7 e C3 com posterior abstração eletrônica pelo átomo de oxigênio deveria promover um aumento de carga (tornar-se mais positiva) no carbono C-3, no entanto, sua carga diminui (torna-se mais negativa), esse ganho eletrônico em C3 é entendido à luz do concomitante ganho eletrônico em C2 e perda eletrônica em C1 (Gráfico 3).

Aliado aos dados da otimização geométrica é possível propor que a vacância orbital no átomo C3, fez com que a carência eletrônica neste átomo passasse a ser suprida por uma ressonância com C2, o que resultou prontamente em outra entre C-2 e C-1, isso permitiu que uma hiperconjugação tomasse lugar nas espécies C-1, C-

2 e C-3 caracterizando a estrutura de transição (intermediário), onde uma dupla ligação entre C2 e C3 começa a se formar, ao passo que a dupla ligação entre C2 e C1 se desfaz, ou seja, enquanto C3 perde densidade eletrônica para O7, essa perda é compensada pelo ganho eletrônico proveniente da hiperconjugação supracitada. No entanto, a densidade eletrônica em C3 aumenta do reagente para o intermediário porque o comprimento de ligação simples do reagente entre C3 e O7 é maior que a dupla que começa a se formar entre C3 e C2 no intermediário (Gráfico 4), isso permite que o par eletrônico fique mais próximo dos núcleos das duas espécies que compartilham a ligação dupla, além do que, a eletronegatividade menor do átomo de carbono C2 faz com que o par eletrônico aproxime-se mais do núcleo de C3, daí o aumento de carga em C3.

Gráfico 4: Variação do comprimento da ligação entre os átomos envolvidos diretamente na quebra e formação de ligações duplas (C1, C2, C3 e C6) na reação de síntese do corismato.



6.4.2. Orbitais HOMO e LUMO

Os orbitais moleculares têm sua origem na Teoria do Orbital Molecular (TOM) e nos fornecem informações sobre energia e forma tridimensional dos orbitais de uma molécula e particularmente interessante, dos orbitais de fronteira. De acordo com este enfoque, todos os elétrons de valência têm influência na estabilidade da molécula. (Elétrons dos níveis inferiores também podem contribuir para a ligação, mas para muitas moléculas simples o efeito é demasiado pequeno.) Além disso, a TOM considera que os orbitais atômicos, AOs, do nível de valência, deixam de existir quando a molécula se forma, sendo substituídos por um novo conjunto de níveis energéticos que correspondem a novas distribuições da nuvem eletrônica (densidade de probabilidade). Esses novos níveis energéticos constituem uma propriedade da molécula como um todo e são chamados, conseqüentemente de orbitais moleculares, OM, e como estamos tratando de orbitais de valência, diz-se que este assunto é abordado pela Teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira (TOMF) (Fukui, 1971; Fleming, 1976).

De especial interesse no estudo das reações químicas são os orbitais moleculares de fronteira HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), pois são estes orbitais que irão reagir na molécula, e de acordo com a TOMF, “um bom nucleófilo tem alta energia HOMO; um nucleófilo ruim tem baixa energia HOMO e um bom eletrófilo tem baixa energia LUMO; um eletrófilo ruim tem alta energia LUMO”. Por esta teoria, “quanto menor a diferença de energia entre o HOMO do nucleófilo e o LUMO do eletrófilo, mais eficiente será a reação”. (Fukui, 1971; Fleming, 1976).

Assim, com relação ao HOMO, a localização deste orbital corresponderá àquela região da molécula que preferencialmente sofrerá um ataque eletrofílico; em

oposição, o LUMO representará a região que, se houver um ataque nucleofílico na molécula, será preferencial.

Portanto a localização e a densidade dos orbitais HOMO e LUMO nos fornecem informações sobre a reatividade e regioselectividade em uma molécula, (Domingo *et. al.*, 2003; Fleming, 1976).

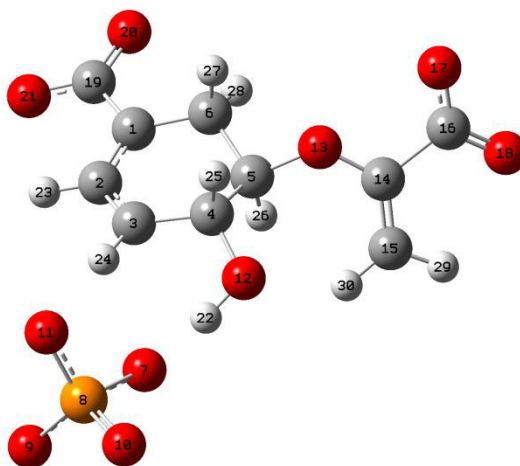


Figura 25: Estrutura da transição da reação de síntese do EPSP a partir do Corismato obtida pelo procedimento QST2.

O procedimento QST2, mostrou a estrutura do estado de transição (Figura 25). Os cálculos dessa abordagem mostraram que energeticamente a reação que é favorecida é aquela em que a saída do grupo fosfato precede a saída do H27.

A proposta da reação baseada na abordagem QST2, apesar de racionalmente coerente e ser previsivelmente ponderada, será tanto mais robusta ou não quanto mais informações forem analisadas e confrontadas à luz de outras propriedades químicas para o apoio ou não do que se se está propondo. Neste sentido, à luz do supracitado a respeito da relevância dos OM's, calcularam-se as propriedades eletrônicas HOMO e LUMO das espécies químicas.

A reação de síntese do corismato (Figura 26) mostra quais espécies químicas são eliminados na molécula do reagente EPSP para a formação do corismato. É notório ainda que o grupo fosfato, com alta densidade de carga negativa, sofre uma

protonação que por ser uma forma de estabilizar a carga do grupo, facilitará a saída do grupo fosfato.

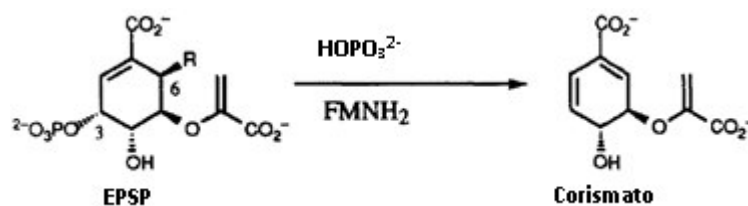


Figura 26: Esquema geral para a síntese do Corismato a partir do EPSP

Uma questão amplamente discutida na literatura é aquela a respeito de onde se principia a eliminação anti-1,4 no reagente EPSP, se pelo grupo fosfato ou pelo H27, pois se a reação de eliminação se inicia pelo grupo fosfato, seria necessário que este grupo sofresse um ataque eletrofílico, se, porém, se iniciasse pelo H27, seria necessário que este grupo sofresse um ataque nucleofílico (Figura 27).

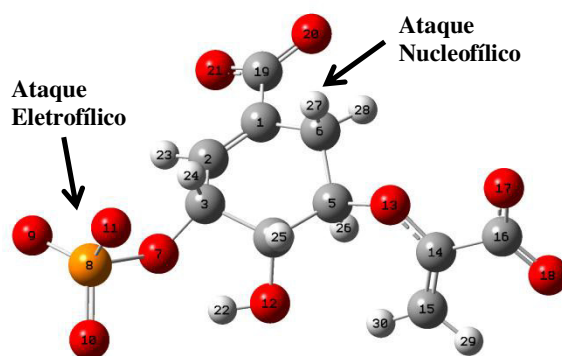


Figura 27: A eliminação anti-1,4 no EPSP envolve a saída do grupo fosfato e um hidrogênio H-27.

Os resultados obtidos a partir da análise dos orbitais HOMO e LUMO acabam por justificar eletronicamente porque a reação de eliminação é favorecida principiando a partir do grupo fosfato sendo energeticamente favorável alvo de um ataque eletrofílico, concentrar o HOMO, em detrimento do H27, que não é energeticamente favorável a um ataque nucleofílico, visto o LUMO se concentra numa região distinta daquela onde se encontra o H27 (Figura 28).

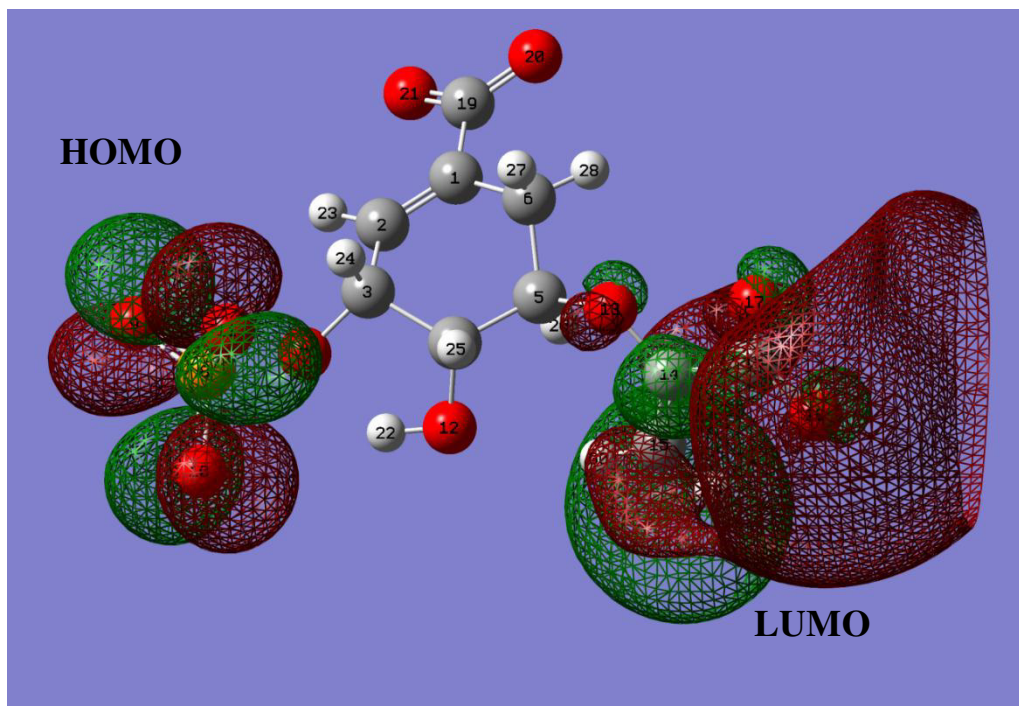


Figura 28: Localizações do orbitais HOMO (região de ataque eletrofílico) e LUMO (região de ataque nucleofílico) no reagente EPSP.

Portanto a regioseletividade do grupo fosfato é eletrônica e energeticamente favorável para principiar o processo de eliminação em detrimento ao H27. Os resultados dos orbitais HOMO-1/LUMO+1, e HOMO-2/LUMO+2, respectivamente suportam essa assertiva (Figuras 29 e 30), pois mostram que as segundas e terceiras regiões energeticamente favoráveis para um ataque nucleofílico LUMO+1 e LUMO+2 não favorecem uma reação iniciando-se com uma abstração de H-27 do reagente, adicionalmente, as regiões energeticamente favoráveis subsequentemente ao orbital HOMO, HOMO-1 e HOMO-2, continuam a corroborar o grupo fosfato como região reativamente ativa para um ataque eletrofílico.

Esta previsão feita através da abordagem dos orbitais HOMO e LUMO é extremamente importante e essencial para respaldar modelo adotado neste trabalho, pois corrobora com os dados de outros mecanismos proposto frutos de trabalhos experimentais conforme Bornemann *et. al.*, em 1996.

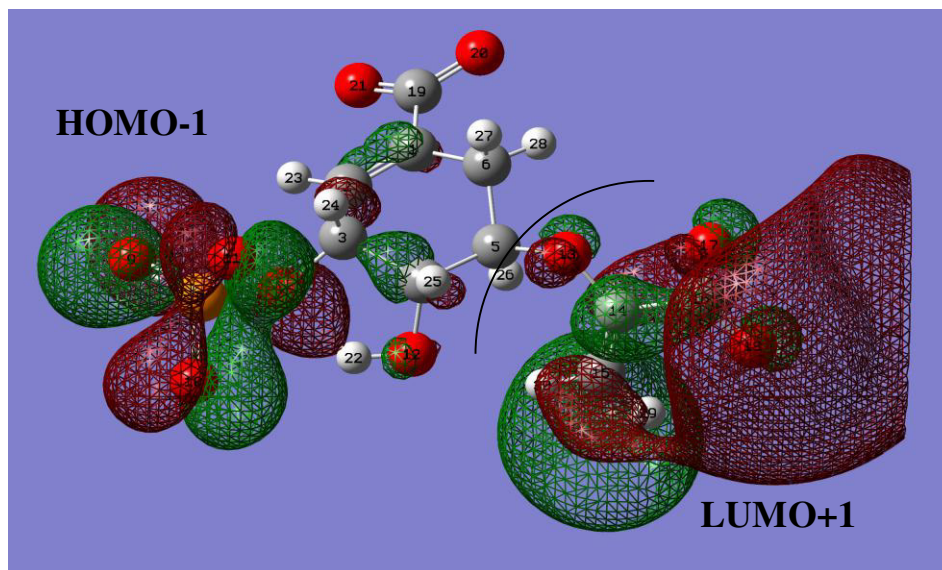


Figura 29: HOMO-1 e LUMO+1 do reagente EPSP.

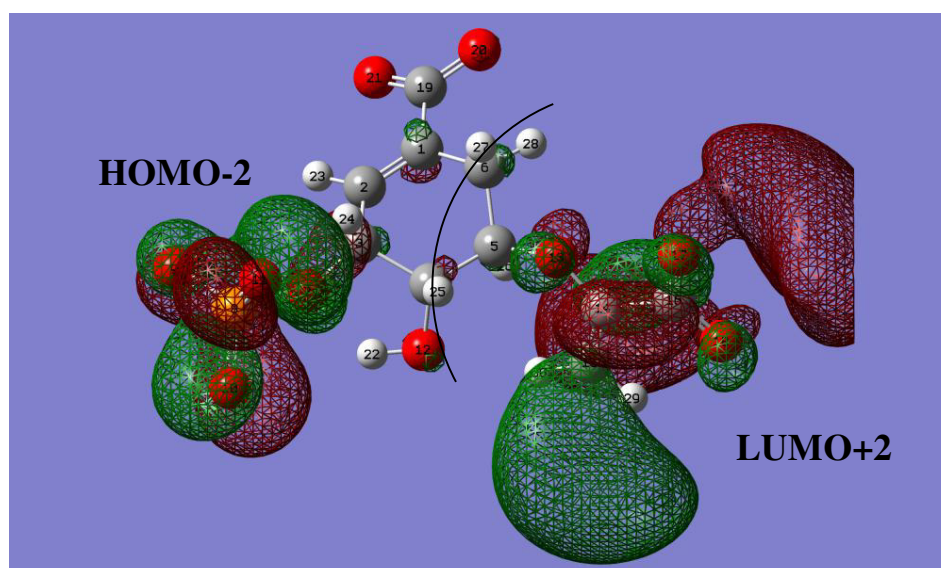


Figura 30: HOMO-2 e LUMO+2 do reagente EPSP.

Esta previsão feita através da abordagem dos orbitais HOMO e LUMO é extremamente importante e essencial para respaldar modelo adotado neste trabalho, pois corrobora com os dados de outros mecanismos proposto frutos de trabalhos experimentais conforme Bornemann *et. al.*, em 1996.

6.4.3. Orbitais HOMO e LUMO da Espécie Protonada.

Uma vez que a previsão dos orbitais moleculares HOMO e LUMO somando aos dados experimentais mostra que a saída do grupo fosfato precede a saída do H-27, onde o orbital HOMO torna a região do grupo fosfato a favorável ao ataque eletrofílico como discutido no item “6.4.2 Orbitais HOMO e LUMO”, o reagente EPSP foi protonado. Neste modelo, as cargas do reagente são neutralizadas e pode-se verificar as mudanças das propriedades químicas desta espécie com o grupo fosfato protonado, simulando assim um ataque eletrofílico nesta espécie.

Desta forma, os orbitais HOMO e LUMO calculados nestas condições estão demonstrados nas figuras (figuras 31 e 32):

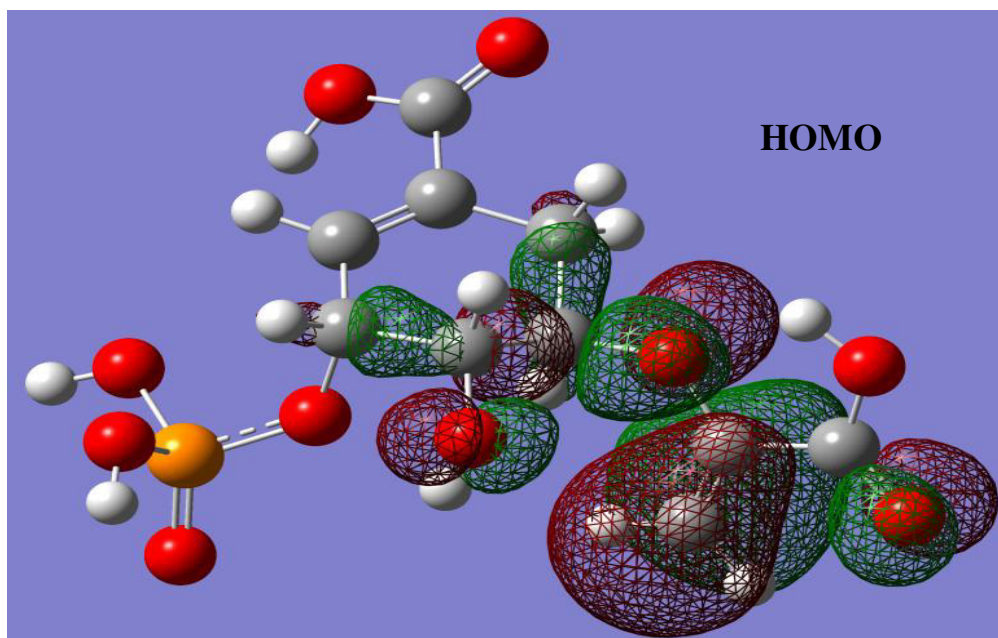


Figura 31: HOMO do Reagente EPSP protonado.

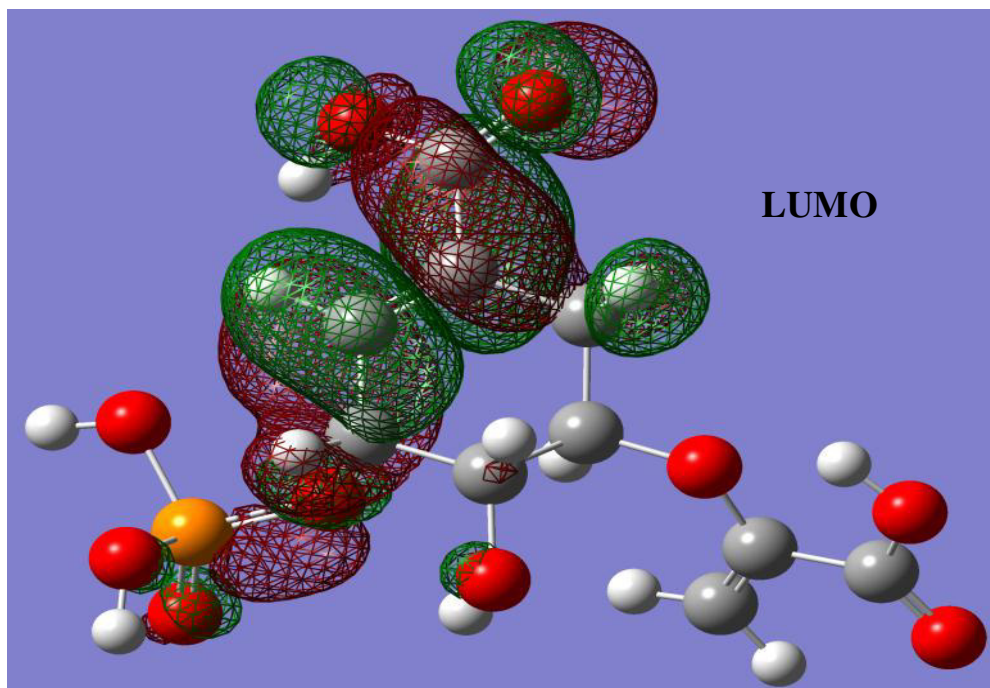


Figura 32: LUMO do Reagente EPSP protonado.

Como observado nas Figuras 31 e 32, o reagente EPSP neutralizado apresenta regiões de HOMO e LUMO totalmente distintas da espécie iônica antes da reação (Figura 28). A informação digna de nota destes resultados é a região onde está localizado o LUMO no EPSP protonado, pois sendo o LUMO o orbital que preferencialmente sofrerá um preenchimento eletrônico, ao concentrar-se nos carbonos C1, C2, C3 e C19 (figura 29), o modelo adotado para a protonação do reagente EPSP, especialmente no grupo fosfato mostrou-se válido pois é justamente nos carbonos C1, C2, C3, nos quais ocorre a deslocalização eletrônica – hiperconjugação – resultante da clivagem da ligação entre C-1 e C-2 com a formação das duas duplas ligações que formará o corismato. Esta informação é ainda sugestiva quanto à contribuição de C19 na hiperconjugação, pois sendo participante de um grupo carbonila, descrito como um grupo retirante de elétrons, esta informação aliada à sua presença no orbital LUMO mostra-se relevante quanto ao papel deste átomo quanto a quebra e formação de duplas que levará ao estado de transição e, por conseguinte, ao produto corismato.

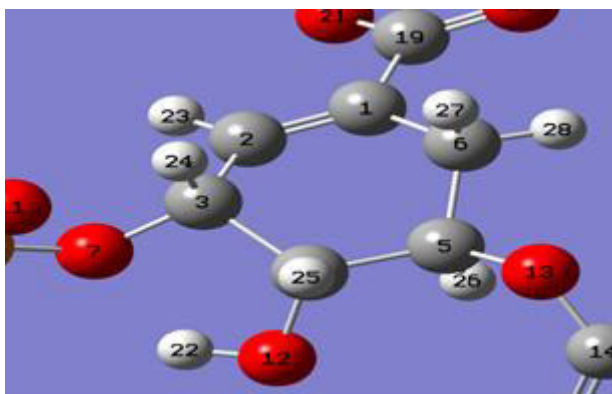


Figura 33: Átomos de carbono onde ocorre a hiperconjugação estão representados pelos números 1, 2, 3 e 19.

Os orbitais HOMO e LUMO para o estado de transição iônico abrangem a mesma região da molécula, sendo LUMO o mais abrangente como ilustrado nas figuras 45 e 46.

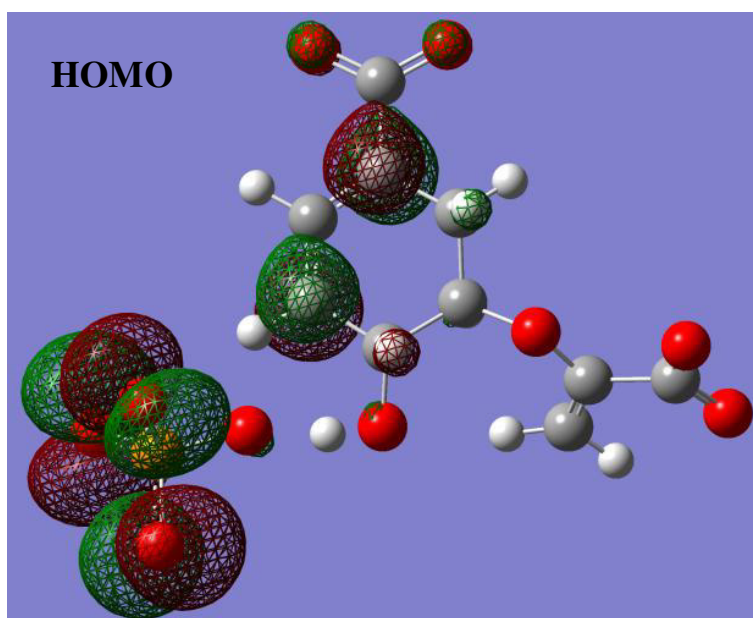


Figura 34: HOMO do estado de transição iônico.

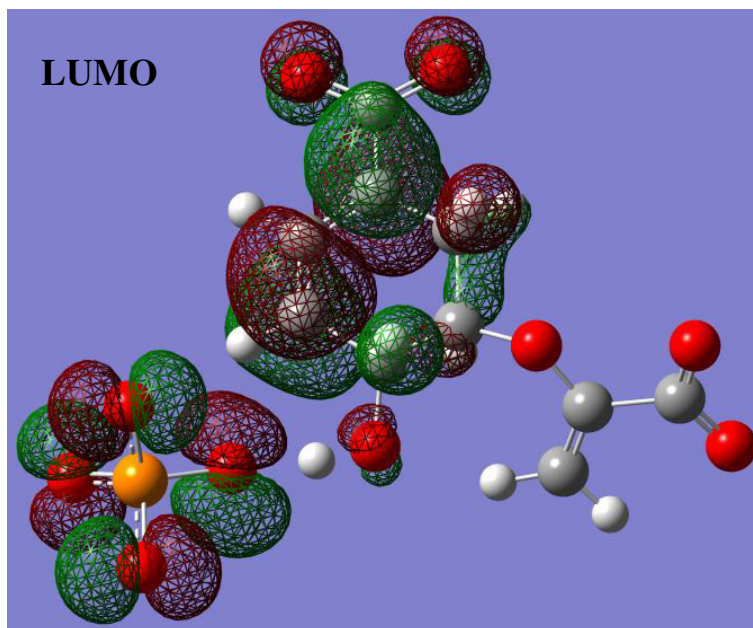


Figura 35: LUMO do estado de transição iônico.

Como notado, no estado de transição os orbitais HOMO e LUMO acabam coincidindo em algumas regiões. Destaca-se que no HOMO, C1 e C3. Apresentam altas densidades eletrônicas, explicando que por ocasião da clivagem da dupla ligação entre C1 e C2, e na iminência da formação da dupla entre C2 e C3 e de outra entre C1 e C6, C1 e C3 são os átomos com maiores densidades eletrônicas.

7. ABORDAGEM QUÍMICO-TEÓRICA ATRAVÉS DE ORBITAIS HOMO/LUMO E QST2 LANÇANDO MAIS LUZ AOS MECANISMOS DE REAÇÃO PROPOSTOS

Dentre os mecanismos gerais de reação propostos para a reação da CS, um mecanismo catiônico e um radicalar são os mais aceitos (Maclean & Ali 2003), as figuras 36 e 37 mostram tais mecanismos.

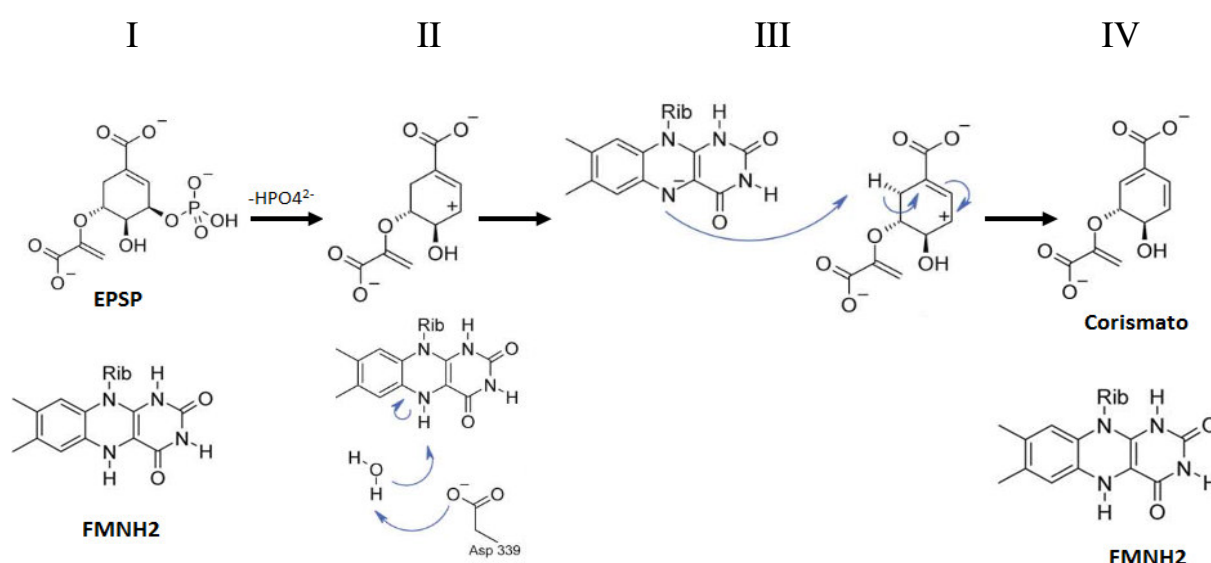


Figura 36: Mecanismo catiônico proposto para a síntese do Corismato. (Adaptado de Maclean & Ali, 2003)

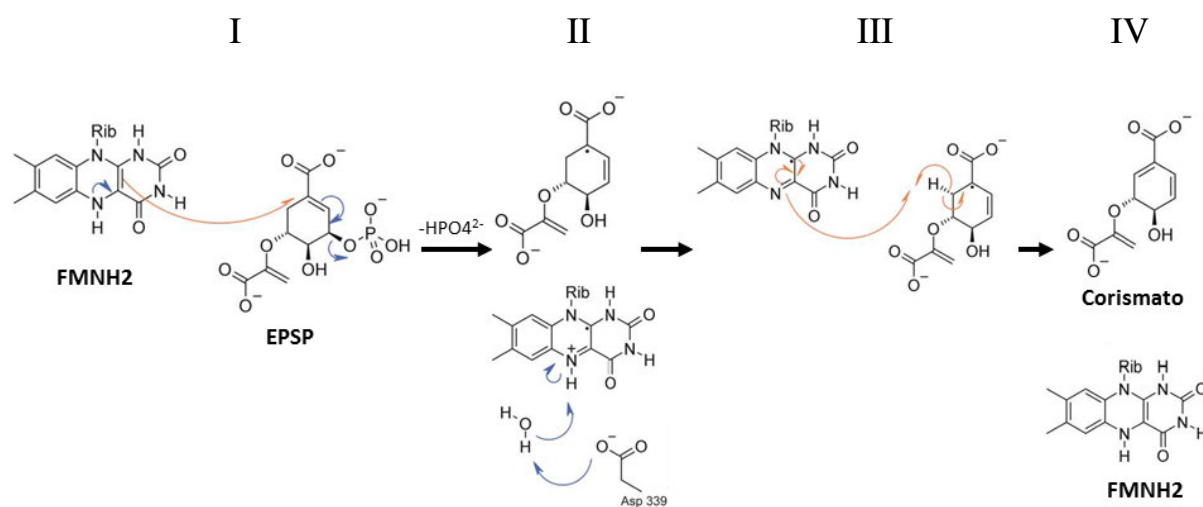


Figura 37: Mecanismo radicalar proposto para a síntese do corismato. (Adaptado de Maclean & Ali, 2003)

No mecanismo catiônico (Figura 36), conforme o passo III, a FMNH₂ participa determinantemente atuando como nucleófilo retirando o hidrogênio retirante H27 (figura 38) do reagente EPSP já sem o grupo fosfato, o que resultará na formação do corismato (figura 36, passo IV).

No mecanismo radicalar (Figura 37), conforme o passo I, a FMNH₂, atua como nucleófilo em dois momentos, primeiramente realizando um ataque nucleofílico em C1 (figura 38), sendo determinante para a saída do grupo fosfato (passo I), e posteriormente retirando o hidrogênio retirante H27, levando ao corismato.

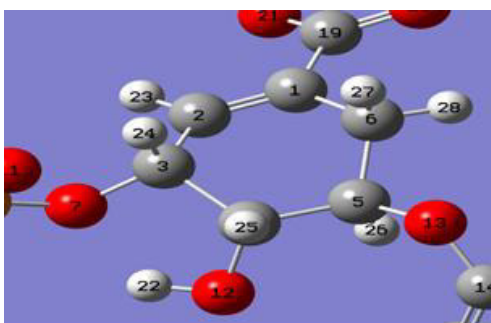


Figura 38: Localização de H27 e C1 na molécula

Apesar de serem considerados igualmente possíveis mecanisticamente (Maclean & Ali, 2003), há evidências que suportam o mecanismo radicalar, sendo, portanto, reportado como mais viável (Osborne, 2000).

Ainda na linha do mecanismo radicalar há pelo menos quatro variações principalmente no que diz respeito ao papel dos aminoácidos (Figuras 2, 3 e 4).

7.1. O Que a Abordagem HOMO/LUMO e QST2 Corrobora ou Não em Relação aos Estudos Feitos Até Então?

Embora não haja um veredito a respeito da reação, os estudos até momento apontam cinco considerações gerais sobre a reação:

1. São unânimes quanto à saída do grupo fosfato preceder a saída do H27 (figura 32) (Bornemann *et. al.*, 1996).
2. A FMNH₂ doa um elétron ao substrato EPSP facilitando a saída do grupo fosfato (Bornemann, 2002; Macheroux *et. al.*, 1999).
3. Evidências de que o mecanismo que ocorre é o radicalar (Osborne, 2000).
4. Todos os mecanismos radicalares proposto propõem um ataque nucleofílico em C1 antecedendo a saída do grupo fosfato (Figuras 2, 3 e 4).
5. A importância dos aminoácidos histidina 17 (his 17) e histidina 106 (his 106), ácido aspártico 367 (Asp 367), serina 16 e 127 (Ser16, ser Ser127).

O estudo químico-teórico em questão, conseguiu lançar luz em 3 das 5 considerações gerais supracitadas às quais a literatura aborda, são as considerações 1, 2 e 4.

7.1.1 Congruência relativa à saída do grupo fosfato. O procedimento QST2 corrobora.

A respeito da assertiva 1, os cálculos permitiram através do procedimento QST2 prevê a saída do grupo fosfato e posteriormente a saída do hidrogênio retirante (Figura 39).

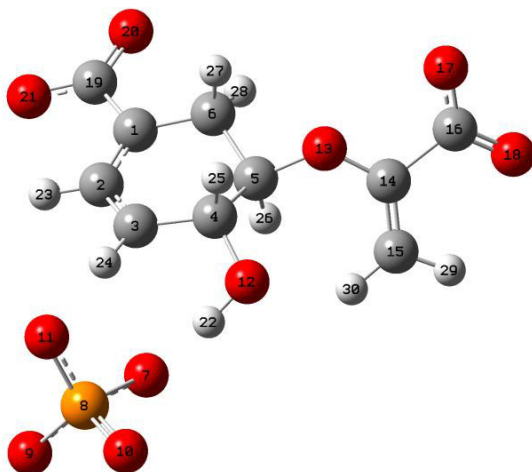


Figura 39: Otimização do estado de transição via QST2 mostrando saída do grupo fosfato precedendo a saída de H27.

7.1.2 Congruência relativa ao ataque nucleofílico em C1. O orbital LUMO da espécie protonada corrobora.

Com relação à assertiva 2, os cálculos de orbitais moleculares do reagente protonado mostram que o orbital LUMO se encontra numa região que corrobora o ataque nucleofílico em C1, na região onde ocorrem onde as quebras e formações de duplas ligações.

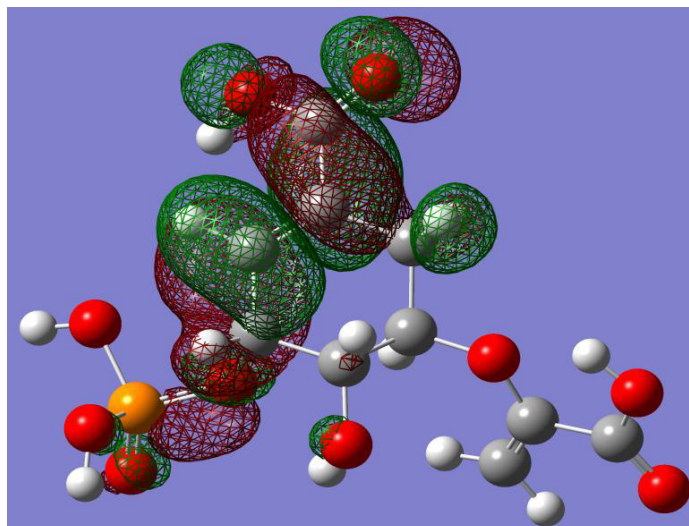


Figura 40: C1 encontra-se na região do Orbital LUMO do reagente protonado.

7.1.3 Incongruência quanto ao ataque nucleofílico em C1 preceder a protonação do grupo fosfato. Os orbitais HOMO/LUMO da espécie iônica não corroboram.

Em relação à assertiva 4, nossos cálculos de orbitais moleculares HOMO e LUMO da espécie iônica, a que se encontra no sítio ativo da enzima, não corroboram com o mecanismo proposto em que o ataque nucleofílico em C1 precede a protonação do grupo fosfato (figura 41). Pois a região onde se encontra C1 não é eletrônica e energeticamente favorável a um ataque nucleofílico por parte da FMNH₂, que é onde deveria se localizar o orbital LUMO. Considerando que o orbital HOMO é aquele, eletrônica e energeticamente favorável a um ataque eletrofílico, pode-se dizer que a protonação do grupo fosfato precede o ataque nucleofílico em C1.

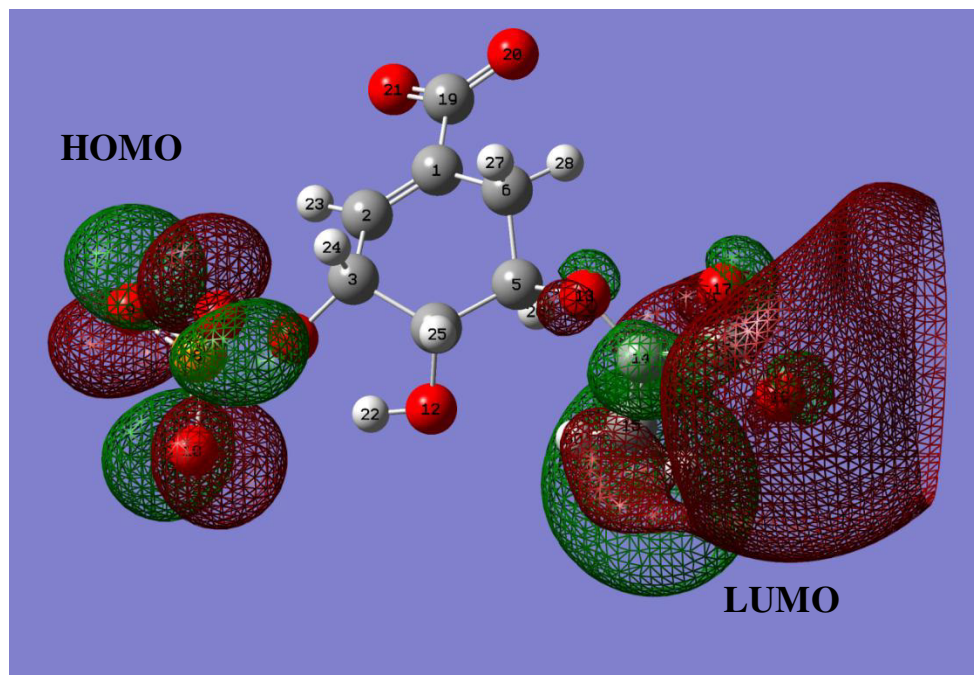
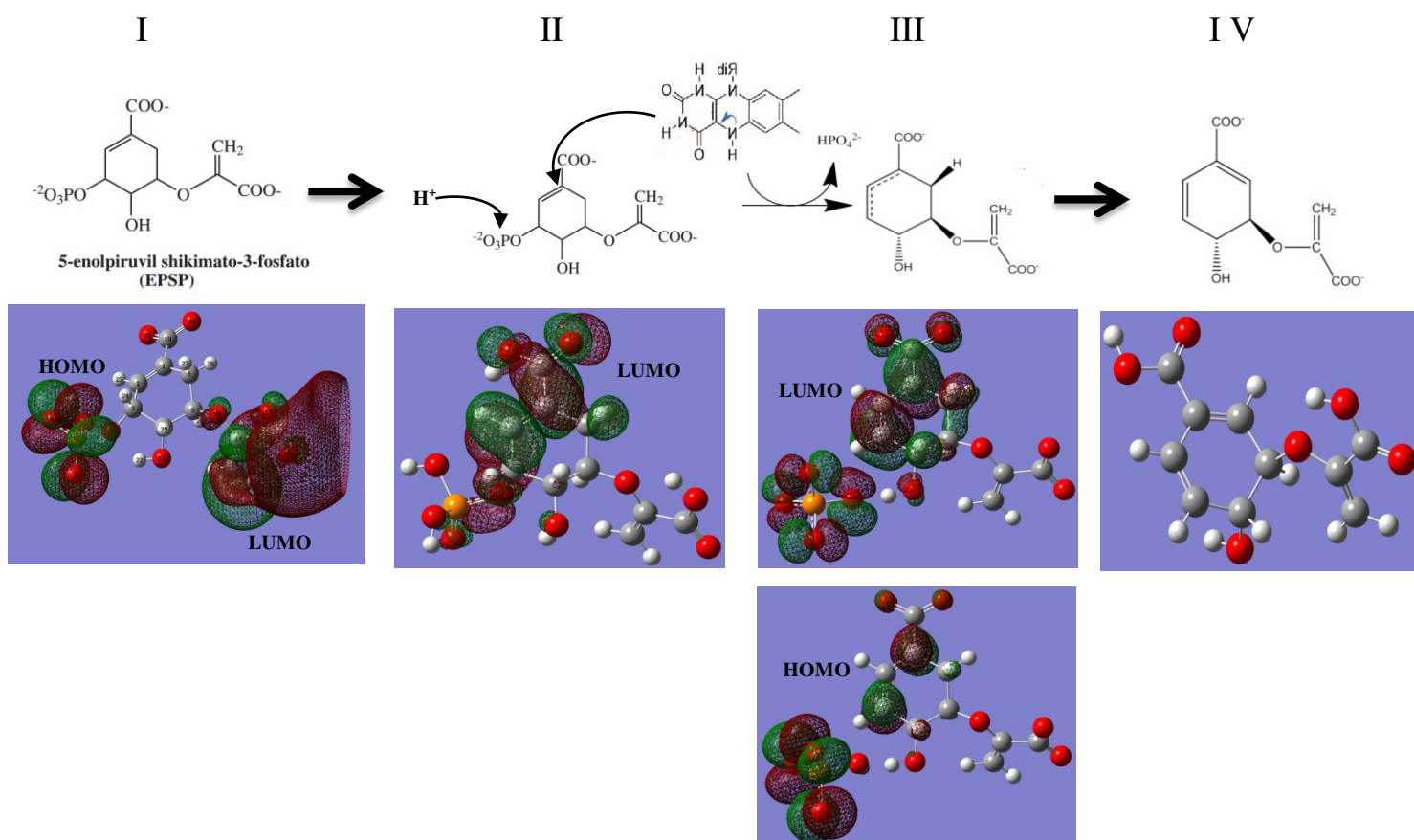


Figura 41: Orbitais HOMO e LUMO da espécie iônica.

8. UMA PROPOSTA DE MECANISMO PARA A REAÇÃO DE SÍNTESE DO CORISMATO.

O estudo químico-teórico em apreço Aliado aos resultados obtidos dos orbitais HOMO e LUMO e do procedimento QST2 do reagente e do estado de transição iônico, bem como da espécie protonada, o estudo é possível estabelecer através destas propriedades uma dinâmica eletronicamente coerente para a reação de conversão do EPSP em corismato.



Obs: É necessário ressaltar que o mecanismo proposto por esse estudo levou em conta os pressupostos baseados em outros estudos indicando que a FMNH2 age como nucleófilo, não foi estudado nesse trabalho esse efeito ou não, ilustrando apenas como um nucleófilo pode atacar uma espécie do orbital LUMO (Passo II).

Finalmente, considerando todo o supracitado, através de uma abordagem ainda não realizada, através dos orbitais HOMO e LUMO e do procedimento QST2, tem-se a perspectiva eletrônica que justifica uma dinâmica plausível para a reação:

- I. Os orbitais HOMO e LUMO no reagente EPSP mostra quais regiões são energeticamente ativas, neste caso, o ataque eletrofílico no grupo fosfato é favorável em detrimento de qualquer outra região da molécula e precede o ataque nucleofílico em C1, uma vez que este átomo não está na região favorável para o ataque nucleofílico, orbital LUMO.
- II. O ataque eletrofílico no grupo fosfato muda a região onde se localizará o orbital LUMO, sendo este considerado propício a receber elétrons. Este orbital está justamente na região onde estão os átomos que receberão os elétrons que resultarão na quebra e formação das duplas ligações. É quando acontece o ataque nucleofílico em C1 por parte da FMNH₂.
- III. No estado transição, os orbitais HOMO e LUMO ocupam a mesma região, a região onde estão ocorrendo as transferências eletrônicas de quebra e formação de duplas ligações. Este resultado dos orbitais é coerente com a hiperconjugação que toma lugar no estado de transição.
- IV. Finalmente tem-se a formação do corismato.

Estes resultados, trazem uma importante informação a respeito da reação: A protonação do grupo fosfato parece que indica que esse é passo inicial e fundamental para que a reação seja energeticamente possível, pois além de justificar a regioseletividade da molécula no grupo fosfato, uma vez este grupo protonado, a molécula tem a região onde se localiza o orbital LUMO mudada para a região onde ocorrerão as transferências eletrônicas e onde ocorrerá o ataque nucleofílico em C1.

9. CONCLUSÕES

A elucidação geométrica das espécies (reagente EPSP, estado de transição e produto corismato) participantes da reação de síntese da enzima Corismato Sintase em nível DFT mostrou-se satisfatória, sendo harmônica com a previsão dos modelos de ligações químicas, os dados da otimização geométrica são importantes, pois: a) os dados da conformação estrutural da molécula poderão vir a ser estudados no contexto do sítio ativo da enzima podendo constituir fator determinante na reação; b) a otimização geométrica pôde prever a saída anterior do grupo fosfato em relação ao próton retirante, resultado este que vem corroborar com mecanismos propostos mais recentemente.

Os dados eletrônicos obtidos até então a partir das cargas NBO, esclareceram como a densidade eletrônica nos átomos foi alterada no decorrer da reação, e ao lado dos dados estruturais revelaram a dinâmica de quebra e formação das ligações duplas nas espécies envolvidas.

A partir dos orbitais Homo-Lumo e o método QST2, foi possível propor um mecanismo de reação onde corrobora a protonação do grupo fosfato e sua saída da molécula em detrimento de qualquer ataque nucleofílico na molécula do substrato, permitindo mostrar que o ataque nucleofílico em C1 não é suportado com base nesse estudo.

10. LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distâncias interatômicas no íon EPSP

Átomos		Ligação	Comprimento em angstroms (Å)
C-1	C-2	B1	1.34794378
C-2	C-3	B2	1.51734945
C-3	C-4	B3	1.59876956
C-4	C-5	B4	1.54712152
C-6	C-1	B5	1.51981435
O-7	C-3	B6	1.41404119
P-8	O-7	B7	1.82181503
O-9	P-8	B8	1.5437068
O-10	P-8	B9	1.54446374
O-11	P-8	B10	1.54506999
O-12	C-4	B11	1.42735079
O-13	C-5	B12	1.46586773
C-14	O-13	B13	1.3619345
C-15	C-14	B14	1.35153594
C-16	C-14	B15	1.56626956
O-17	C-16	B16	1.25814246
O-18	C-16	B17	1.27205293
C-19	C-1	B18	1.54357224
O-20	C-19	B19	1.27488332
O-21	C-19	B20	1.26774169
H-22	O-12	B21	0.99238023
H-23	C-2	B22	1.08685216
H-24	C-3	B23	1.10198408
H-25	C-4	B24	1.10051433
H-26	C-5	B25	1.09599997
H-27	C-6	B26	1.10216957
H-28	C-6	B27	1.09211661
H-29	C-15	B28	1.08359307
H-30	C-15	B29	1.08403762

Tabela 2: Cargas NBO para o substrato, intermediário e produto.

Átomos	Cargas NBO Substrato	Cargas NBO Intermediário	Cargas NBO Produto	Numeração recebida no Produto
C-1	-0.17472	-0.03535	-0.16481	C-1
C-2	-0.18462	-0.30453	-0.21349	C-2
C-3	0.023	-0.10398	-0.28608	C-3
C-4	0.04161	0.01358	0.00715	C-4
C-5	0.05672	0.06907	0.01975	C-5
C-6	-0.49857	-0.5195	-0.18787	C-6
O-7	-0.89612	-1.08851	-	-
P-8	2.50185	2.50743	-	-
O-9	-1.25684	-1.20577	-	-
O-10	-1.26183	-1.17188	-	-
O-11	-1.25604	-1.18661	-	-
O-12	-0.83966	-0.83983	-0.79285	O-7
O-13	-0.54806	-0.55355	-0.53102	O-8
C-14	0.24384	0.23856	0.23987	C-9
C-15	-0.62646	-0.60137	-0.63322	C-10
C-16	0.72808	0.72763	0.73236	C-11
O-17	-0.77765	-0.78032	-0.75416	O-12
O-18	-0.83022	-0.82509	-0.7953	O-13
C-19	0.7429	0.71521	0.75188	C-14
O-20	-0.82332	-0.80525	-0.77918	O-15
O-21	-0.8102	-0.79733	-0.78638	O-16
H-22	0.54007	0.54994	0.49402	H-17
H-23	0.25488	0.26138	0.26062	H-18
H-24	0.25503	0.31454	0.21897	H-19
H-25	0.21315	0.21097	0.25429	H-20
H-26	0.22487	0.22401	0.23401	H-21
H-27	0.23043	0.24879	-	-
H-28	0.26617	0.27147	0.25626	H-22
H-29	0.22454	0.2258	0.25025	H-23
H-30	0.23719	0.24047	0.20491	H-24

Obs: As lacunas não preenchidas na tabela 9 são decorrentes da otimização do produto corismato ser feita sem a presença dos subprodutos para que suas propriedades pudessem ser calculadas sem interferências, com a eliminação do grupo fosfato e do próton retirante, o software automaticamente muda a numeração dos átomos na molécula, a nova numeração recebida está listada na referida tabela ao lado ao lado das cargas NBO do produto.

11. REFERÊNCIAS

- 6-31+G(d,p) W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, **56**, 2257 (1972);
- Bardo, R. D. and Ruedenberg, K., Even-Tempered Atomic Orbitals.4. Atomic Orbital Bases with Pseudoscaling Capability for Molecular Calculations. *Journal of Chemical Physics*, 1973, **59**(11), 5966-5977.
- Bardo, R. D. and Ruedenberg, K., Even-Tempered Atomic Orbitals.6. Optimal Orbital Exponents and Optimal Contractions of Gaussian Primitives for Hydrogen, Carbon, and Oxygen in Molecules. *Journal of Chemical Physics*, 1974, **60**(3), 918-931.
- Becke, A. D., Density-Functional Thermochemistry.3. The Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics*, 1993, **98**(7), 5648-5652.
- Binkley, J. S. and Pople, J. A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.19. Split-Valence Gaussian-Type Basis Sets for Beryllium. *Journal of Chemical Physics*, 1977, **66**(2), 879-880.
- Binkley, J. S., Pople, J. A., and Hehre, W. J., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.21. Small Split-Valence Basis-Sets for 1st-Row Elements. *Journal of the American Chemical Society*, 1980, **102**(3), 939-947.
- Bornemann S (**2002**) Flavoenzymes that catalyse reactions with no net redox change. *Nat Prod Rep* **19**, 761–772.
- Bornemann, S.; Lowe, D.J.; Thorneley, R.N. The transient kinetics of *Escherichia coli* chorismate synthase: Substrate consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. *Biochemistry* **1996**, **35**, 9907–9916.
- Boys, S. F., Electronic Wave Functions.1. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, **1950**, **200**(1063), 542-554.
- C. Peng and H. B. Schlegel, "Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States," *Israel J. of Chem.*, **33**, 449 (1993).
- C. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel and M. J. Frisch, "Using Redundant Internal Coordinates to Optimize Equilibrium Geometries and Transition States," *J. Comp. Chem.*, **17**, 49 (1996).

Coggins JR, Abell C, Evans LB, Frederickson M, Robinson DA, Roszak AW & Laphorn AJ (2003) Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem Soc Transactions* 31, 548–552.

Collins, J. B., et al., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.17. Geometries and Binding-Energies of 2nd-Row Molecules - Comparison of 3 Basis Sets. *Journal of Chemical Physics*, 1976, 64(12), 5142-5151.

Dasilva, A. B. F. and Trsic, M., Universal Gaussian and Slater-Type Bases for Atoms H to Xe Based on the Generator-Coordinate Hartree-Fock Method.2. Application of the Gaussian-Basis to Neutral and Charged Diatomic-Molecules. *Molecular Physics*, **1993**, 78(5), 1301-1307.

Dasilva, A. B. F., Dacosta, H. F. M., and Trsic, M., Universal Gaussian and Slater-Type Bases for Atoms H to Xe Based on the Generator-Coordinate Hartree-Fock Method.1. Ground and Certain Low-Lying Excited-States of the Neutral Atoms. *Molecular Physics*, **1989**, 68(2), 433-445.

Dill, J. D. and Pople, J. A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.15. Extended Gaussian-Type Basis Sets for Lithium, Beryllium, and Boron. *Journal of Chemical Physics*, 1975, 62(7), 2921-2923.

Dirac, P. A. M., *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, 1930, 26, 376.

Feller, D. F. and Ruedenberg, K., Systematic-Approach to Extended Even-Tempered Orbital Bases for Atomic and Molecular Calculations. *Theoretica Chimica Acta*, 1979, 52(3), 231-251.

Fermi, E., *Z. Physik*, 1928, 48, 73.

Floss, H.G.; Onderka, D.K.; Carroll, M. Stereochemistry of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase reaction and the chorismate synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 736–744.

Gaspar, R., *Uber Eine Approximation Des Hartreefogschen Potentials Durch Eine Universelle Potentialfunktion. *Acta Physica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1954, 3(3-4), 263-286.

Gaussian 03, Revision C.02 (or D.01), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.

M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

Gordon, M. S., et al., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.22. Small Split-Valence Basis-Sets for 2nd-Row Elements. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, 104(10), 2797-2803.

Hehre, W. J., Ditchfie.R, and Pople, J. A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.12. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular-Orbital Studies of Organic-Molecules. *Journal of Chemical Physics*, 1972, 56(5), 2257-&.

Hehre, W. J., Stewart, R. F., and Pople, J. A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods.I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals. *Journal of Chemical Physics*, 1969, 51(6), 2657-&.

Hill, R.K.; Bock, M.G. Stereochemistry of 1,4-conjugate elimination reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 637–639.

Hill, R.K.; Newkome, G.R. Stereochemistry of chorismic acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 5893–5894.

Hohenberg, P. and Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, 1964, 136(3B), B864-&.

Huzinaga, S., Gaussian-Type Functions for Polyatomic Systems.I. *Journal of Chemical Physics*, **1965**, 42(4), 1293-&.

Huzinaga, S., Klobukowski, M., and Tatewaki, H., The Well-Tempered Gtf Basis-Sets and Their Applications in the Scf Calculations on N-2, Co, Na-2, and P-2. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 1985, 63(7), 1812-1828.

HyperChem(TM), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA

Kitzing K, Auweter S, Amrhein N & Macheroux P (2004) Mechanism of chorismate synthase. Role of the two invariant histidine residues in the active site. *J Biol Chem* 279, 9451–9461.

Lee, C. T., Yang, W. T., and Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Physical Review B*, 1988, 37(2), 785-789.

Levine, N. I., *Quantum Chemistry*. 1991, New Jersey: Prentice Hall. 251.

Macheroux P, Schmid J, Amrhein N & Schaller A (1999) A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* 207, 325–334.

Osborne, A., Thorneley, R.N.F., Abell, C., and Bornemann, S. Studies with substrate and cofactor analogues provide evidence for a radical mechanism in the chorismate synthase reaction. *J. Biol. Chem.* 2000. 275, 35825–35830.

P. C. Hariharan and J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta.*, 28, 213 (1973); M. S. Gordon, *Chem. Phys. Lett.*, 76, 163 (1980)]

Perdew, J. P. and Wang, Y., Accurate and Simple Analytic Representation of the Electron-Gas Correlation-Energy. *Physical Review B*, 1992, 45(23), 13244-13249.

Perdew, J. P., Burke, K., and Ernzerhof, M., Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 1996, 77(18), 3865-3868.

Pulay, P., Ab Initio Calculation of Force Constants and Equilibrium Geometries in Polyatomic Molecules. I. Theory. *Molecular Physics*, 1969, 17(2), 197-&.

Raffenetti, R. C., et al., Efficient Use of Jacobi Rotations for Orbital Optimization and Localization. *Theoretica Chimica Acta*, 1993, 86(1-2), 149-165.

Rauch G, Ehammer H, Bornemann S & Macheroux P (2007) Mutagenic analysis of an invariant aspartate residue in chorismate synthase supports its role as an active site base. *Biochemistry* 46, 3768–3774.

Rauch, G., Ehammer, H., Bornemann, S. and Macheroux, P. (2008), Replacement of two invariant serine residues in chorismate synthase provides evidence that a proton relay system is essential for intermediate formation and catalytic activity. *FEBS Journal*, 275: 1464–1473.

Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. *Chem Rev.*, 1998, 19, 593.

Reeves, C. M. and Fletcher, R., Use of Gaussian Functions in Calculation of Wavefunctions for Small Molecules. 3. Orbital Basis and Its Effect on Valence. *Journal of Chemical Physics*, 1965, 42(12), 4073-&.

Reeves, C. M. and Harrison, M. C., Use of Gaussian Functions in Calculation of Wavefunctions for Small Molecules. 2. Ammonia Molecule. *Journal of Chemical Physics*, 1963, 39(1), 11-&.

Reeves, C. M., Use of Gaussian Functions in Calculation of Wavefunctions for Small Molecules. 1. Preliminary Investigations. *Journal of Chemical Physics*, 1963, 39(1), 1-&.

Roos, B. O. and Sadlej, A. J., Polarized Basis-Sets for Accurate Predictions of Molecular Electric Properties - Electric Moments of the Lih Molecule. *Chemical Physics*, 1985, 94(1-2), 43-53.

Roothaan, C. C. J., New Developments in Molecular Orbital Theory. *Reviews of Modern Physics*, 1951, 23(2), 69-89.

Ruedenberg, K., Approximate Relation between Orbital Scf Energies and Total Scf Energy in Molecules. *Journal of Chemical Physics*, 1977, 66(1), 375-376.

Sadlej, A. J., Medium-Size Polarized Basis-Sets for High-Level Correlated Calculations of Molecular Electric Properties. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1988, 53(9), 1995-2016.

Schmidt, M. W. and Ruedenberg, K., Effective Convergence to Complete Orbital Bases and to the Atomic Hartree-Fock Limit through Systematic Sequences of Gaussian Primitives. Journal of Chemical Physics, 1979, 71(10), 3951-3962.

Sham, L. J. and Kohn, W., 1-Particle Properties of an Inhomogeneous Interacting Electron Gas. Physical Review, 1966, 145(2), 561-&.

Silver, D. M. and Nieuwpoort, W. C., Universal Atomic Basis Sets. Chemical Physics Letters, **1978**, 57(3), 421-422.

Sobrado, P. (**2012**). Noncanonical reactions of flavoenzymes. International Journal of Molecular Sciences, 13(11), 14219-14242.

ThomasL.H., Proc. Camb. Phil. Soc., 1927, 23, 527.

Vosko, S. H., Wilk, L., and Nusair, M., Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin-Density Calculations - a Critical Analysis. Canadian Journal of Physics, 1980, 58(8), 1200-1211.

Wolinski, K., Roos, B. O., and Sadlej, A. J., Polarized Basis-Sets and the Calculation of Infrared Intensities from Nuclear Electric Shielding Tensors. Theoretica Chimica Acta, 1985, 68(6), 431-444.

Zheng, Y.J. & Ornstein, R.L. J. Biomol. Struct. Dyn. 14(2):231-233, **1996**.